

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE QUÍMICA**

**USO DE UN KIT HECHO A BASE DE BACTERIAS  
LÁCTICAS Y RESAZURINA PARA DETERMINAR LA  
CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS ALIMENTOS  
PERECEDEROS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**TOMAS GABINO JIMÉNEZ GATICA**

**MÉXICO, D.F.**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Jurado asignado:

Presidente: María Mercedes Palao Rincón  
Vocal: Gabriela Alatorre García  
Secretario: José Pablo Pérez -Gavilán Escalante  
1er. Sup: Baciliza Quintero Salazar  
2do. Sup: Aleida Mina Cetina

Sitio en donde se desarrollo el tema:

U.N.A.M  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología

Asesor del tema:

M. en C. José Pablo Pérez- Gavilán Escalante

-----

--

Sustentante:

Tomás Gabino Jiménez Gatica

-----

## AGRADECIMIENTOS

**A Dios:** Por permitirme estar en el lugar y momento adecuados con las personas indicadas.

**A la Universidad Nacional Autónoma de México:** Por permitirme formar parte de ella, por vivir una etapa inolvidable en mi vida. Por ti trabajaré como un profesionalista, para el honor de esta gran institución.

**Al Dr. Pablo Pérez-Gavilán:** Por compartir sus enseñanzas conmigo, por el apoyo brindado en el desarrollo de este proyecto, por abrirme las puertas de su casa. Gracias por la confianza.

**A los miembros del Jurado:** Por sus aportaciones y consejos en la culminación de este trabajo.

**A todos mis profesores:** Por sus valiosos conocimientos que me brindaron para que pudiera llegar a estas instancias.

## *DEDICATORIA*

### *A mis padres*

*Tomás y Otilia, por ser mis mejores maestros en la vida, porque siempre han estado conmigo y han apoyado mis proyectos. Porque siempre creyeron en mí.  
Porque juntos construimos este gran sueño.*

### *A mi esposa*

*Almita, por tu apoyo incondicional, por el esfuerzo que realizas día con día. Por compartir tu vida conmigo. Te amo.*

### *A mis hijitos*

*Hugo, Javier, Daniel ... por la alegría de un niño, porque son los hermanitos que siempre quise tener.  
Por ustedes trabajaré para disfrutar de este gran regalo de Dios, la vida.*

### *A mis hermanas*

*Sara y Ana, porque permitieron que realizara este gran proyecto, porque siempre creyeron en mí y porque cada vez que lo hicieron, lograron que yo también confiara en mí.*

### *A mis familiares*

*Abuelitas Cirila y Zeferina, a mis tíos Apolinar, Cirá y Berna, a mis padrinos Roque y Lucina, porque siempre estuvieron pendientes de este trabajo. Y a todos mis familiares y amigos con quienes he compartido momentos agradables en la vida.*

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
<b>2.1 CADENA DE FRÍO DE LOS ALIMENTOS PERECEDEROS</b>	<b>3</b>
<b>2.2 INDICADORES DE TIEMPO TEMPERATURA</b>	<b>4</b>
<b>2.3 CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y DE LA RESAZURINA</b>	<b>8</b>
2.3.1 Características de las bacterias lácticas	8
2.3.2 Características y usos de la resazurina	12
<b>2.4 KIT DE RESAZURINA PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LA LECHE FLUIDA</b>	<b>14</b>
<b>2.5 KIT DE BACTERIAS LÁCTICAS Y RESAZURINA</b>	<b>15</b>
<b>2.6 MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS</b>	<b>18</b>
2.6.1 Microbiología del pescado	21
2.6.2 Microbiología de la carne	23
2.6.3 Microbiología de la leche	27
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
<b>3.1 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>31</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>31</b>

<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>32</b>
<b>4.1 METODOLOGÍA</b>	<b>32</b>
4.1.1 Reactivación y curva de crecimiento de la cepa <i>Lactococcus lactis spp lactis</i>	33
4.1.2 Elaboración del kit	35
4.1.2.1 Elaboración de papeles impregnados con bacterias lácticas y papeles con resazurina	35
4.1.2.2 Presentación del kit	36
4.1.3 Activación del kit y análisis microbiológico del alimento en cada cambio de color del indicador	37
4.1.4 Preparación de la muestra de alimento a monitorear	38
4.1.5 Relación de los cambios de color del kit con la calidad microbiológica del alimento	42
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
5.1 CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>Lactococcus lactis spp lactis</i>	43
5.2 GRÁFICAS DE RELACIÓN DE LOS CAMBIOS DE COLOR DEL KIT CON RESPECTO AL CRECIMIENTO MICROBIANO EN LOS ALIMENTOS	44
5.2.1 Análisis de pescado	44
5.2.2 Análisis de carne de res, cerdo y pollo	47
5.2.3 Análisis de leche	53

<b>5.3 Interpretación del kit</b>	<b>56</b>
<b>5.4 Usos del kit</b>	<b>56</b>
<b>5.5 Comparación con otros métodos para monitorear la cadena de frío de los alimentos</b>	<b>57</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>61</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>62</b>



---

---

## INTRODUCCIÓN

El historial tiempo-temperatura de la cadena de frío determina el riesgo microbiológico, la vida de anaquel y la calidad final de los alimentos refrigerados. La temperatura juega un papel crucial en el manejo y procesamiento de materia prima, distribución y almacenamiento, un buen control de ésta es imprescindible para alcanzar la vida útil del producto durante su comercialización. El valor de la temperatura crítica a mantener depende de los microorganismos que predominen en el producto, así como de sus factores intrínsecos (pH, aw).

Las bacterias causantes del deterioro son en su mayoría psicrótrofas, capaces de crecer a menos de 7°C independientemente de su temperatura óptima de crecimiento a un ritmo muy lento, pero el crecimiento es acelerado cuando se pierde el control en un punto de la cadena de frío.

Las industrias procesadoras de alimentos no deben omitir el papel del consumidor en el mantenimiento de la cadena de frío, por lo que se debe alertar a estos sobre los efectos microbiológicos de una falta de control de temperatura sobre los productos refrigerados.

Por otra parte, las industrias no siempre cuentan con el equipo adecuado, personal capacitado, cultura o cualquier otro recurso necesario para monitorear la cadena de frío de los alimentos perecederos. Una forma eficaz de abordar esta problemática es el uso de registradores de tiempo-temperatura incorporados en el contenedor utilizado para el transporte del producto; sin embargo, estos dispositivos presentan una limitación económica por el costo que tienen.

Debido a lo anterior y basándose en el principio del kit de resazurina para el control microbiológico de la leche fluida (Patente 170279, UNAM), en este proyecto se dio continuidad a la línea de investigación del Dr. Pablo Pérez-Gavilán que consiste en utilizar el Kit hecho a base de bacterias lácticas y resazurina para determinar la calidad microbiológica de los alimentos perecederos, el cual a través de los cambios de color que presenta, indica si el alimento es apto para su consumo dependiendo de la cantidad de microorganismos que existen como consecuencia de las condiciones de tiempo y temperatura en las que fue expuesto.

---

---

## ANTECEDENTES

### 2.1 CADENA DE FRÍO DE LOS ALIMENTOS PERECEDEROS

El historial tiempo-temperatura de la cadena de frío determina el riesgo microbiológico, la vida de anaquel y calidad final de los alimentos refrigerados. La vida útil de los alimentos refrigerados está determinada por los efectos acumulativos de la temperatura durante el manejo de las materias primas, en los procesos productivos y en todas las etapas de almacenamiento y transporte requeridas para su comercialización. La temperatura juega un papel crucial, un buen control de ésta es imprescindible para alcanzar la vida útil del producto que permita su adecuada comercialización. Desafortunadamente los sistemas de producción y los canales de distribución no siempre cuentan con el equipamiento necesario para cumplir con esta recomendación. La falta de control de temperatura se refleja en serios problemas de estabilidad microbiológica.

La cadena de frío se define como el sistema logístico que comprende al personal, equipo y procedimientos para almacenar, transportar y mantener a la temperatura correcta los alimentos de tal forma que se conserven sus características de calidad e inocuidad, desde el momento que dejan la planta de manufactura, durante su transporte y almacenamiento, hasta el momento que llegan al cliente final.

Para la mayoría de los alimentos se recomienda que la cadena de frío se mantenga dentro de un rango de temperatura entre 1 a 2 °C y que no sea superior a los 4 °C; sin embargo, en muchos supermercados los estantes refrigerados están programados para operar entre 7 y 10 °C y es todavía más grave cuando estos equipos se apagan durante la noche (James-James, 2002).

Por otra parte, en un estudio realizado en Reino Unido se encontró que la temperatura de operación de un refrigerador doméstico fluctúa entre  $-1$  y  $11$  °C y que el 70% de los refrigeradores estudiados operaba a una temperatura promedio arriba de los  $5$  °C; además, también se determinó que en dichos refrigeradores los productos cárnicos requieren aproximadamente 5 horas para alcanzar una temperatura superficial de  $7$  °C después de ser sometido a temperaturas cercanas a  $30$  °C durante 1 hora, que es el tiempo aproximado que se tarda una persona en trasladarse del lugar donde compró el producto al hogar (James-James, 2002).

Tomando en cuenta lo anterior, las industrias procesadoras de alimentos no deben omitir el papel del consumidor en el mantenimiento de la cadena de frío, tanto para el diseño de sus productos (vida de anaquel) como para alertar a éstos sobre los efectos microbiológicos de un abuso de temperatura en los alimentos refrigerados. Además se requiere de la cooperación de productores, proveedores de materia prima, transportistas y las cadenas de supermercados y todos aquellos agentes involucrados en el manejo de alimentos refrigerados para mejorar la cadena de frío y con ello la calidad del producto final (Tirado, 2005).

## **2.2 INDICADORES DE TIEMPO – TEMPERATURA**

Una forma eficaz de abordar esta problemática es el uso de registradores de tiempo – temperatura, incorporados en el contenedor utilizado para el transporte del producto; sin embargo, estos dispositivos tienen una limitación económica, una alternativa similar es el uso de indicadores de tiempo – temperatura (TTI's por sus siglas en inglés) que va en aumento, ya que generan un historial acumulativo de las condiciones de tiempo y temperatura a las que ha sido sometido un alimento. Los indicadores Tiempo-Temperatura a su vez pueden clasificarse en indicadores de historia parcial que no responderán a menos que se sobrepase la temperatura de umbral, y en indicadores de historia completa, que responderán independientemente de la

temperatura crítica. Además existe una serie de características que se les exige a los indicadores, tales como que sean fácilmente activables y de uso sencillo, deben presentar una respuesta exacta e irreversible con correlación con el deterioro del producto y con la cadena de distribución de tiempo y temperatura (Hernández, 2006). El funcionamiento de estos dispositivos está basado en reacciones de polimerización, procesos de difusión o hidrólisis enzimáticas, cuyas velocidades dependen de la temperatura y se miden por medio de cambios de color de un indicador. A continuación se mencionan algunos ejemplos de estos indicadores.

Monitormark de 3M. Los indicadores Monitormark (3M Packaging Systems, Bracknell, UK) son indicadores de historia parcial que depende de la difusión del éster ácido graso y colorante azul que contienen, los cuales junto con una tira de papel absorbente siguen el mecanismo de un termómetro en función del tiempo y la temperatura. El punto de fusión de este componente químico y el colorante azul dan una respuesta visible de la distancia recorrida desde el bulbo de origen hasta la tira de papel por donde se difundirán una vez alcanzado el punto de fusión, ambas partes del dispositivo están separadas por una película de poliéster que sirve de barrera para evitar que la difusión ocurra hasta que ésta se desprenda para activar el indicador, la difusión inicia si la temperatura de exposición está por arriba del punto de fusión del éster que determina la respuesta en función del tiempo y temperatura. El indicador está disponible con un rango de temperaturas desde 1 °C a 48 °C. La respuesta del indicador solo expone la temperatura, no la calidad del producto; su propósito es señalar cuando el producto ha estado expuesto a temperaturas por arriba del rango específico que maneje el indicador. Monitorea la exposición de temperaturas en productos sensibles a los cambios durante el transporte y almacenamiento de alimentos, principalmente medicinas, vacunas, sangre, kits de diagnóstico médico ([www.3m.com](http://www.3m.com), Diciembre 2008).

Check Point de Vitsab. Consiste en una solución que contiene una enzima lipolítica, un sustrato lipídico y un colorante químico. Está basado en reacciones enzimáticas causadas por un cambio de pH en una mezcla de reacciones. Check Point es activado rompiendo el cierre hermético que contiene la solución con enzima lipolítica y su sustrato de lípido, la reacción es visualizada con un colorante incluido en el sistema. El principio de este indicador es el cambio de color que presenta, de verde a amarillo, debido a que la reacción tiene lugar como respuesta al cambio de pH, mientras la reacción tiene lugar, la sustancia lipídica se hidroliza y el cambio de pH se observa con una variación de color. La reacción es irreversible y será más rápida cuanto más se incremente la temperatura y más lenta si ésta se reduce. Son utilizadas para carnes, mariscos, vegetales procesados.

Los indicadores Lifelines Fresh Check son etiquetas con un anillo central polimérico que, por acción de la temperatura se oscurecen informando al consumidor de no ingerir el producto (Hernández, 2006). Está basado en una polimerización de estado sólido cubierto con una ligera capa de monómero de acetileno que hace un cambio color del polímero.

TRACEO de Cryolog. Pertenece a una nueva generación de indicadores de frescura. TRACEO es una etiqueta adhesiva compuesta por un gel y microorganismos alimentarios, que aplicada sobre un código de barras, la etiqueta una vez coloreada y vuelta opaca impide la lectura y permite una detección automática y sistemática de los productos que ya no se pueden consumir. ([www.cryolog.com](http://www.cryolog.com), Junio 2008)

Por otra parte, en Europa se han realizado estudios para desarrollar algunos prototipos de indicadores de Tiempo-Temperatura para monitorear la cadena de frío de los alimentos, tal es el caso de los realizados por Vaikousi, Koutsoumanis y compañía, quien recientemente en el año 2008 elaboró un

diseño de un TTI hecho a base de una solución líquida (Solución de Ringers) que contiene un indicador colorimétrico (rojo de clorofenol) al cual se le inocula cierta cantidad de la cepa bacteriana *Lactococcus sakei*, dependiendo de la temperatura de almacenamiento a la cual se va a monitorear el crecimiento microbiano. La producción de metabolitos que generan estos microorganismos provocará un descenso de pH en el medio y con ello los cambios de color irreversibles en el indicador, que van desde rojo a anaranjado y finalmente amarillo que indica cuando el alimento no es apto para consumo. Sin embargo para validar la certeza de este prototipo, compararon el tiempo en que se alcanza el punto final en el indicador dependiendo de la temperatura de almacenamiento con el tiempo en que se deteriora el producto a esa misma temperatura, estos últimos datos lo toman de la literatura así como de lo estimado con sus modelos matemáticos registrados en trabajos anteriores realizados por ellos mismos (Vaikousi, 2008).

Otro ejemplo es el realizado por Domínguez quien desarrolló un modelo matemático para estimar la vida de anaquel de la carne de aves ya que según menciona el autor hay pocas investigaciones al respecto, pues la mayoría de las que existen se centran en evaluar la vida de anaquel de productos pesqueros y carne de bovinos y porcinos, además en dichos estudios solo se analiza el crecimiento microbiano de bacterias totales. El estudio que realizó Domínguez consiste en un modelo matemático para estimar la vida de anaquel de la carne de aves a través de una ecuación que relaciona los tiempos de duplicación de bacterias totales en refrigeración con presencia de oxígeno como son las *Pseudomonas*, con la temperatura de almacenamiento. Los datos de los tiempos de duplicación de las bacterias los obtuvo de las curvas de crecimiento de las mismas reportados en la literatura, lo mismo hizo con las temperaturas de almacenamiento. Para validar su modelo matemático llevó a cabo cuentas bacterianas totales y cuentas de *Pseudomonas* a diferentes temperaturas de almacenamiento, desde 0°C hasta 25 °C encontrando que los resultados en los tiempos de duplicación de los microorganismos son similares

a los estimados con la ecuación que utilizó en su modelo matemático. El autor concluye que cuando la carne se almacena en refrigeración aeróbicamente, las bacterias que causan su deterioro son las *Pseudomonas* y que éstas son las que predominan por lo que se puede considerar que al hacer la cuenta total de los microorganismos bajo estas condiciones es prácticamente la misma cuenta bacteriana que si se hiciera solo para *Pseudomonas* (Domínguez, 2007).

## **2.3 CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y DE LA RESAZURINA**

### **2.3.1 Características de las bacterias lácticas**

Las bacterias lácticas morfológicamente se clasifican como Gram positivas, no formadoras de esporas, son inmóviles o muy raramente móviles, presentan formas cocoides o bacilares. Fisiológicamente las bacterias lácticas homofermentativas se caracterizan por producir mayoritariamente ácido láctico como producto final de la fermentación de los carbohidratos, no poseen citocromos y carecen de un sistema de electrones para generar ATP de manera aerobia, por tal motivo obtienen energía solo por fosforilación a nivel de sustrato, son catalasa negativas, crecen anaeróbicamente y también lo hacen en presencia de oxígeno, son quimiorganótrofas y tienen requerimientos nutricionales complejos. Por otra parte, las bacterias lácticas heterofermentativas además de producir ácido láctico también producen ácido acético, etanol y dióxido de carbono a partir de la fermentación de los azúcares. Las bacterias lácticas pueden deteriorar una gran variedad de alimentos incluyendo la leche y productos lácteos, carnes, vegetales, frutas y productos azucarados así como aquellos conservados en vinagre (Elmer, 1998). Sin embargo también son considerados seguros y favorables para el consumidor.



Estas bacterias compiten con otros microorganismos en carne refrigerada por su naturaleza psicrotrofica y por la producción de sustancias inhibitorias que incluyen los ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, antibióticos y bacteriocinas (Michael, 1994). Las bacterias lácticas de importancia en alimentos pertenecen a los géneros *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*.

#### Género *Enterococcus*

Células usualmente esféricas u ovoides, este el nuevo nombre propuesto para *Streptococcus faecalis*. Aislado a partir de intestinos de humanos y animales. Está presente en alimentos o agua y es asociado con contaminación fecal. Su capacidad para crecer y sobrevivir bajo un amplio rango de condiciones ambientales, incluyendo temperaturas extremas y concentraciones altas de sal probablemente influyan para su distribución. Es considerado ser más resistente al enfriamiento, bajo pH, tratamientos térmicos moderados y cloración que *Escherichia coli*. En India ha demostrado ser el enterococo más dominante en leche cruda y pasteurizada, mantequilla y helados. Los enterococos también se han utilizado como cultivos iniciadores en algunos alimentos y están disponibles comercialmente como probióticos para la prevención y tratamiento de trastornos intestinales de hombres y animales. En particular *E. faecium* está asociado con la fermentación de quesos del sur de Europa y frecuentemente se aplican en su procesamiento. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C.

#### Género *Leuconostoc*

Células esféricas o lenticulares asociadas en pares o cadenas, osmófilico, esto significa que es capaz de crecer en concentraciones de sacarosa iguales o mayores al 10%, es heterofermentativo, fermenta la glucosa con producción de D(-) ácido láctico, etanol manitol y CO<sub>2</sub>. A *Leuconostoc* se le asocia con la

producción de compuestos aromáticos a partir del citrato en fermentaciones lácticas y la producción de dextranas que tienen amplias aplicaciones en la investigación, la industria y la medicina ya que se utiliza como estabilizador en jarabes, helados o productos de pastelería, sin embargo en otros casos representa un contratiempo, sobretodo en la elaboración u obtención de alimentos ricos en este polisacárido, por ejemplo en la extracción de azúcar a partir de caña o remolacha azucarera. En el procesamiento del azúcar, la presencia de *Leuconostoc* provoca la descomposición del producto.

Tiene gran tolerancia para desarrollarse en concentraciones azucaradas de hasta el 55 – 60%, lo que le permite su desarrollo en jarabes, caramelo líquido, crema de helado, etc. El hábitat de esta especie bacteriana lo constituyen las superficies vegetales, frutas, soluciones azucaradas, la leche y productos lácteos.

#### Género *Lactobacillus*

La división clásica de los lactobacilos está basada en sus características fermentativas: 1) homofermentativos obligados; 2) heterofermentativos facultativos y 3) heterofermentativos obligados. Diversos lactobacilos de los grupos 1 y 2 y algunos lactobacilos heterofermentativos del grupo 3 se usan para producir alimentos fermentados, pero los del grupo 3 están comúnmente asociados con la descomposición de alimentos. Los lactobacilos son fermentativos estrictos y tienen requerimientos nutricionales complejos, son acidúricos o acidófilos, produciendo un pH de 4 en alimentos que contienen carbohidratos fermentables. Como resultado inhiben el crecimiento de otras bacterias o las matan. Generalmente se acepta que los lactobacilos se desarrollan a un pH máximo de 7.2 aunque existen excepciones en cuanto a los sustratos y a las cepas. Los lactobacilos son utilizados como cultivos iniciadores para diferentes variedades de queso, alimentos fermentados vegetales, carnes fermentadas, en la producción de vino y cerveza, masas panaderas acidificadas y ensilados (Robinson, 1990).

### Género *Carnobacterium*

Las carnobacterias asociadas con alimentos tienen características fisiológicas en común con los enterococos, especialmente su capacidad para crecer a pH 9.5, resistencia al acetato, resistencia a antibióticos y requerimiento de vitaminas. Existe poca información disponible sobre la asociación de carnobacterias con alimentos diferentes a la carne de res, pollo y pescado. Se ha reportado que a *C. piscícola* y *C. divergens* como microorganismos que predominan en la microflora de queso blanco madurado con hongos.

### Género *Lactococcus*

El género *Lactococcus* constituye habitualmente la microbiota dominante de la leche, la crema y de los quesos frescos. Aparte de sus características morfológicas los lactococos se distinguen por una acidificación más moderada de la leche (del 0.5% al 1% de ácido láctico) y porque tienen la mayor actividad reductora, la reducción del indicador de resazurina se realiza antes de la coagulación, su temperatura óptima de crecimiento está entre los 20 y 30 °C, se desarrolla aún a 10 °C pero no a 45 °C, son sensibles a la sal pues no crecen en presencia de 6.5% de NaCl ni a pH de 9.6 y no poseen carácter patógeno. Algunas cepas son capaces de fermentar el almidón a diferentes niveles de reacciones positivas (10-90%) aunque son incapaces de fermentar el glucógeno. Las especies de *Lactococcus* se han aislado de plantas tales como maíz fresco y congelado, frijoles, coles, lechuga, chícharos, trigo, papas, calabazas y melón, no se han encontrado en materia fecal ni en suelos.

Particularmente, *Lactococcus lactis ssp. lactis* se produce en presencia de 4% de NaCl, hidroliza la arginina y presenta un sistema enzimático que degrada la caseína. Se encuentra en forma de diplococos. Además algunas cepas producen el antibiótico nisina (polipéptido de 34 aminoácidos, estable al calor bajo condiciones ácidas) el cual tiene un efecto bactericida para muchos microorganismos Gram positivos tales como *Bacillus* y esporas de *Clostridium*

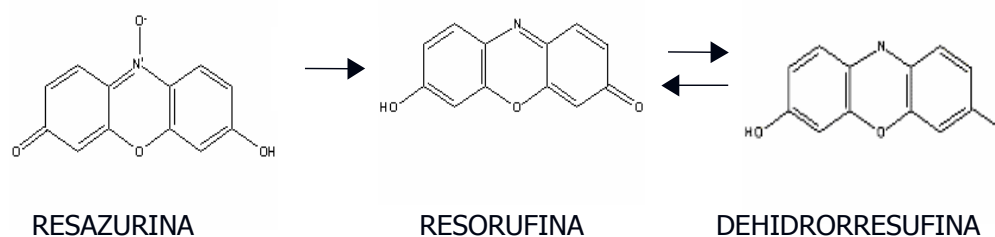
sin embargo no lo producen si el alimento es almacenado en refrigeración debido a su naturaleza mesófila. También algunas cadenas pueden metabolizar leucina para producir 3-metil-butanol el cual da un aroma a leche malteada que es un defecto en productos lácteos (Robinson, 1990).

Recordemos que las bacterias lácticas carecen de un sistema de electrones para generar ATP de manera aerobia por lo que siguen la ruta del homolactato en la cual para convertir los azúcares en piruvato causa un desequilibrio en el estado óxido – reducción de la célula reflejado en su balance de  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ . En la conversión de piruvato a lactato, la reacción de la triosa fosfato deshidrogenasa requiere de  $\text{NAD}^+$  y puede cesar rápidamente a menos que el  $\text{NADH}$  producido se reoxide. Las bacterias lácticas regeneran el  $\text{NAD}^+$  reduciendo el piruvato a lactato por medio de la lactato deshidrogenasa.

### 2.3.2 Características y usos de la resazurina

La resazurina es una oxazona, se reduce en dos etapas: la primera irreversible en su correspondiente oxazina pasando por diversas tonalidades, de violeta hasta rojo-rosa por la formación de un compuesto llamado resofurina, la reducción pasa a una segunda etapa reversible, en la cual la resofurina se reduce a dehidroresofurina, compuesto incoloro que por oxidación puede pasar nuevamente a resofurina (rojo-rosa). Ver figura 1.

**FIGURA 1. REACCIÓN DE LA RESAZURINA**



El principal uso de la resazurina está dentro de los métodos de reducción de colorantes para determinar la calidad microbiológica de la leche (Reyes, 1988).

Dado que la reacción de la resazurina es caracterizada por los cambios de color y porque el compuesto intermediario en la reacción (resofurina) es un fuerte emisor de fluorescencia, cambios mínimos en la concentración de resazurina pueden ser detectados por métodos colorimétricos o fluorométricos, esta característica química hace que la resazurina tenga amplia variedad de usos; tales como pruebas de reducción utilizadas en las técnicas rutinarias de control para evaluar la calidad microbiológica de la leche, donde indirectamente se determina el número de microorganismos presentes ya que únicamente se observa con que intensidad se dan las modificaciones cromáticas del colorante añadido por la actividad de los microorganismos. La prueba de reducción ayuda a conocer el estado de frescura de la leche y su actividad frente a las bacterias acidificantes.

El fundamento de estas pruebas es la relación que existe entre el desarrollo microbiológico y el descenso del potencial redox (Eh) de la leche. La leche fresca tiene un potencial redox entre + 0.20 y + 0.30 volts. Dentro de las propiedades óxido- reductoras de la leche están:

1. El oxígeno disuelto es responsable en gran parte del Eh positivo de la leche fresca.
2. Las bacterias que proliferan en la leche tienen una actividad reductora como consecuencia de dos fenómenos:
  - a) Desaparición del oxígeno disuelto a causa de la respiración, lo que provoca descenso del Eh.
  - b) Producción de un sistema reductor propio de las bacterias.

La reducción del colorante es causada por la actividad de los microorganismos, pues consumen el oxígeno disuelto a la vez que generan las sustancias

reductoras. Cuantas más bacterias haya en la leche, más rápidamente se realiza el cambio de color (Alais, 1970).

Mallikarjuna y Karunasagar (1990) plantearon la utilización de la prueba de reducción de la resazurina en la estimación de la calidad microbiológica del pescado y productos marinos y encontraron que su uso es factible ya que resulta ser una prueba rápida, simple que no requiere de muchos instrumentos o de personal altamente capacitado.

#### **2.4 KIT DE RESAZURINA PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LA LECHE FLUIDA**

En el laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, se encuentra el Dr. Pablo Pérez – Gavilán quien diseñó un kit de resazurina para el control microbiológico de la leche fluida (Pérez – Gavilán, 1993) con el objetivo de reemplazar el método de reducción de la resazurina normal y brindar una alternativa diferente, práctica, sencilla y confiable para la evaluación semi-cuantitativa de la calidad microbiológica de la leche.

La prueba se apoya en la teoría de Wieland, que se basa en la reducción de un colorante químico el cual es reducido por el hidrógeno libre proveniente de la deshidrogenación, producto del metabolismo bacteriano, por lo tanto la transferencia cuantitativa al colorante (reducción) así como la intensidad y rapidez de la variación cromática (virajes o decoloraciones) está directamente relacionada con el número de microorganismos presentes.

Dicho kit consiste en un recipiente de un material transparente con capacidad de 8 ml, el cual contiene una solución de resazurina seca y un tapón para el recipiente. La manera de emplearlo es la siguiente:

1. Colocar en el equipo 5 ml de la leche problema (llenar hasta la marca).
2. Tapar perfectamente bien con el tapón que se incluye en el equipo.

3. Invertir el equipo 5 veces para incorporar la leche con el contenido.
4. Guardar el equipo en una bolsa de la ropa pegada al cuerpo para que adquiriera la temperatura de 37 °C.
5. Registrar el vire o cambio de color al término de un periodo de 3 horas.

Durante el periodo de incubación la leche cambia de color según sea su cuenta bacteriana, si después de 3 horas la muestra se conserva azul, se encuentra en buenas condiciones, esto es una cuenta bacteriana menor a  $10^2$  microorganismos por mililitro, si en lugar de ser azul al final del periodo de incubación el color cambia a violeta quiere decir que la muestra contiene cuentas bacterianas que van de  $10^2$  a  $10^5$  microorganismos por mililitro, lo que nos indica que la leche está ligeramente contaminada pero aún es apta para consumo, si en cambio al cabo de 3 horas la leche se torna rosa, esto quiere decir que existe una población bacteriana de  $10^5$  a  $10^6$  microorganismos por mililitro, signo de que la leche que se está analizando ha iniciado su proceso de descomposición, o bien si la muestra pasa en el lapso de 3 horas por todas las tonalidades antes descritas y regresa al color blanco, significa que las cuentas bacterianas ascienden a  $10^7$  a  $10^8$  microorganismos por mililitro, lo que impide totalmente su consumo (Pérez-Gavilán, 1993).

El cambio de la coloración se interpreta de la siguiente manera:

Color azul o violeta = calidad aceptable.

Color rosa o blanco = calidad inaceptable

## **2.5 KIT DE A BASE DE BACTERIAS LÁCTICAS Y RESAZURINA**

De manera similar, Tafolla (2007) desarrolló en el laboratorio del Dr. Pérez-Gavilán un kit a base de bacterias lácticas y resazurina para monitorear la cadena de frío de los alimentos perecederos, el cual a través de los cambios de

color irreversibles que se presentan indica si se interrumpe la cadena de frío en algún momento. El kit se fundamenta de la forma siguiente: por un lado la cepa bacteriana que contiene, *Lactococcus lactis ssp lactis*, posee una intensa fuerza reductora y tiene una temperatura óptima de crecimiento entre 20 – 30 °C, y por el otro lado, la resazurina es un indicador redox que cambia de color cuando pasa de su forma oxidada a su forma reducida; al poner estos dos sistemas en contacto en un medio adecuado forman el kit de monitoreo, ya que si el alimento es refrigerado correctamente, *Lactococcus lactis ssp lactis* no producirá los agentes reductores que generan el cambio de color en la resazurina, pues no se encuentra a su temperatura óptima de crecimiento, pero si la cadena de frío se interrumpe, las bacterias lácticas comenzarán sus procesos metabólicos lo que se manifestará con el cambio de color en la resazurina.

El objetivo principal de este trabajo fue encontrar la concentración ideal de bacterias viables que permitieran generar los cambios de color rápidamente a temperatura ambiente y de forma lenta a 4 °C de tal forma que el cambio en la coloración del kit sea simultáneo al deterioro de los alimentos para que el monitoreo sea preciso. Para ello *Lactococcus lactis ssp lactis* BM 147 se desarrolló en un medio de cultivo que contenía leche descremada, glucosa, extracto de levadura y caseinato de sodio y se incubó a 29 °C durante 10 horas.

Posteriormente, se impregnaron tiras de papel filtro Wathman número 4 (dimensiones 4X2 cm) con 0.2 ml del medio de cultivo que contiene a las bacterias lácticas a diferentes concentraciones (entre  $10^{-4}$  y  $10^{-7}$ ) y después se secaron al vacío en un desecador a temperatura ambiente durante 1 hora. De igual forma se impregnaron tiras de papel con resazurina (concentración de 0.0125 mg/25ml) y se secaron al vacío. Ambas tiras se colocaron juntas en una bolsa de polietileno de alta densidad la cual a su vez contenía dentro una bolsa pequeña con 0.5 ml de agua destilada. La bolsa se



cerró herméticamente con ayuda de una selladora eléctrica formando así el kit de monitoreo el cual se mantiene en refrigeración hasta su uso.

Tafolla encontró que la concentración que cambia de color rápidamente a temperatura ambiente y de forma lenta a 4 °C es de 10<sup>5</sup> UFC/ml después de secado al vacío.

Para activar el kit se presiona sobre la bolsa que contiene el agua hasta romperla y de esta forma se humedecen las dos tiras de papel, la que contiene las bacterias y la que contiene la resazurina. A partir de este momento se inicia el monitoreo del cambio de color del kit con respecto al tiempo y la temperatura de exposición al que es sometido.

Por otra parte, se estudió la vida de anaquel del kit almacenado a temperatura ambiente y a temperatura de refrigeración, los resultados que se encontraron son:

- a) A temperatura ambiente el kit tienen una vida de anaquel de 2 semanas, después de este tiempo tiende a disminuir la viabilidad de las bacterias lácticas debido a que, al estar éstas a su temperatura óptima de crecimiento con los nutrientes necesarios para su desarrollo, de manera simultánea producen ácido láctico como consecuencia de su metabolismo, mismo que reduce significativamente su crecimiento.
- b) A temperatura de refrigeración el kit tiene una vida de anaquel mayor de 6 semanas, ya que las bacterias no están a su temperatura óptima de crecimiento por lo que no se reproducen rápidamente con lo que no se genera el ácido láctico que puede inhibir su desarrollo.

Finalmente Tafolla recomienda continuar con la investigación para correlacionar el cambio de color del kit de monitoreo al romperse la cadena de frío, con la contaminación microbiana en diferentes productos perecederos (Tafolla, 2007).

## **2.6 MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Debido a los cambios en los hábitos de consumo de las personas, se demanda la producción de alimentos mínimamente procesados pero que a su vez sean de alta calidad nutricional y fáciles de preparar, ejemplos de estos productos son carnes sazonadas y refrigeradas, platillos a base de carne y listos para consumirse, gran variedad de productos cárnicos procesados de aves, res, cerdo y productos marinos previamente cocidos y refrigerados (Tirado, 2005). La microbiología de interés asociada con estos productos se centra en dos tipos de microorganismos: psicrótrofos y mesófilos patógenos. Los microorganismos psicrótrofos son bacterias, hongos y levaduras capaces de crecer a temperaturas menores a 7 °C independientemente de su temperatura óptima de crecimiento; los microorganismos mesófilos patógenos pueden sobrevivir a temperaturas de refrigeración y crecen cuando se pierde el control de ésta, pueden crecer entre 20 – 45 °C y su temperatura óptima esta entre 30 – 40 °C (Elmer, 1998).

Ciertos alimentos son identificados con mayor frecuencia como causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's). Este es el caso de los productos cárnicos, donde se incluye carne de res, cerdo, pavo, pollo, jamones y salchichas. Los principales patógenos en productos cárnicos refrigerados son *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, y *Bacillus cereus*, también asociados a productos pasteurizados y refrigerados están: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolítica*, *Shigella flexineri* y *Escherichia coli* 0157:H7 que son frecuentes en productos cárnicos, pescados y mariscos refrigerados (Tirado *et al.* 2005). La presencia de 15 – 20 células de *Salmonella* en un alimento puede producir infecciones intestinales y aunque no compite con otros microorganismos a temperatura de refrigeración, se desarrolla cuando se producen aumentos de temperatura; *S.aureus* genera una entero toxina que es la causa de la intoxicación estafilococal, esta bacteria Gram positiva con forma de coco puede crecer en condiciones aerobias o anaerobias,

aunque su velocidad de crecimiento es menor en ausencia de oxígeno. La enterotoxina muestra mucho mayor resistencia térmica que las propias células del microorganismo llegando a resistir hasta 100 °C durante 1-3 horas, existen siete tipos antigénicos, siendo las toxinas A y D las que causan la mayor parte de las ETA's con niveles tan bajos como 0.1microgramos/kg, los síntomas aparecen de 2-4 horas de la ingestión de la toxina y comúnmente incluyen náusea, vómito, dolor abdominal y diarrea, normalmente la recuperación se da dentro de las 48 horas, sin embargo en algunos casos se puede producir una deshidratación y se hace preciso un tratamiento hospitalario. *Cl. perfringens* y *B. cereus* sobreviven tratamientos térmicos formando esporas que al germinar se pueden reproducir a bajas temperaturas debido a su naturaleza psicrótrofa, cuando alcanzan un nivel de 10<sup>6</sup> células por gramo de alimento provocan intoxicaciones al esporular en el intestino. *L. monocytogenes* es una bacteria psicrótrofa y que su crecimiento se ve acelerado con el aumento de la población de *Pseudomonas spp.*; puede causar listeriosis en mujeres embarazadas, niños recién nacidos y adultos con sistema inmune débil, causa septicemia, meningitis encefalitis y otras infecciones cuando un alimento contiene más de 1000 células. *Y enterocolítica* crece muy lentamente a bajas temperaturas y no se conoce la dosis que provoca infecciones. *Shigella flexineri* es capaz de competir con otras bacterias y solo 10 células en un alimento son suficientes para provocar una infección intestinal. *Escherichia coli* 0157:H17 bacteria Gram negativa anaerobia facultativa causa infección en la misma ingesta pero no crece a bajas temperaturas, forma parte de la flora natural del intestino de los animales y su presencia en los alimentos se puede usar como índice de la contaminación fecal; en este sentido, en Estados Unidos se le asignan 52 muertes durante 1985 por lo que su conocimiento es fundamental para todas las empresas exportadoras, es importante considerar que la carne de vacuno es una importante fuente de infección mientras que el cerdo y la pollería no lo son (Cañas, 1994).

El valor de la temperatura crítica a mantener depende de los microorganismos que predominan en los alimentos así como de sus factores intrínsecos (pH, aw, disponibilidad de oxígeno, concentración de nutrientes). Las bacterias causantes del deterioro son en su mayoría psicrótrofas y capaces de crecer entre 0 y 4 °C a un ritmo muy lento pero el crecimiento es acelerado cuando se producen abusos en la temperatura en algún punto de la cadena de frío. Además se debe considerar el crecimiento de importantes patógenos que presentan crecimiento rápido a temperaturas entre 7 y 10 °C. Debido a que existen estas desviaciones en el control de la temperatura de refrigeración, si se expone durante periodos de tiempo prolongados, las bacterias psicrótrofas pueden alcanzar niveles suficientes para causar el deterioro de los productos. En el cuadro 1 (Elmer, 1998) se muestran algunos tiempos de duplicación de *Pseudomonas spp* en diferentes alimentos a diversas temperaturas de almacenamiento. El crecimiento comienza típicamente con el consumo de glucosa y oxígeno superficial por parte de *Pseudomonas spp.* , una vez alcanzada una población bacteriana de 10<sup>8</sup> UFC /g la fuente de glucosa es agotada y comienza el consumo de aminoácidos con el consiguiente desarrollo de putrefacción y aromas rancios asociados con ácidos grasos de cadena corta. Existen diferentes tipos de descomposición de alimentos por psicrótrofos, y esto lo determina la composición del propio alimento.

**Cuadro 1.** Tiempos de duplicación de especies de *Pseudomonas* psicrótrofas durante su crecimiento en alimentos.

Temperatura (°C)	Tiempo de duplicación (h)	Alimento
0	26.6	Productos lácteos
0	30.2	Pescado
2.5	7.7	Productos lácteos
2.5	8	Pollo
2.5	13.8	Carne
4.5	5.0	Productos lácteos
4.5	6.7	Pescado
10	2.6	Productos lácteos
10	2.7	Pollo
10	1.9	Pescado

### 2.6.1 Microbiología del Pescado.

La flora microbiana del pez vivo depende de la que existe en las aguas donde vive. Los peces, lo mismo que los demás animales, están inmersos en un mundo de microorganismos, éstos últimos coexisten dentro del cuerpo de los animales o sobre él en equilibrio biológico. La permanencia de algunos microorganismos puede ser continua o pasajera, se producen variaciones según sea la especie del pez, el hábitat (zona de captura), la estación del año, la situación del alimento y la fase del ciclo reproductivo. Los microorganismos que se llegan a encontrar dentro del organismo de los pescados y en su superficie proceden originalmente del medio circundante, de la piel, de las branquias o del contenido intestinal de los mismos peces, éstos llegan a los tejidos inmediatamente después de producirse la muerte, se propagan por el cuerpo y se multiplican, siendo de esta manera que se les

encuentra en gran número, dentro de estos microorganismos se encuentran: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, aerobios y anaerobios eporulados, levaduras y hongos de distintos tipos, enterobacterias, bacilos, micrococcos, etc (Kietzman, 1994). Las bacterias más importantes en la descomposición son: *Vibrio cholerae*, es un bacilo curvo Gram negativo y anaerobio facultativo, produce una enterotoxina termolábil al calor que causa la enfermedad del cólera provocada por una escasa higiene de los abastecimientos de agua y alimentos contaminados con heces, en el caso de los pescados y mariscos cuando provienen de aguas contaminadas con materia fecal y que además se consumen crudos. La enfermedad se presenta por la ingesta de la bacteria viable la cual se establece en el intestino delgado y en ese sitio libera la toxina, la producción de ésta provoca la diarrea acuosa asociada al cólera. Mediante diversos estudios se ha demostrado que la dosis infectiva es de un millón de microorganismos. Entre los alimentos involucrados contaminados con este microorganismo están los moluscos bivalvos, pescados y mariscos debido a que estos productos en su origen están sometidos a una contaminación microbiológica, lo que aunado a la forma de consumo (en algunas ocasiones se ingieren crudos) generan enfermedades para el consumidor. *Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria halófila y anaerobia facultativa presente en aguas marinas y frecuentemente asociada con moluscos crustáceos y pescado. Según su temperatura óptima de crecimiento se considera mesófilo, sin embargo es capaz de crecer a temperaturas menores a 5 °C. Este microorganismo es el más común que causa enfermedades en Japón porque constantemente contamina productos pesqueros; productos crudos como pescado o mal cocinados o bien son contaminados después de la cocción, estas formas de contaminación se han relacionado con casos de gastroenteritis. *Clostridium botulinum*, una bacteria aerobia formadora de esporas la cual está ampliamente distribuida en suelos, agua, ambientes marinos, productos agrícola crudos y en el intestino de pescado y otros animales. Hay cuatro tipos de *Clostridium botulinum* (I-IV) y algunas cadenas *Clostridium baratii* y *Clostridium butyricum* *Clostridium* que

pueden producir la neurotoxina del botulismo. *Clostridium botulinum* tipo I (cadena proteolítica y *Clostridium botulinum* tipo II (cadena no proteolítica) son responsables de enfermedades de botulismo en humanos. Algunas cadenas de *Clostridium botulinum* no proteolíticas son de interés en la extensión de la vida de anaquel de alimentos refrigerados porque con suficiente tiempo son capaces de crecer y producir neurotoxinas a temperaturas bajas menores a 3.3<sup>0</sup>C, las cadenas proteolíticas las cuales son mesofílicas son capaces de crecer y producir neurotoxinas cuando se pierde el control en la temperatura de refrigeración. La mayoría de los brotes de botulismo en Estados Unidos han sido causados por alimentos procesados en casa tales como pescado y productos cárnicos (Elmer, 1998).

La descomposición va ligada a un proceso de alteración que se instaura después de la muerte del animal y que progresa con el paso del tiempo. En el pescado pueden observarse cambios como la decoloración, así como la formación de una capa lamosa y un exudado húmedo sobre la carne reblandecida. Las bacterias asociadas con la descomposición del pescado se encuentran en niveles cercanos a 10<sup>6</sup> - 10<sup>7</sup> UFC por gramo, y que solo del 10-20% de éstas producen los cambios más notorios, lo más sorprendente es que dicha proporción no cambia mucho durante la refrigeración, indicando que el número de bacterias causantes de los cambios es muy bajo, pero su actividad enzimática es muy grande (Elmer, 1998).

### **2.6.2 Microbiología de la Carne**

Las características de las poblaciones microbianas que se desarrollan en la carne y en los productos cárnicos son resultado de los efectos que prevalecen en las condiciones ambientales sobre el crecimiento de los diferentes tipos de microorganismos que se encuentran inicialmente en la carne cruda o que son introducidos por contaminación cruzada. Los factores intrínsecos y extrínsecos presentes determinan el crecimiento del tipo y número de bacterias en la carne; los factores intrínsecos son principalmente químicos (concentración y

disponibilidad de nutrientes, pH, potencial redox, aw, estructura de la carne), mientras que los factores extrínsecos son concernientes de las condiciones de proceso y almacenamiento, de estos últimos lo más importantes son temperatura y disponibilidad de oxígeno, generalmente manipulados para extender la vida de anaquel de los productos cárnicos (Castellano, 2008).

La carne es un excelente sustrato para el crecimiento bacteriano, sino se aplican inmediatamente los métodos para restringirlo comienza fácilmente el deterioro, las bajas temperaturas usadas en el enfriamiento de las canales constituye la primer barrera para el desarrollo microbiano. El enfriamiento post-mortem de las canales es empleado principalmente para asegurar la inocuidad del alimento y extender la vida de anaquel haciendo menos énfasis de la suavidad y color del producto final. Las bajas temperaturas reducen las reacciones bioquímicas y el crecimiento microbiano; los procesos de enfriamiento de las canales después de la matanza tienen un fuerte impacto sobre la calidad y palatabilidad de la carne así como del porcentaje de deterioro.

Después de la matanza, la microbiota comprende una mezcla de mesófilos y psicrótrofos los cuales son gradualmente seleccionados durante el enfriamiento de la carne, sobre estas condiciones los mesófilos no crecen mucho en tanto que los psicrótrofos se desarrollan más. La contaminación más importante de la carne es de origen externo durante el sacrificio, manipulación y tratamientos a que se somete. También es posible la contaminación de la carne y sus productos por microorganismos patógenos provenientes del hombre, especialmente de origen entérico. En la sangría, desuello y cuarteado de los animales las principales fuentes de contaminación son las partes externas del animal y tubo digestivo. Debido a la gran variedad de fuentes de contaminación, los tipos microbianos que suelen encontrarse son muchos, tales como: hongos y levaduras, así como bacterias del género *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*,



*Flavobacterium, Leuconostoc, Lactobacillus, Proteus Escherichia, Salmonella y Streptomyces* (Castellano, 2008).

Después de la muerte del animal, el glucógeno muscular es convertido a ácido láctico a través de la glucólisis, si las reservas de glucógeno son altas, se alcanza un pH de 5.4-5.6, a este pH el crecimiento de muchas bacterias de importancia en la descomposición puede ser parcial o totalmente inhibido. El efecto inhibitorio del ácido láctico sobre los psicrótrofos Gram negativos en la carne parece estar relacionado con la reducción del pH a temperaturas de refrigeración; sin embargo, algunas especies de *Pseudomonas*, no son afectadas por el pH de la carne por lo que se emplean otros métodos para controlar su crecimiento tal como el empaquetamiento al alto vacío, asimismo, las bacterias ácido lácticas pueden producir una gran variedad de metabolitos primarios y secundarios antagonistas para patógenos en alimentos como: *Listeria monocytogenes, Clostridium* y otras bacterias presentes en la carne como *B. thermosphacta* éstos incluyen ácidos orgánicos, diacetilo, CO<sub>2</sub> y bacteriocinas las cuales son péptidos producidos ribosomalmente, por lo que hace a estas bacterias competitivas con otros microorganismos en carne fría por su naturaleza psicrótrofa y la producción de sustancias inhibitorias. El crecimiento de las bacterias ácido lácticas que sucede en la carne se considera oculto después de la fermentación debido a la baja concentración de carbohidratos y a la fuerte capacidad de amortiguador de pH de la carne, estas bacterias no producen cambios dramáticos en las características sensoriales comparados a los cambios que se dan en la leche y en la fermentación de vegetales. Con respecto a la descomposición de la carne, se ha mencionado que el 93% de la flora total de la carne refrigerada está representada por la flora psicrófila. Las bajas temperaturas en carne permiten la proliferación de psicrotrofos y de algunos psicrófilos estrictos, que causan descomposición con desprendimiento de olores desagradables y formación de fluidos lamosos típicos de putrefacción. Cuando la carne es almacenada aeróbicamente en refrigeración, la microflora dominante es la Gram negativa, no formadora de

esporas que causan putrefacción detectado por los malos olores a concentraciones de  $10^7$  UFC/g y la decoloración del producto a concentraciones de  $10^8$  UFC/g. En contraste, cuando la carne es almacenada anaeróbicamente en refrigeración las bacterias ácido lácticas tanto acidúricas como no acidúricas, los *lactobacilos* y *leuconostoc* son las que predominan; el deterioro anaeróbico es más bajo y ocurre a poblaciones mayores de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/g. (Stiles, 1994).

En el caso del pollo, en Estados Unidos generalmente se comercializa en forma de producto fresco refrigerado (carne suave), producto frío empacado (duro sobre la superficie y blando en el interior del músculo) o como producto congelado. Después de que el consumidor compra el producto si no lo prepara inmediatamente lo refrigera o lo congela, lo que permite diferentes escenarios de temperatura y con ello la influencia de las condiciones microbiológicas del pollo, entre las que están las bacterias patógenas como *Salmonella* y *Campylobacter* que crecen mejor de 30-45 ° C y sobreviven en condiciones de refrigeración y congelamiento y las bacterias que causan deterioro, las cuales tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 15 y 30 ° C.

En el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, recientemente se investigó el efecto de la temperatura de congelación y de enfriamiento sobre la calidad microbiológica del pollo, para lo cual utilizó una muestra de 50 pollos y cada ave la dividieron en dos partes iguales, una de las mitades la conservaron en refrigeración a 4 ° C y la otra la congelaron a -4 ° C en ambos casos las mantuvieron durante 7 días, los resultados que obtuvieron fueron que después del tiempo de almacenamiento la cuenta de mesófilos aerobios incrementó en dos logaritmos partiendo de una concentración de  $4 \times 10^4$  UFC/g cuando se mantuvo a 4 ° C en tanto que en congelación no se notaron cambios, contrario a lo que sucedió para las bacterias psicrótrofas que son las que deterioran los alimentos, donde se partió de una concentración inicial de  $4 \times 10^3$  UFC/g y después de 7 días incrementó de 3-9 logaritmos cuando se

mantuvo a 4 ° C; con estos datos los investigadores concluyen que si se congela el pollo inmediatamente después de ser procesado o refrigerado, no mejora su calidad microbiológica. Cuando el pollo es refrigerado a temperaturas comunes como 4 ° C, las bacterias deteriorativas incrementan su número reduciendo significativamente la vida de anaquel del producto, esta información es desconocida por los consumidores; por otra parte, en pollo refrigerado y empacado bajo condiciones atmosféricas, de la población aerobia total el 50-55% de las bacterias presentan actividad proteolítica, el 40-45% lipolítica y del 5-10% producen pigmentación fluorescente. (Bailey, 2000).

### **2.6.3 Microbiología de la Leche**

Las vacas generalmente son ordeñadas dos veces al día, la obtención de leche, un alimento altamente perecedero, varía desde un lechero con pocos animales hasta el uso de grandes y complejas máquinas para la ordeña; la temperatura y tiempo de almacenamiento de la leche varía ampliamente y por tanto el número y tipo de microorganismos presentes es imprescindible. En las ciudades en desarrollo pequeñas cantidades de leche sin enfriar son llevadas por los lecheros para ser colectada en un centro, pero en rastros lecheros es más sofisticado, la leche es refrigerada inmediatamente después de su producción y almacenada en tanques. Sin embargo solo hay tres principales fuentes de contaminación microbiológica: a) desde la ubre, b) desde el exterior de las tetas y las ubres y c) desde la ordeña y equipo de almacenamiento (Robinson, 1990).

Los números y tipo de microorganismos en leche inmediatamente después de su producción (microflora inicial) reflejan directamente la contaminación microbiana durante su obtención, así la microflora de la leche cuando deja la granja es determinada por la temperatura a la cual ha sido colectada, la temperatura de almacenamiento y la microbiota inicial. Los valores de cuenta total bacteriana pueden ir desde menores a 1000 UFC/ml donde la contaminación durante su obtención es mínima, hasta valores mayores a 10<sup>6</sup>

UFC/ml de leche; valores de cuenta total inicial en leche mayores a 100 000 UFC/ml es evidencia de serias faltas de higiene en la producción, contrario donde se tengan valores menores de 20 000 UFC/ml que reflejan buenas prácticas de higiene. Cuando la leche es colectada y almacenada a temperaturas menores o iguales a 4 ° C, las bajas temperaturas normalmente previenen la multiplicación bacteriana mínimo 24 horas y la microflora es por consiguiente similar a la presente inicialmente (Robinson, 1990).

La microflora inicial y las condiciones sobre las cuales se almacene pueden producir cambios en la microbiota de la leche durante su transporte y almacenamiento; generalmente con 2 a 3 días de transportar la leche, la microbiota dominante es por psicrótrofos, donde los termodúricos no incrementan. Los microorganismos que llegan a predominar a 25-30 ° C son principalmente *Streptococcus* y *coliformes* y ambos tipos incrementan la acidez de la leche, muchas especies Gram negativas que se multiplican en la leche no producen efectos notables cuando sus cuentas son alrededor de  $10^7$  UFC/ml esto si se almacena a bajas temperaturas, por ejemplo menores a 10 ° C en este caso la leche puede parecer normal por 2 a 3 días. Se ha visto que si una leche tiene una cuenta inicial aproximada a 50 000 UFC/ml y si se almacena a temperatura ambiente alcanzará una cuenta total mayor a  $10^7$  después de 18 horas, en tanto que si se conserva a 10 ° C esa misma cuenta la alcanzará a las 48 horas y si se refrigera a 5 ° C después de 72 horas tendrá una cuenta de  $10^6$  UFC/ml (Robinson, 1990).

La vida de anaquel de la leche pasteurizada es influenciada por la calidad de la leche cruda, la mayoría de las bacterias encontradas en leche cruda son Gram positivas capaces de sobrevivir a la pasteurización, en esas se encuentran las bacterias pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* y *Bacillus*, las cuales exhiben bajo crecimiento en leche almacenada a 2 ° C aunque crecen mejor a 6 ° C así estos microorganismos puede limitar la vida de anaquel de la leche pasteurizada y sus productos

(Griffiths, 1988). Sin embargo, las prácticas comunes de colección y almacenamiento de leche cruda favorecen el crecimiento de bacterias psicrótrofas las cuales incluyen las Gram negativas y las Gram positivas; se han aislado diversos géneros de estas bacterias a partir de leche, entre los que comprende a las *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcalígenes*, *Achromobacter*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *coliformes* como *Escherichia* y *Citrobacter* además de las mencionadas arriba. Las *Pseudomonas spp.* son los organismos más comunes en leche cruda o pasteurizada y son los que limitan la vida de anaquel en condiciones de refrigeración. Éstas comprenden a *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi*, *P. putrefasciens* y menos frecuente *P. aeuruginosa*. Las contaminaciones significativas por *Pseudomonas* es debido a la inadecuada sanitización de las superficies de las lecherías. Además la habilidad de las bacterias psicrótrofas para crecer rápidamente en leche refrigerada produce proteasas estables al calor, lipasas y fosfolipasas: algunas enzimas pueden sobrevivir a la pasteurización y aún a tratamientos de UHT. Las *Pseudomonas spp.* son las primeras de interés responsables de la degradación lipolítica de la leche cuando éstas alcanzan una concentración de  $10^6$  UFC/ml. Las lipasas por la hidrolización de triglicéridos produce aromas desagradables asociados con el rompimiento de glóbulos grasos en crema, mantequilla, queso y productos UHT. Algunas lipasas de importancia en leche son las lecitinasas u otras fosfolipasas las cuales son capaces de destruir la integridad de la membrana de los glóbulos grasos y exponer la grasa resultando en una degradación física de la emulsión en la leche (Munsch, 2006).

En un estudio realizado por Griffiths y compañía encontraron que cuando la temperatura de almacenamiento decrece, el porcentaje de microorganismos pertenecientes a las *Pseudomonas* incrementa simultáneo a una reducción en los niveles de *Entrobactericea*; esto presumiblemente refleja diferencias en el porcentaje de crecimiento de estos organismos a diferentes temperaturas de almacenamiento. La aparente disminución de la flora Gram positiva se debe

probablemente al crecimiento de las bacterias Gram negativas. Los altos niveles de bacterias Gram positivas aislados a partir de crema posiblemente indiquen falta de control en la temperatura de almacenamiento, estas bacterias generalmente crecen mejor a temperaturas mayores a 10 °C y no así a 2 y 6 °C. Asimismo analizaron la vida de anaquel de la leche cuando ésta tiene una cuenta de bacterias psicrotrofas menores a 10<sup>4</sup> UFC/ml la leche puede ser almacenada a 2 °C por 3 a 6 días sin que exceda de 10<sup>6</sup> UFC/ml que es cuando se producen malos olores provocando el rechazo del consumidor. Cuando las cuentas iniciales son más altas de 10<sup>4</sup> UFC/ml un tratamiento térmico de 65 °C por 15 segundos seguido de un almacenamiento a 2 °C puede ser requerido para llevar una vida de anaquel mayor a 72 horas (Griffiths, 1987).

---

---

## OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GENERAL

\* Utilizar el Kit hecho a base de bacterias lácticas y resazurina para decidir la aceptación o rechazo de un alimento perecedero.

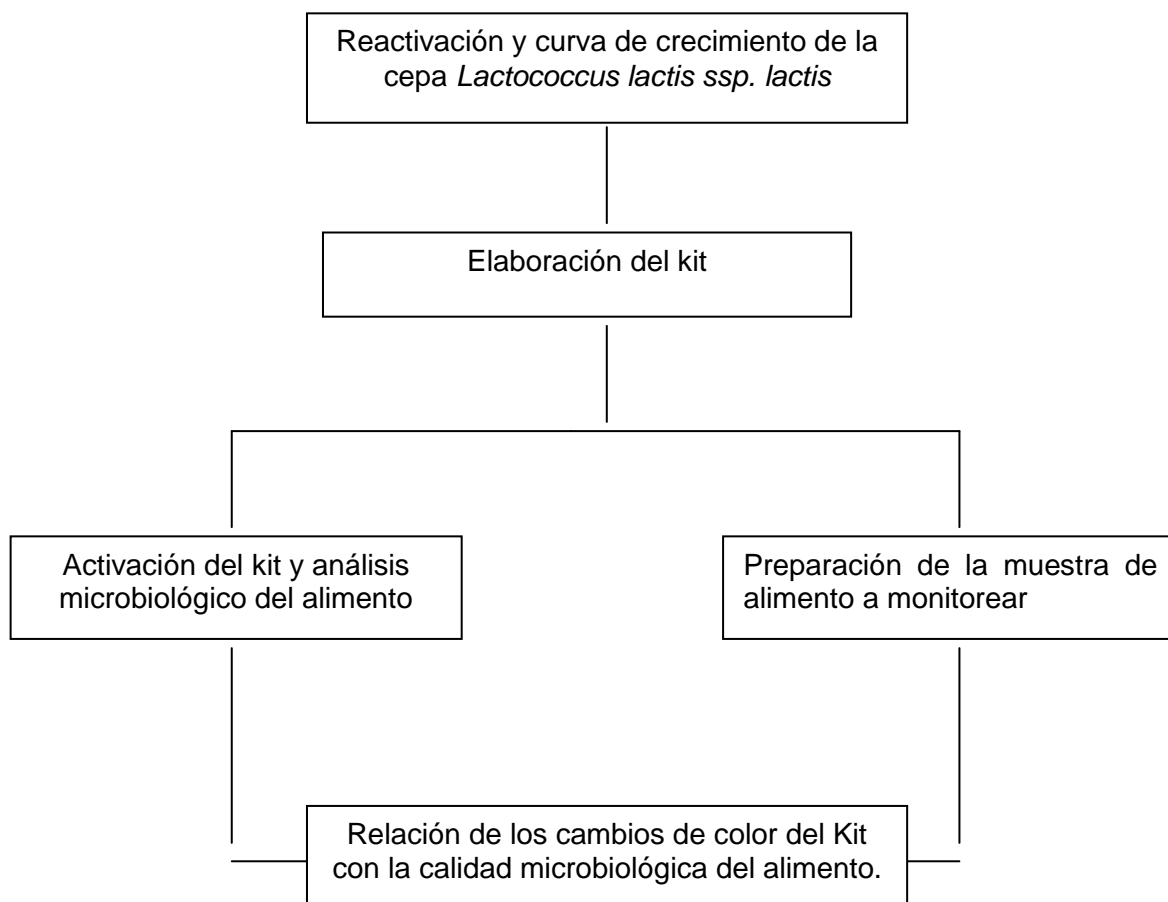
### 3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Relacionar los cambios de color del kit con la calidad microbiológica de los alimentos perecederos.
- Evaluar la calidad microbiológica de los alimentos a 4<sup>0</sup>C, 8<sup>0</sup>C y temperatura ambiente (20-22 <sup>0</sup>C)
- Establecer un intervalo de tiempo en que se presentan los cambios de color del kit a las diferentes temperaturas analizadas.
- Cuantificar los microorganismos en los alimentos en cada cambio de color que presenta el kit.
- Establecer un intervalo de cantidad de microorganismos en cada cambio de color del kit a las diferentes temperaturas estudiadas.

#### 4.1 METODOLOGÍA

Para darle continuidad a la línea de investigación del Dr. Pérez-Gavilán con respecto a la elaboración del kit de bacterias lácticas y resazurina para monitorear la cadena de frío de los productos perecederos, en el presente trabajo se utilizó dicho indicador de tiempo-temperatura en diversos alimentos a los cuales se evaluó la vida de anaquel siguiendo la metodología que se describe a continuación, partiendo desde la elaboración misma del equipo de monitoreo.

En el siguiente diagrama se muestran los pasos generales que se siguieron para el desarrollo de la investigación.





**4.1.1 Reactivación y curva de crecimiento de la cepa *Lactococcus lactis* spp. *lactis***

Para la elaboración del kit se empleó la cepa bacteriana *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BM147 perteneciente a la colección del cepario del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM mantenida a  $-78^{\circ}\text{C}$  en solución de leche descremada con 11% de Sólidos Totales (ST) además con b-glicerol fosfato de sodio, la cual se reactivó de acuerdo con la metodología descrita en el cuadro 2, cuya preparación se describe a continuación.

La leche descremada en polvo al 11% de Sólidos Totales (ST) se disuelve en agua destilada, se agita durante 15 minutos y se esteriliza en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

<b>Cuadro 2. Reactivación de la cepa <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i></b>	
Medio de cultivo: Leche descremada al 11% de ST	
Volumen de inóculo 1% a partir de la suspensión original	
Temperatura de incubación $29^{\circ}\text{C}$	
Siembra inicial	24 h de incubación
1ª resiembra	18-24 h de incubación
2ª resiembra	18 h de incubación
3ª resiembra	12 h de incubación

En la reactivación se realizó la curva de crecimiento de *Lactococcus lactis* spp. *lactis* a partir de la tercer resiembra inoculando 1% de la cepa en medio industrial (Tabla 1) manteniéndola a temperatura ambiente haciendo diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-9}$ . A partir de la dilución  $10^{-5}$  se sembró 1 ml de la cepa en cajas Petri con agar APT (Tabla 2) y se incubaron a  $29^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas, este paso se repitió cada 2 horas y en cada ocasión se hizo por triplicado. La última siembra se hizo a las 24 horas.

Pasado el tiempo de incubación de las placas con agar APT y la cepa, se cuentan las colonias, se saca un promedio y el valor obtenido se multiplica por

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

el inverso de la dilución efectuada obteniéndose así la población viable/ml presente en las diferentes etapas de desarrollo del microorganismo.

### Medio Industrial

Este medio de cultivo fue elaborado con materias primas de grado industrial disueltas en agua destilada. Su composición es la siguiente:

Componente	g/l
Leche descremada en polvo	60
Glucosa	25
Extracto de levadura	10
Caseinato de sodio	20

El medio debe tener un pH de 7.2 +/- 0.1 y se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Agar APT (DIFCO LABORATORIES) para cuenta en placa. Su composición es la siguiente:

Componente	g/l
Agar bacteriológico	14
Peptona de caseína	12.5
Extracto de levadura	7.5
D-(+) Glucosa	10
Cloruro de sodio	5
Citrato sódico	5
Fosfato de potasio dibásico	5
Tween 80	0.2
Sulfato de magnesio	0.8
Cloruro de magnesio	0.14
Sulfato ferroso	0.04

El medio debe tener un pH de 6.8+/- 0.1 y se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

#### **4.1.2 Elaboración del Kit**

##### **4.1.2.1 Elaboración de papeles impregnados con bacterias lácticas y papeles de resazurina.**

Una vez realizada la curva de crecimiento se toma 1 ml del inóculo inicial que está en fase estacionaria ( $10^9$  UFC/ml) mantenida en refrigeración y se diluye hasta  $10^7$  UFC/ml en medio 1 no estéril (Tabla 3), ya que si se esteriliza el color del medio 1 no permite visualizar los cambios de color en los papeles con las bacterias. De la dilución  $10^7$  se toman 0.2 ml y se impregnan en tiras de

papel filtro Wathman No. 4 (dimensiones 4X2 cm) y se secan al vacío en un desecador a temperatura ambiente durante 1 hora.

De manera similar, las tiras de papel filtro Wathman No. 4 (dimensiones 4 X 2 cm) se impregnaron con 1 ml de solución de resazurina (concentración de 0.0125 mg/25 ml) y se secaron al vacío durante 1 hora.

Medio 1 como medio de dilución

Se seleccionó un medio de cultivo para el desarrollo de *L. láctis* cuya coloración no interviniera con las tonalidades de la reducción de la resazurina.

Su composición es la siguiente:

Componente	g/l
Lactosa	25
Glucosa	25
Caseinato de sodio	10

El medio debe tener un pH de 7.2 +/- 0.1. Por cuestiones de experimentación este medio no se esteriliza.

#### **4.1.2.2 Presentación del Kit**

Las tiras de papel filtro impregnadas con las bacterias lácticas así como las tiras de papel con resazurina se colocan dentro de una bolsa de polietileno de alta densidad de tal forma que hagan contacto entre ellas en toda su superficie. También dentro de la bolsa de polietileno se encuentra una bolsa pequeña que contiene 0.5 ml de agua destilada. Se sella la bolsa grande herméticamente con ayuda de una banda de calentamiento. El kit debe conservarse en refrigeración hasta su uso.

#### **4.1.3 Activación del Kit y análisis microbiológico del alimento en cada cambio de color del indicador.**

Para activar el kit se presiona la bolsa con agua hasta romperla de manera que las tiras de papel se impregnen totalmente con el líquido y la reacción de la resazurina se lleve a cabo.

De manera simultánea a la activación del kit se inicia con el análisis microbiológico total de cuenta en placa de una muestra del alimento que se almacenará a las diferentes temperaturas en las que se analizará la vida de anaquel del producto, que son 4°C, 8°C y temperatura ambiente (20-22 °C). Este análisis microbiológico del alimento también se realiza en cada cambio de color del indicador en cada una de las condiciones de almacenamiento.

Para el análisis microbiológico de los alimentos sólidos en cada color que presenta el kit, filetes de pescado, carne de res, carne de cerdo, y carne de pollo, se utilizan 10 g de la muestra a estudiar (cada muestra se analizó por triplicado), la cual se muele en una licuadora con 90 ml de agua destilada estéril, posteriormente de la muestra molida se hacen diversas diluciones en agua destilada estéril de tal forma que se permita el fácil conteo de las colonias cuando éstas se desarrollan. Una vez obtenidas las diluciones deseadas se toma 1 ml de cada una de ellas y se siembran en placas Petri film 3M para cuenta total y se incuban a 37 °C durante 48 horas, cada dilución se siembra por triplicado. Después del tiempo de incubación se realiza el conteo de las colonias que crecieron, se saca el promedio de las colonias encontradas, se multiplica el valor de este número y dicho dato se multiplica por el inverso de la dilución efectuada, al resultado obtenido se calcula el Log para conocer el número de microorganismos presentes en el alimento en el momento del estudio.

En el caso de la leche, al ser un alimento líquido se toman 10 ml del producto a analizar (también cada muestra se hizo por triplicado) con una pipeta estéril y se diluye en 90 ml de agua destilada estéril, se procede con las diluciones

necesarias para el fácil conteo de las colonias y las muestras de cada dilución se siembran por triplicado en medio de cultivo agar APT (tabla 2), se incuban a 29<sup>o</sup>C durante 48 horas; el conteo de las colonias se realiza de igual forma que se hace para los alimentos sólidos.

#### **4.1.4 Preparación de la muestra de alimento a monitorear.**

Para conocer si el funcionamiento del kit de bacterias lácticas y resazurina se podía aplicar a cualquier producto perecedero, se utilizaron algunos alimentos perecederos como filete de pescado, carne de res, carne de cerdo, pollo y leche mismos que se llevaron al laboratorio para ser analizados separadamente quedando de la siguiente manera:

Pescado. En un periodo de una primera semana se analizaron tres muestras de pescado que son: filete de cazón, filete mero y filete de nilo.

Primeramente se compró una muestra de cada filete en un centro comercial donde estaban exhibidos en hielo picado y se trasladaron al laboratorio en un lapso de 15 minutos, una vez ahí se dividió cada filete con un cuchillo lavado previamente con detergente en 10 porciones de 10 g cada uno; el corte de cada pieza se hizo dentro de una campana laminar y el cuchillo se lavó cada vez que la muestra de filete era diferente. Cada porción de las diferentes muestras se colocaron en una caja Petri estéril, se tapó y se colocó encima el kit de monitoreo. Ya realizada esta acción una de las 10 porciones de filete de cazón fue utilizada para el análisis microbiológico inicial, que corresponde al color azul del kit que se activó en ese momento, tres más se utilizaron para analizar la cantidad de microorganismos que contiene el alimento cuando el kit tenía color violeta, de las cuales la primera se incubó a temperatura ambiente, la segunda a 8 °C y la tercera a 4 °C; con las siguientes tres porciones se analizó la carga microbiana cuando el kit presentaba color rosa, que de igual forma se incubaron a temperatura ambiente (20 -22 °C), 8 °C y 4 °C

respectivamente y con las últimas tres porciones se realizó el análisis del color blanco del kit y también se incubaron a las mismas temperaturas ya mencionadas. Este proceso se hizo de igual manera para las muestras de filete de mero y filete de nilo.

Para continuar con el análisis del pescado, en el transcurso de una segunda semana se procedió con la compra de una muestra más de cada clase de filete y se realizó el mismo procedimiento que se describió anteriormente. Por último, en una tercera semana se repitió el experimento de igual forma que en las semanas 1 y 2 con el objetivo de corroborar que los resultados obtenidos fueran repetitivos.

Carne de res y cerdo. En el caso de la carne de res y la carne de cerdo, las muestras se compraron en una carnicería tradicional un día antes de la realización del estudio, se conservaron en refrigeración inmediatamente después de que se compraron y se trasladaron al laboratorio manteniendo las condiciones de refrigeración.

La muestra de carne de res que se compró fue bistec el cual no contenía grasa o bien se retiró con un cuchillo lavado previamente en el momento de dividirla para colocarla en las cajas Petri. En la primera semana en que se analizó el bistec se dividió la muestra en 10 porciones de 10 g cada una, cuando se tuvieron las 10 piezas, cada una se colocó dentro de una caja Petri y encima se colocó el kit, realizada esta operación, una de las porciones se utilizó para el análisis microbiológico de cuenta en placa cuando el kit tenía color azul que fue el momento en que se activó, tres porciones más se emplearon para el análisis del alimento cuando el kit tenía color violeta; una de ellas se incubó a temperatura ambiente, otra a 8 °C y una más a 4 °C; las siguientes tres porciones se utilizaron para el análisis de la carne cuando el kit presentaba color rosa y que se distribuyeron almacenándose a las mismas

temperaturas (temperatura ambiente, 8 °C y 4 °C), por último, las tres porciones restantes se ocuparon para el análisis microbiológico cuando el kit era color blanco y que se incubaron de la misma forma que para los estudios anteriores. Este proceso se repitió en dos semanas más con una muestra diferente en cada una de ellas.

En el caso de la carne de cerdo, el tipo de corte que se utilizó fue maciza el cual no contenía grasa ni hueso y el estudio se llevó a cabo en tres semanas diferentes en cada caso con muestras compradas recientemente y que el análisis se realizó de la misma forma que se hizo para la carne de res.

Pollo. Se analizaron las 3 piezas de carne de pollo principales, por un lado se estudió la pierna y muslo juntos y por otro lado se analizó la pechuga. En ambos casos, el producto se compró en una pollería tradicional recién sacrificado el animal, una vez obtenidas las piezas, se trasladaron inmediatamente al laboratorio manteniendo las condiciones de refrigeración para monitorear la vida de anaquel del producto.

Cuando se analizó la carne de la pierna y muslo de pollo el corte de la misma se hizo de tal forma que el total de la porción (10 g) tuviera cantidades iguales de ambas partes. Una vez que se tuvieron las 10 porciones colocadas en la caja Petri y con su indicador adherido requeridas para el análisis, éstas se distribuyeron de igual manera que se hizo para el pescado, carne de res y carne de cerdo, donde una de las porciones se utilizó para el análisis microbiológico inicial, 3 más para el análisis cuando el kit tiene color violeta y que una de estas tres porciones se incubó a temperatura ambiente, otra a 8 °C y la última a 4 °C ; las siguientes tres porciones se emplearon para el análisis de cuenta en placa cuando la coloración del kit es rosa y finalmente las últimas tres porciones cuando el kit estaba blanco, en cada caso el almacenamiento de las muestras fue igual que para el color violeta del indicador. Para darle validez a los resultados, este proceso se repitió en dos ocasiones más con la carne de ambas piezas compradas recientemente en cada ocasión.



Para estudiar la vida de anaquel y microbiología de la pechuga de pollo, el producto que se ocupó no tenía hueso ni piel y el análisis se hizo por tres semanas, empleando en cada una de ellas muestras diferentes de pechuga siguiendo el mismo procedimiento en cuanto a preparación, almacenamiento y cuenta microbiológica de la muestra que para la pierna y muslo.

Leche. Con respecto a la leche, se analizaron tres marcas comerciales de leche pasteurizada, que para fines de este estudio se les denominó con los nombre de Lecha AL, Leche LA y Leche AD. Las muestras fueron compradas en un centro comercial donde se encuentran exhibidas en refrigeradores.

En una primera semana se compró una muestra de cada marca y se llevó al laboratorio en un periodo de 15 minutos. Una vez teniendo las muestras en el laboratorio, de cada una de ellas se repartieron 10 ml de leche en 10 tubos de ensaye de los cuales un tubo de ensaye con una muestra de leche de cada marca se utilizó para el análisis microbiológico inicial y en ese momento se activa el kit que se colocó al tubo dando un color azul. Posteriormente se incubaron tres tubos de ensaye con lecha de cada marca se dejaron a temperatura ambiente, 9 tubos más (tres de cada marca) a 8 °C y 9 tubos más a 4 °C. En cuanto el kit cambió de color azul a violeta cuando las muestras se almacenaron a temperatura ambiente, se tomó un tubo de ensaye de cada tipo de leche y se procedió con el análisis microbiológico tal como se describe anteriormente, lo mismo se hizo cuando cambió de violeta a rosa y de rosa blanco, esta misma técnica se aplicó cuando el producto se incubo a 8 °C y 4 °C.

El proceso se repitió en dos semanas más para tener un triplicado de cada muestra evaluada a las tres condiciones de temperatura y en cada cambio de color del indicador.

#### **4.1.5 Relación de los cambios de color del kit con la calidad microbiológica del alimento**

Se construyó una gráfica para cada alimento analizado, en la que se registraron los resultados obtenidos. Las gráficas muestran el color del kit, el tiempo que se tardó en cambiar de color el kit a cada temperatura estudiada y el número de microorganismos presentes en cada punto del análisis para cada muestra evaluada. De esta manera se permite conocer la relación que existe entre el color del Kit con la calidad microbiológica del alimento para cada condición de almacenamiento estudiado.

---

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 CURVA DE CRECIMIENTO *Lactococcus lactis* spp.*lactis*

Como se observa en la figura 1 de la curva de crecimiento de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* cuando las bacterias están en fase estacionaria después de 10 horas de incubación alcanzan su máximo desarrollo con una población de  $10^9$  UFC/ml. A partir de esta concentración de la cepa se toma la proporción suficiente para impregnar los papeles con las bacterias de tal forma que generen los cambios de color en el kit rápidamente a temperatura ambiente y lento a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , encontrando que la cantidad necesaria de bacterias viables es de  $10^5$  UFC/ml lo cual coincide con los resultados obtenidos por Tafolla (2007). Asimismo, estos datos coinciden con los obtenidos por Vaikousi, 2008, quien elaboró un prototipo de un indicador de Tiempo-Temperatura utilizando la cepa de *Lactobacillus sakei* que la desarrolló a concentraciones de  $10^8$  y  $10^9$  UFC/ml para de ahí tomar los inóculos necesarios para su trabajo experimental, donde después de múltiples pruebas determinó que la cantidad de bacterias necesarias para generar cambios de color en el indicador en 3.3 días (que es el tiempo en que el alimento ya está en descomposición) es de  $10^5$  UFC/ml si éste se almacena a  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Además al estar la cepa en fase estacionaria, experimentalmente se puede trabajar con este cultivo varias veces, pues el tiempo que tardan los microorganismos en esta fase en condiciones de refrigeración es prolongado.

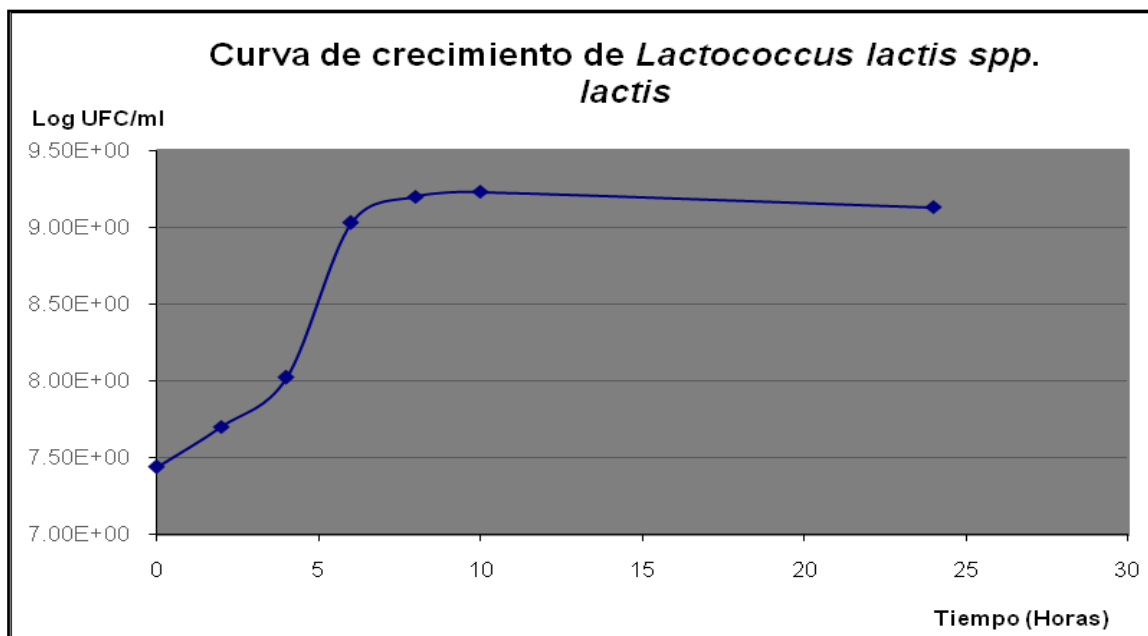


Figura 1. Curva de crecimiento de *Lactococcus lactis* spp. *lactis* desarrollado en medio industrial

## 5.2 GRÁFICAS DE RELACIÓN DE LOS CAMBIOS DE COLOR DEL KIT CON RESPECTO AL CRECIMIENTO MICROBIANO EN LOS ALIMENTOS.

### 5.2.1 Análisis de pescado.

Como se observa en las figuras 2, 3 y 4 , independientemente de la clase de pescado cuando el kit tiene un color azul, el alimento presenta una carga microbiana aproximada a  $3 \times 10^5$  UFC/g misma concentración que no causa daño al consumidor , sin embargo ésta se incrementa en diferentes periodos de tiempo dependiendo de la temperatura a la que se almacene, ya que como se observa en las gráficas, si se mantiene a temperatura ambiente, el cambio de color del kit de azul a violeta se da en 4 horas presentando el alimento una cantidad de microorganismos de  $10^6$  UFC/g lo cual todavía puede ser ingerido considerando el tratamiento térmico que se da al producto para ser comestible, esta misma cuenta la alcanza a las 24 y 60 horas (2.5 días) si se conserva a 8 °C y 4 °C respectivamente. Cuando el kit tiene una coloración

rosa, el alimento presenta una carga microbiana de  $1.5 \times 10^7$  UFC/g lo cual indica que ha iniciado su proceso de descomposición, esta cantidad de microorganismos se alcanza a las 8 horas a temperatura ambiente, a las 48 horas a  $8^\circ\text{C}$  y a las 120 horas (5 días) a  $4^\circ\text{C}$ ; finalmente cuando el kit tiene un color blanco después de mantenerse durante 24 horas a temperatura ambiente, 72 horas  $8^\circ\text{C}$  y 196 horas (8 días) a  $4^\circ\text{C}$ , el alimento está en franca descomposición, pues su carga microbiana es alrededor de  $3 \times 10^7$  UFC/g manifestándose con olores pútridos, color blanquecino y textura blanda.

Estos resultados coinciden con los datos que se obtuvieron en un estudio realizado en España donde analizaron y monitorearon la vida de anaquel de dos diferentes clases de pescado, *Schoththalmus maximus* y filete de salmón con ayuda de un Indicador de Tiempo-Temperatura (TTI) comercial (Fresh Check) a diferentes temperaturas y encontraron que, en general la vida de anaquel del pescado es de 6 días si se almacena a  $5^\circ\text{C}$ , teniendo una carga microbiana de  $10^7$  UFC/g, con una calidad sensorial desagradable y de rechazo para el consumidor (Maidier, 2008).

Además, este tipo de alimentos es el que presenta mayor carga microbiana inicial, alrededor de  $10^5$  UFC/g con respecto a los demás productos analizados debido a las condiciones en que se comercializa ya que en el supermercado donde se compró, y en general en todos los lugares, se conserva en hielo picado y así se expone a la venta, además la cantidad de microorganismos aumenta con la manipulación que se da tanto del vendedor como del consumidor. Estos datos concuerdan con lo que menciona Maidier (2008) donde comentan que la cuenta bacteriana inicial en filete de pescado es mayor a  $10^3$  UFC/g cuando es recién capturado y aumenta a valores superiores a  $10^5$  UFC/g cuando se encuentra en establecimientos donde se vende al menudeo.

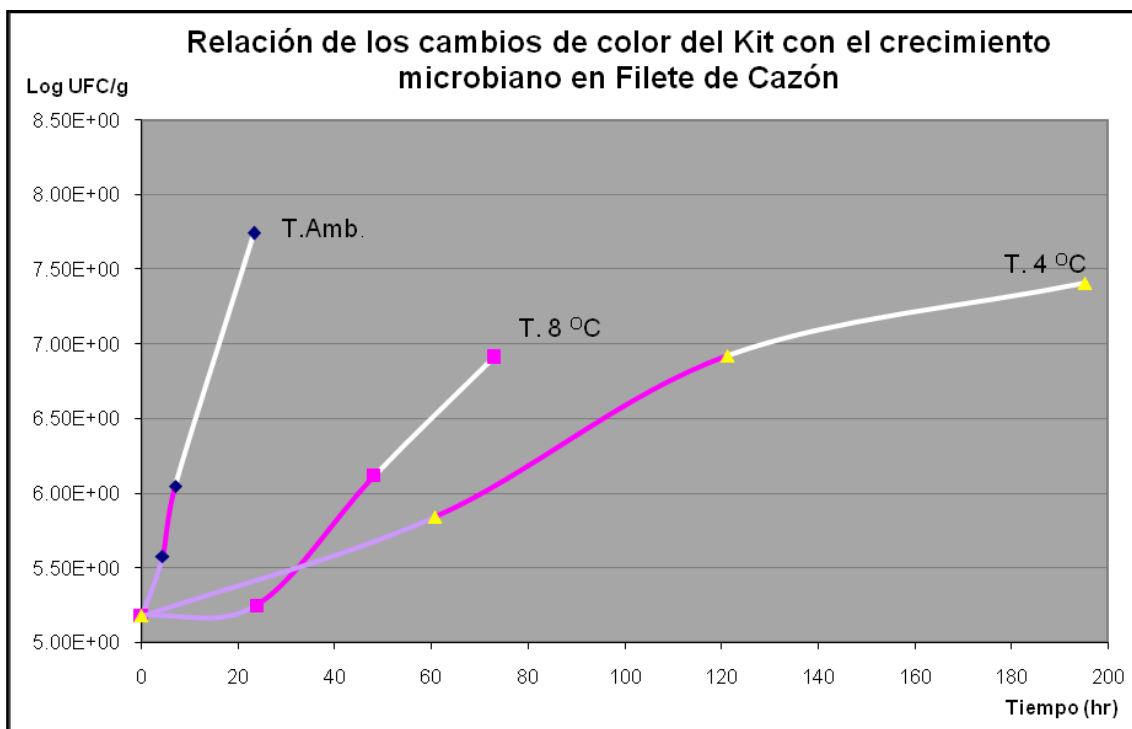


Figura 2. Crecimiento microbiano de cuenta total en Filete de Cazón monitoreado con el Kit de bacterias lácticas y resazurina a temperaturas de 4 °C, 8 °C y temperatura ambiente (20-22 °C).

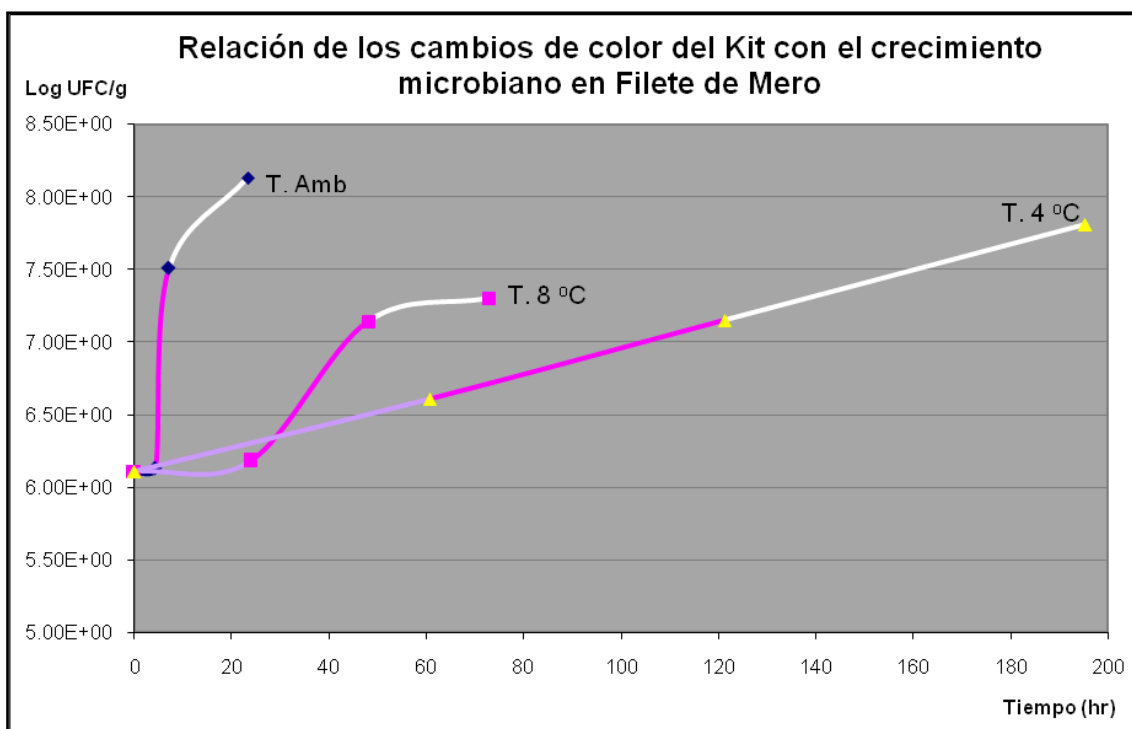


Figura 3. Crecimiento microbiano de cuenta total en Filete de Mero monitoreado con el Kit de bacterias lácticas y resazurina a temperaturas de 4 °C, 8 °C y temperatura ambiente (20-22 °C).

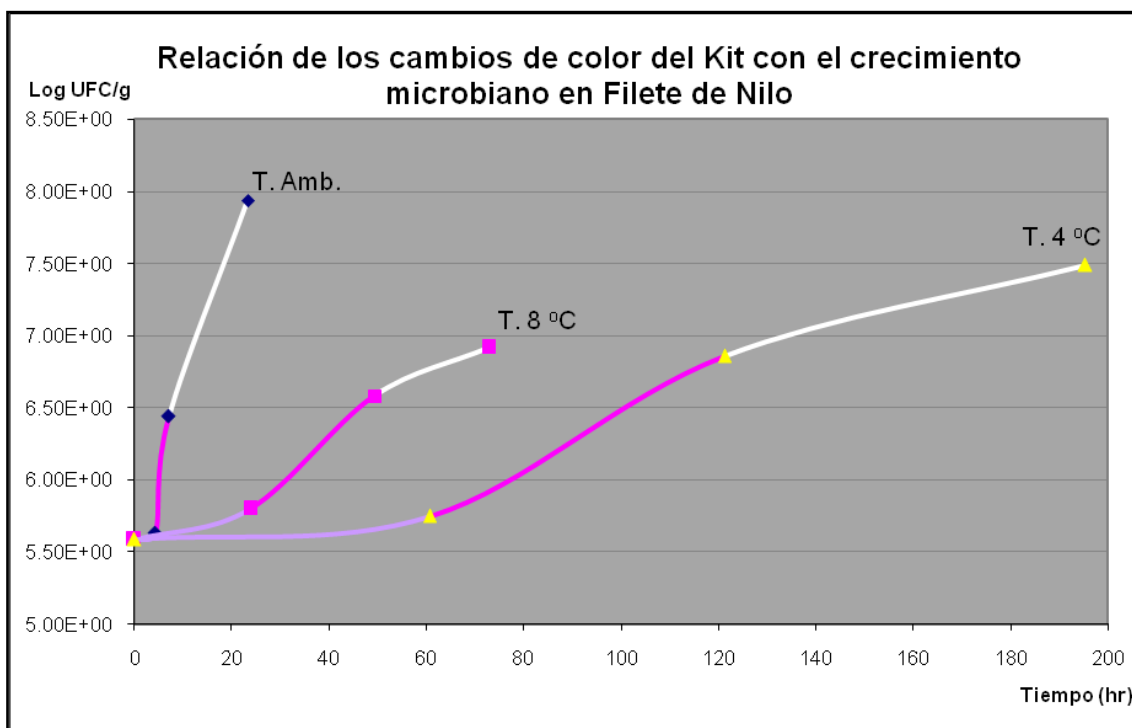


Figura 4. Crecimiento microbiano de cuenta total en Filete de Nilo monitoreado con el Kit de bacterias lácticas y resazurina a temperaturas de 4 °C, 8 °C y temperatura ambiente (20-22 °C).

### 5.2.2 Análisis de carne de res, cerdo y pollo.

Como se observa en las figuras 5 y 6 que muestran el crecimiento microbiano tanto en carne de res como en carne de cerdo con respecto a los cambios de color del kit, cuando éste tiene coloración azul, la cuenta bacteriana es de  $1.6 \times 10^5$  UFC/g lo cual indica que es apto para consumo, sin embargo esta cuenta aumenta con el paso del tiempo y dependiendo de la temperatura a la que se conserve el producto, ya que si se mantiene a temperatura ambiente, el kit tarda 4 horas para cambiar a color violeta y se observa que la cuenta bacteriana es alrededor de  $10^6$  UFC/g que debido al tratamiento térmico que se da al producto puede ser consumido, esta carga microbiana se alcanza a las 25 y 73 horas (3 días) si se conserva el producto a 8 °C y 4 °C; sin embargo después de 8 horas de ser expuesto el alimento junto el kit a

temperatura ambiente se presenta un color rosa indicando que en la carne se está iniciando un proceso de descomposición, pues la cantidad de microorganismos para la carne de res es de  $7.2 \times 10^6$  UFC/g y para la carne de cerdo es de  $10^7$  UFC/g, cuentas bacterianas similares se alcanzan cuando el alimento es almacenado a  $8^\circ\text{C}$  y  $4^\circ\text{C}$  después de 52 y 130 horas (5.4 días) respectivamente. Finalmente cuando el kit tiene color blanco, la carne está en descomposición, pues sus características organolépticas son color verdoso, olor pútrido y textura blanda, en ese momento hay cuentas microbianas del orden de  $10^8$  UFC/g, el tiempo que tarda en alcanzar dichas cuentas es de 24 horas a temperatura ambiente, 75 horas a  $8^\circ\text{C}$  y 196 horas (8 días) a  $4^\circ\text{C}$ . Estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura donde se menciona que cuando la carne es almacenada aeróbicamente en refrigeración, la microflora que predomina es la Gram negativa, no formadora de esporas que causa putrefacción en el producto detectado por los malos olores y se presenta cuando la carga microbiana es de  $10^7$  a  $10^8$  UFC/g, tal es el caso de *Pseudomonas spp*, bacteria psicrótrofa que ha sido identificada como el microorganismo predominante y responsable del deterioro de la carne es almacenada bajo estas condiciones (Michael, 1994). Además se han realizado estudios donde encuentran que la carga microbiana total de un alimento refrigerado está dada principalmente por *Pseudomonas spp* (Domínguez, 2007).

En el caso de la carne de res y cerdo, se observa que alcanzan las cuentas bacterianas finales más altas con respecto a los demás alimentos analizados debido a la forma en que se obtiene el producto ya que es en el manejo post-mortem donde se presentan varios puntos críticos en los cuales la fuente de contaminación microbiológica es muy elevada. Además se debe recordar que la mayoría de la flora bacteriana de este tipo de carne es psicrótrofa, por lo que aún a temperaturas de refrigeración ( $4^\circ\text{C}$  y  $8^\circ\text{C}$ ) alcanzan la mayor carga



microbiana final, pues las bacterias se encuentran a su temperatura óptima de crecimiento

Por otra parte, haciendo la comparación entre la carne de res y la de cerdo se observa que en ésta última la cantidad de microorganismos es mayor en cada uno de los puntos analizados a las diferentes temperaturas debido a que este animal tiene cerdas en su piel, en las cuales si no se realiza perfectamente el escaldado en el manejo post- mortem representa una fuente de contaminación más que en la carne de res, lo cual se refleja en una cuenta bacteriana inicial mayor y por consiguiente en los demás puntos del análisis.

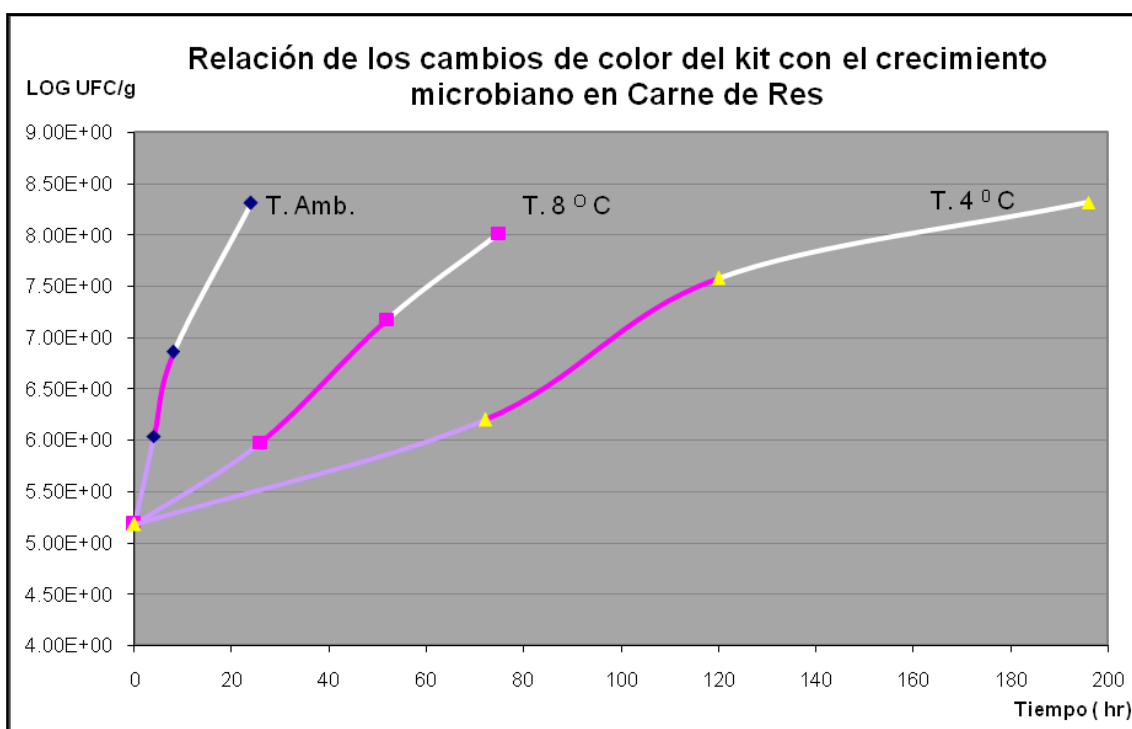


Figura 5. Crecimiento microbiano de cuenta total en carne de res monitoreado con el Kit de bacterias lácticas y resazurina a temperaturas de 4 °C, 8 °C y temperatura ambiente (20-22 °C).

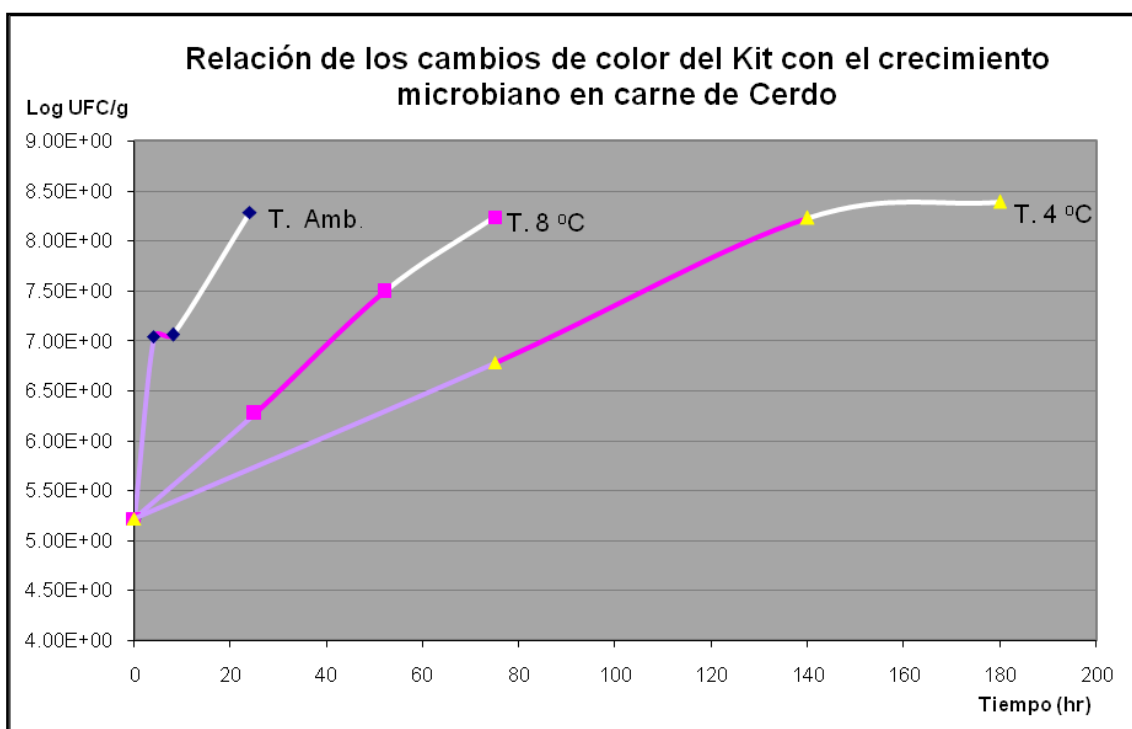


Figura 6. Crecimiento microbiano de cuenta total en carne de cerdo monitoreado con el Kit de bacterias lácticas y resazurina a temperaturas de 4 °C, 8 °C y temperatura ambiente (20-22 °C).

Respecto a la carne pollo se observa en la figura 7 para pechuga de pollo y en la figura 8 para pierna y muslo de pollo, es la que presenta la menor carga microbiana independientemente del tipo de pieza que se trate (pechuga o pierna y muslo) en cada uno de los cambios de color que tiene el kit a las diferentes temperaturas analizadas en comparación con los demás tipos de carne debido a que este producto se compró recién sacrificado el animal. Cuando el kit tiene color azul, la cuenta microbiana es de  $1.2 \times 10^4$  UFC/g, lo que indica que el producto puede ser consumido, cuando el kit cambia a color violeta el alimento tiene una cantidad de microorganismos alrededor de  $6.5 \times 10^5$  UFC/g misma que no causa daño al consumidor, teniendo así una vida de anaquel de 5, 25 y 75 horas si se conserva a temperatura ambiente,  $8^{\circ}\text{C}$  y  $4^{\circ}\text{C}$  respectivamente. Sin embargo, cuando el kit tiene color rosa, la carga microbiana en el pollo es aproximadamente de  $10^7$  UFC/g lo cual indica que el alimento comienza su proceso de descomposición por lo que ya no se recomienda que se consuma, el tiempo que tarda en cambiar a esta coloración es de 9, 52 y 140 horas (5.8 días) almacenado a temperatura ambiente,  $8^{\circ}\text{C}$  y  $4^{\circ}\text{C}$  respectivamente, por último, si el kit tiene color blanco después de 24 horas a temperatura ambiente, 75 horas (3 días) a  $8^{\circ}\text{C}$  y 196 horas (8 días) a  $4^{\circ}\text{C}$ , el alimento está en franca descomposición con una cuenta bacteriana alrededor de  $8 \times 10^8$  UFC/g por lo que no debe consumirse.

Estos datos concuerdan con los estudios realizados por el Departamento de Agricultura de Estados donde analizan las cuentas bacterianas en carne de pollo a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los resultados que encuentran es que partiendo de una carga microbiana inicial (cuenta total) alrededor de  $4.6 \times 10^4$  UFC/g, después de 7 días hay un aumento de 2 logaritmos respecto a dicha concentración (Bailey, 2000).

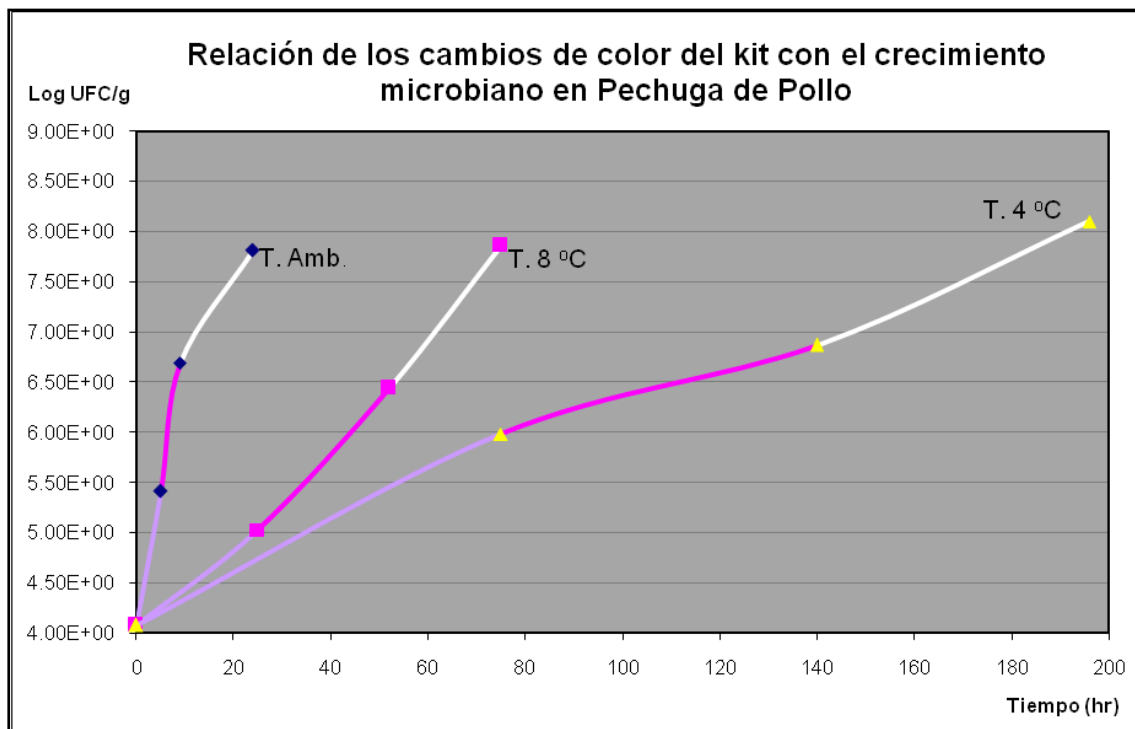


Figura 7. Crecimiento microbiano de cuenta total en pechuga de pollo monitoreado con el Kit de bacterias lácticas y resazurina a temperaturas de 4 °C, 8 °C y temperatura ambiente (20-22 °C).

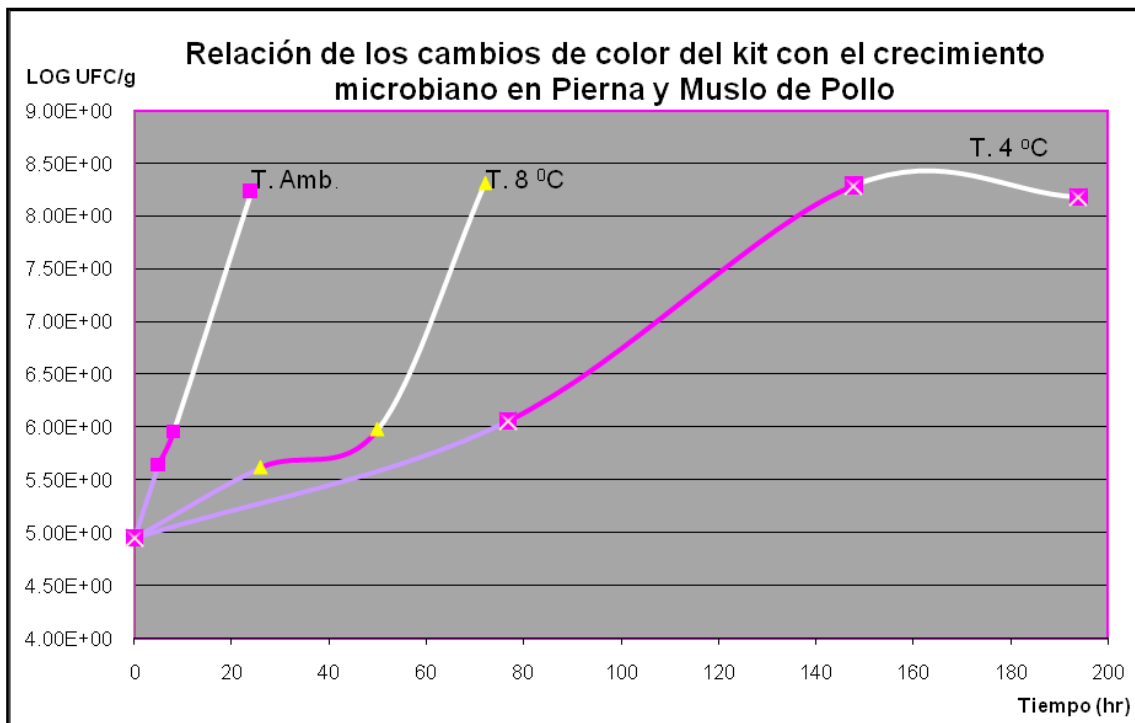


Fig 8. Crecimiento microbiano de cuenta total en pierna y muslo de pollo monitoreado con el Kit de bacterias lácticas y resazurina a temperatura 4 °C, 8 °C y temperatura ambiente (20-22 °C).

### **5.2.3. Análisis de leche.**

Como se observa en los resultados para la leche, éste es el alimento que tiene la menor carga microbiana inicial que los demás alimentos analizados debido a que se trata de un alimento que ha sufrido un tratamiento térmico (pasteurización) para disminuir la carga microbiana ya que este producto es de consumo inmediato donde generalmente el consumidor no aplica algún otro tratamiento más para reducir la cantidad de microorganismos o bien para ser agradable al paladar, contrario a lo que sucede con la carne donde se lleva a cabo la cocción misma que reduce la cuenta bacteriana que a altas concentraciones puede causar daños al consumidor o deteriorar el alimento.

Sin embargo se observa en las figuras 9,10 y 11 para las diferentes marcas de leche, presentan el mismo comportamiento que los demás alimentos, pues cuando el kit tiene color azul el alimento tiene una carga microbiana alrededor de 500 UFC/ml por lo que puede ser consumida sin necesidad de aplicar ningún tratamiento térmico, cuando el kit cambia a color violeta después de ser mantenido a temperatura ambiente durante 4 horas, 8 °C por 25 horas y 4 °C por 72 horas (3 días), la leche tiene una cantidad de microorganismos aproximadamente de  $3 \times 10^3$  UFC/ml por lo que se puede consumir. Cuando el kit tiene un color rosa, el alimento presenta una carga microbiana de  $6.5 \times 10^4$  UFC/ml indicando que está ligeramente contaminada, esta cuenta bacteriana la alcanza después de ser almacenada durante 8 horas a temperatura ambiente, 52 horas a 8 °C y 120 horas (5 días) a 4 °C, finalmente el kit cambia de color a blanco antes de 24, 75 y 196 horas a temperatura ambiente, 8 °C y 4 °C respectivamente y la leche tiene una cantidad de microorganismos alrededor de  $7 \times 10^7$  UFC/ml lo que indica que ya no debe consumirse, las características sensoriales que presenta son: color amarillento, olor pútrido, presencia de cuajos y sabor agrio, tal como se reporta en la literatura, donde se menciona que es debido al crecimiento principalmente de bacterias psicrótrofas que después de poblaciones mayores a  $10^6$  UFC/ml causan el deterioro de

la leche. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en la aplicación de la Patente 170279, UNAM (Pérez – Gavilán, 1993) donde se concluye que cuando el Kit para determinar calidad microbiológica de la leche fluida presenta colores azul o violeta el alimento es apto para consumo, en tanto que si el color del kit es rosa o blanco la leche ya no debe ser consumida. Asimismo, los resultados obtenidos con el kit de resazurina coinciden con los estudios realizados por Griffiths en 1987 y 1988 donde determinan que la vida de anaquel de leche pasteurizada conservada a temperaturas menores a 8 °C es de 6 días; además la cuenta bacteriana a la cual el consumidor rechaza el producto es de  $6 \times 10^7$  UFC/ml (Griffiths, 1988).

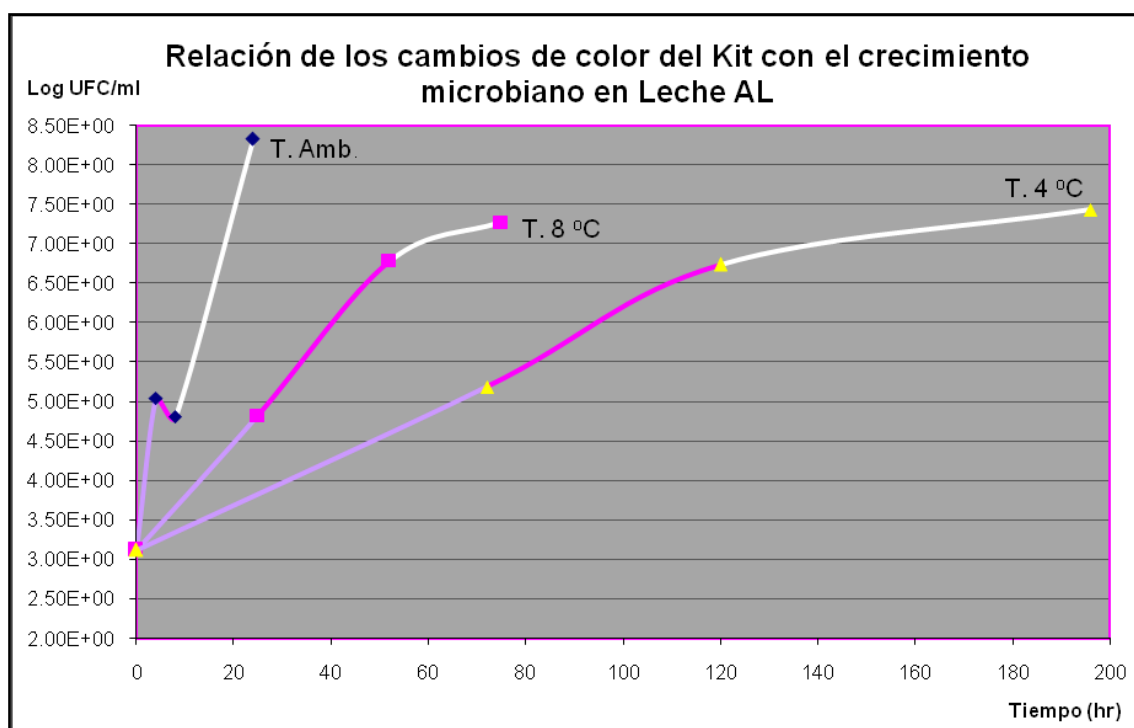


Figura 9. Crecimiento microbiano de cuenta total en leche AL monitoreado con el Kit de bacterias lácticas y resazurina a temperaturas de 4 °C, 8 °C y temperatura ambiente (20-22 °C).

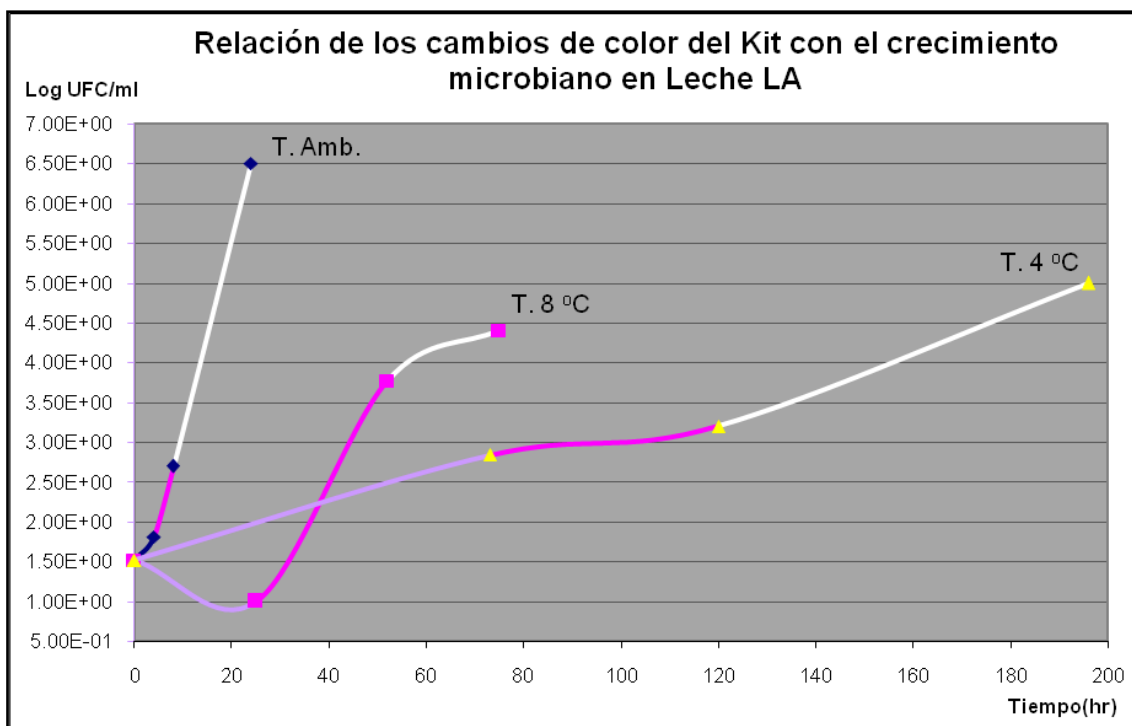


Figura 10. Crecimiento microbiano de cuenta total en leche LA monitoreado con el Kit de bacterias lácticas y resazurina a temperaturas de 4 °C, 8 °C y temperatura ambiente (20-22 °C).

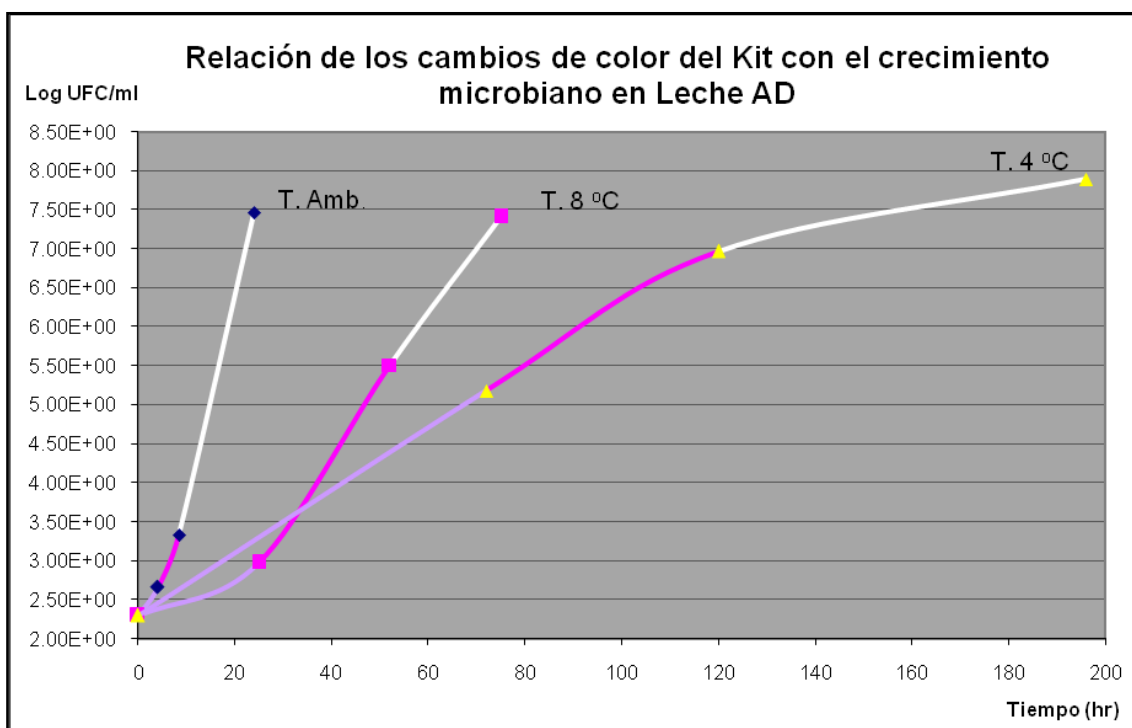


Figura 11. Crecimiento microbiano de cuenta total en leche AD monitoreado con el Kit de bacterias lácticas y resazurina a temperaturas de 4 °C, 8 °C y temperatura ambiente (20-22 °C).

### **5.3.1 Interpretación del Kit.**

Como se observa en los resultados el kit brinda una información completa de las condiciones en que se encuentra un alimento, pues al colocarlo en un producto en el que se quiera monitorear la cadena de frío indicará a través de sus cambios de color el tiempo aproximado al que ha sido manejado sin refrigeración manifestando con esto la calidad del alimento y confirmado a través de sus características sensoriales.

Cuando el kit tiene color azul o violeta el alimento presenta una carga microbiana alrededor de  $10^3$ - $10^5$  UFC/g misma que no representa un riesgo a la salud del consumidor. El tiempo de permanencia (vida de anaquel en el producto) de esta coloración en el kit a temperatura ambiente es de 4 horas, a  $8^{\circ}\text{C}$  es de 24 horas y a  $4^{\circ}\text{C}$  es de 75 horas (3 días). Si el producto permanece más tiempo expuesto a las diferentes temperaturas mencionadas, la carga microbiana se incrementa hasta el orden de  $10^6$ - $10^8$  UFC/g y se inicia el proceso de descomposición, en estos momentos el kit tiene un color rosa o blanco el cual tarda en cambiar de las 8 - 24 horas a temperatura ambiente, 48-72 horas (2-3 días) a  $8^{\circ}\text{C}$  y 75-96 horas (3-4 días) a  $4^{\circ}\text{C}$  a partir del tiempo en que se activó, por lo que se puede decir que este producto no debe consumirse.

### **5.3.2 Usos del Kit.**

Debido a la facilidad para interpretar el kit y a la información que brinda, éste puede ser utilizado por todos los involucrados en la cadena de frío: productores, transportistas, almacenistas, centros comerciales y sobre todo por el consumidor, para conocer la calidad de los alimentos.



En el caso de los productores, se sabe que en algunas ocasiones tienen grandes pérdidas por no mantener las condiciones de refrigeración de sus productos, a veces porque desconocen las fallas de sus equipos y en otras ocasiones porque el personal no tiene la cultura y/o equipo para cuidar el manejo de los mismos y es en esos casos donde la cadena de frío se ve interrumpida sin saber en donde y en que momento ocurrió la desviación, es por ello que el uso de este kit puede ayudar a disminuir esas mermas ya que si se coloca una vez que ha salido el alimento de la planta de producción y se mantiene en todo el trayecto se puede conocer el momento en que se interrumpió la cadena de frío, si es que esto ocurrió, o bien si se le ha dado buen manejo y con ello garantizar la calidad del producto rastreado.

Sin embargo es el consumidor quien debe asegurarse que los alimentos que ingiere no le van a causar daño, y la manera de hacerlo es utilizando el kit que puede colocarse en el momento de la compra, partiendo del principio de que ese producto es inocuo; además es un indicador que le dice si le ha dado buen manejo al alimento a partir de que lo compró porque de igual manera que los productores permite rastrear las condiciones de almacenamiento que se han dado al producto e incluso informa si el refrigerador doméstico está funcionando en perfectas condiciones. Al mismo tiempo le indica al consumidor la vida de anaquel del alimento dependiendo del tiempo y temperatura a la que lo haya almacenado así como la calidad microbiológica, lo cual le ayuda a decidir si ingiere el alimento o no sin dudar de los riesgos a la salud que pueda tener.

### **5.3.3 Comparación con otros métodos para monitorear la cadena de frío de los alimentos.**

Con respecto a otras investigaciones desarrolladas a nivel internacional, se sabe que Koutsumanis , un científico europeo que ha trabajado durante 15 años aproximadamente en elaborar prototipos para monitorear la cadena de

frío de los alimentos y del que se tienen las mayores referencias en este tema, aún no cuenta con un método que le permita producir un equipo de manera comercial para dar seguimiento a los productos refrigerados, pues el último de los prototipos que desarrolló fue publicado en Junio de 2008 el cual consiste en un recipiente con una solución líquida que contiene un indicador colorimétrico y una cepa bacteriana pura que genere los cambios de color y así comparar los tiempos que tardan en darse dichos cambios con los tiempos que tardan en deteriorarse los alimentos; sin embargo para que el dispositivo funcione requiere ajustarse el nivel de inóculo de la cepa dependiendo de la temperatura a la que se analizará el alimento para que coincida el cambio de color del prototipo en su punto final con el tiempo en que se deteriora el producto. Para validar la certeza de este prototipo, emplea modelos matemáticos para estimar la vida de anaquel del alimento en estudio. Incluso, en el mismo artículo publicado en Junio de 2008 se hace mención de que no es un indicador de Tiempo –Temperatura (TTI) comercial sino solo un prototipo y sugiere las características que debe tener dicho dispositivo para que se pueda comercializar como un TTI, tales como fácilmente activable, y que resista el manejo que se le dé una vez colocado en el alimento (Vaikousi, 2008).

Si se compara este prototipo con el elaborado en el laboratorio del Dr. Pérez – Gavilán se observa que éste último presenta varias ventajas contra el anterior, pues el kit de resazurina al estar en forma seca permite darle una vida de anaquel amplia (6 semanas aproximadamente a temperatura de refrigeración) y por consiguiente puede comercializarse, sin necesidad de emplear modelos matemáticos para validar su precisión y sin tener que ajustar la cantidad de inóculo de las células viables para generar los cambios de color en el momento adecuado, pues los cambios microbiológicos que ocurren en los alimentos son simultáneos a los cambios que se generan en el kit como consecuencia del metabolismo bacteriano que ocurre en éste.

Por otra parte, ya existen en el mercado productos patentados que ayudan a monitorear la cadena de frío en los alimentos, sin embargo el concepto de estos equipos están dirigidos al mercado de las vacunas o medicinas. Por ejemplo, Monitor Mark de 3M es un indicador que simula el funcionamiento de un termómetro el cual genera un cambio de color cuando se ha sobrepasado la temperatura de refrigeración, sin embargo no informa a cerca de la calidad del alimento, contrario a lo que si ocurre con el kit de resazurina el cual indica si se ha interrumpido la cadena de frío, por cuanto tiempo ocurrió esta desviación dependiendo de la temperatura de almacenamiento, y lo más importante si el producto es apto para su consumo como consecuencia del desarrollo microbiano.

Orto ejemplo se encuentra en TRACEO de cryolog (Francia), que al igual que el kit de resazurina emplea microorganismos para simular el deterioro de los alimentos; sin embargo este utiliza un código de barras que impide escanear el producto que se va a comprar cuando éste ya no debe consumirse. La ventaja que presenta el kit desarrollado en el laboratorio del Dr. Pérez-Gavilán con respecto a TRACEO es que no requiere de otro sistema electrónico para su funcionamiento por lo que lo hace competitivo en precio en el mercado y de esta manera puede aplicarse a todo tipo de productos perecederos en cantidades industriales.

Por otra parte, el kit hecho a base de bacterias lácticas y resazurina es un indicador de historia completa de tiempo y temperatura, pues no se requiere alcanzar ninguna temperatura específica (temperatura de umbral) para que pueda funcionar, tales como Monitor Mark de 3M, ya que debido a la originalidad en su elaboración los cambios se producen bajo las mismas condiciones en que se llevan a cabo en los alimentos, contrario a lo que ocurre con otros indicadores de tiempo temperatura comerciales como Check Point de Vitsab y Fresh Check, en los que su funcionamiento está basado en otras características, por ejemplo descenso de pH o polimerización de algunos compuestos, sucesos que no necesariamente ocurren en los alimentos y por

ello el margen de error que presentan no les permite elaborar un TTI general para los diferentes alimentos sino ajustar el indicador dependiendo del alimento que se requiere monitorear la cadena de frío, tal es el caso de TRACEO, el cual hay indicadores exclusivos para productos lácteos, cárnicos, etc.

Finalmente, este kit cumple con todas las características que se les exige a los TTI's en el mercado para ser competitivos, ya que es fácil de usar, no requiere personal especializado para su interpretación, no necesita algún otro dispositivo para su funcionamiento como código de barras, equipos electrónicos, etc, lo cual elevaría su costo de producción y por tanto su precio de comercialización y como consecuencia no estaría disponible para todos los sectores de la población y por último tiene una amplia vida de anaquel garantizando su óptimo funcionamiento durante este periodo. Con las cualidades mencionadas anteriormente no solo lo hace competitivo en el mercado sino además supera las características de los demás indicadores ya patentados y que están a la venta en todo el mundo.

## **CONCLUSIONES**

- El kit permite decidir la aceptación o rechazo a través de sus cambios de color de un alimento perecedero con base en su calidad microbiológica.
- Con el uso del kit se puede monitorear la cadena de frío de los productos refrigerados.
- Si el kit tiene color azul o violeta, el alimento es apto para consumo, pues tiene una carga microbiana de  $10^3 - 10^5$  UFC/ g.
- La vida de anaquel del alimento cuando el kit tiene color azul o violeta es de 4 horas, 1 día ó 3 días si se almacena a temperatura ambiente (20-22°C), 8 °C o 4 °C respectivamente.
- Si el kit tiene color rosa o blanco el alimento no debe ser consumido, pues tiene una carga microbiana de  $10^6 - 10^8$  UFC/g.

---

---

**BIBLIOGRAFÍA**

Alais Charles,1970. Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. Compañía editorial continelas. S.A de C.V. México, pp. 195-197.

Bailey, J.S., Lyon, B.G. 2000. The microbiological profile of chilled and frozen chicken. Journal of Food Protection. 1228-1230.

Barbano, D.M., Ma, Y., Santos, V. 2006. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. American Dairy Science Association.89 E15-E19.

Cañas, O.A., Pérez, J.A. 2005. Bacterias patógenas más comunes en los productos cárnicos: características y métodos para su control. Carnetec. 40-50.

Castellano, P., Belfiore C. 2008. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. Meat Science 79:483-499

Chang, V.P., Mills, E.W. Cutter, C.N. 2003. Reduction of bacteria on pork associated with chilling method. 66:1019-1024.

Christoph, M. H., Viktoria, A. 2007. Impact of different storage factors on the survivability of *Campylobacter jejuni* in turkey meat. 49: 146-148.

Domínguez, A.S.,Donald, W.S. 2007. Development and validation of a mathematical modelo describe the growth the *Pseudomonas* spp. in raw poultry storage under aerobic conditions. International Journal of Food Microbiology. 120: 287-295.

Elmer, H. M. 1998. Extended shelf life refrigerated foods: microbiological quality and safety. The Institute of Foods Technologists. 52: 57-62.

Giannakourou, M.C., Koutsoumanis, K., Nychas, G.J.E., Taoukis, S. P. 2005. Field evaluation of the application of time temperature integrators for monitoring fish quality in the chill chain. *International Journal of Food Microbiology*. 102: 323-336.

Griffiths, M.W., Phillips, J.D. 1987. Effect of low-temperature storage on the bacteriological quality of raw milk. *Food Microbiology*. 4: 285-291.

Griffiths, M.W., Phillips, J.D. 1988. The effect of extended low-temperature storage of raw milk on the quality of pasteurized and UHT milk. *Food Microbiology*. 5:75-87.

Guerrero, I., Taylor, J. 1994. Meat surface decontamination using lactic acid from chemical and microbial sources. *Academic Press Limited*. 27: 201-207

Hernández, P.G. 1992. Estudio sobre la producción de iniciadores lácticos en cultivo mixto. Tesis maestría, UNAM, México.

Hernández, R.M. 2006. Evolución de los empaques inteligentes en la industria alimenticia. *AlimenPack*. 23-31.

James, S. J., James. C. 2002. Meat refrigeration. *CRC Press, Boca Raton, FL*. 347p.

Kietzman U. Et al. 1994. Inspección veterinaria de pescados. *Acribia, Zaragoza, España*.

Koutsoumanis, K., Takoukis, P.S., Nychas, G.J.E, 2005. Development of a Safety Monitoring and Assurance System for chilled food products. *International Journal of Food Microbiology* 100: 253-260.

Koutsoumanis, K.2001. Predictive modeling of the shelf life of fish under nonisothermal conditions. *Applied and Environmental Microbiology*.64 (4): 1821-1829.

Maidier, N.Begoña, A. 2008. Modelling spoilage of fresh turbot and evaluation of a time-temperature integrator (TTI) label under fluctuating temperature. *International Journal of Food Microbiology*.127:193-199.

Mallikarjuna, R.Y., Karunasagar, I., Karunasaga, I. 1990. Resazurin test for estimating bacteriological quality of fishes. *Fishes Research*. 9: 75-79

Michael E.S.1994. Potential for biological control of agents of foodborne disease. *Food Research International*. 27: 245-250.

Munsch, A.P., Alatasava, T. 2006. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiological Research*. 161: 334-346.

Pérez-Gavilán, E.J. 1993. Equipo para determinar la calidad microbiológica de la leche y procedimiento para emplearlo. Patente 170279, UNAM, México.

Phillips. D., Jordan, D. Morris, S. 2006. A national survey of the microbiology quality of beef carcasses and frozen boneless beef in Australia. 69: 1113-1117.

Reyes, G.R. 1988. Diseño de un kit de resazurina para el control microbiológico de la leche fluida. Tesis profesional. UNAM. México.

Robinson R.K. 1990. The microbiology of milk. *Dairy microbiology*. Elsevier applied Science. 301 p.

Tafolla, R.P. 2007. Uso de bacterias lácticas y resazurina para monitorear la cadena de frío de productos perecederos. Tesis Licenciatura, UNAM, México.

Takashi, K.,Toshihiro, Y. 2003. Colorimetric alamarBlue assay as bacterial concentration and spoilage index of marine foods. *Food control*.14: 455-461.



Tirado, J.P. D., Velásquez., G. J., Torres, J.A. 2006. Control de la cadena de frío para productos cárnicos refrigerados. *Industria Alimentaria*. 28:22-26.

Tirado, J. Paredes, D., Velásquez., G. J., Torres, J.A 2005. Crecimiento microbiano en productos cárnicos refrigerados. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5:66-76

Vaikousi, H., Biliadreis, G.C., Koutsoumanis., P. , 2008. Development of a microbial time/temperature indicator prototype for monitoring the microbiological quality of chilled foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 3242-3250

Cryolog. [www.cryolog.com](http://www.cryolog.com), Junio 2008.

3M. [www.3m.com](http://www.3m.com), Diciembre 2008.