

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
Incorporada a la U.N.A.M.

14
2ej

“VIABILIDAD Y CAPACIDAD PRODUCTORA DE
ENTEROTOXINA B DE S. aureus S-6 CON Y SIN
DAÑO SUB-LETAL EN QUESO FRESCO SOMETIDO
A DIFERENTES TEMPERATURAS DE
ALMACENAMIENTO”

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

ADRIANA HARO RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M. C. Consuelo S. O. Lobato Calleros

TESIS CON
VALIA DE ORIGEN

México, D. F.

1992



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 está 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.

INDICE GENERAL

<u>INDICE GENERAL</u>	1
<u>INDICE DE CUADROS</u>	6
<u>INDICE DE FIGURAS</u>	7
1. <u>INTRODUCCION</u>	8
1.1 <u>INTOXICACION ESTAFILOCOCCICA</u>	8
1.1.1 <u>Antecedentes históricos</u>	8
1.1.2 <u>Naturaleza de la enfermedad</u>	9
1.1.2.1 <u>Síntomas</u>	9
1.1.2.2 <u>Diagnóstico</u>	10
1.1.2.3 <u>Mecanismo de intoxicación</u>	10
1.1.2.4 <u>Inmunidad</u>	11
1.1.3 <u>Epidemiología</u>	11
1.1.3.1 <u>Incidencia</u>	11
1.1.3.2 <u>Alimentos involucrados en los brotes</u> ...	12
1.1.3.3 <u>Fuente del organismo presente en alimentos</u>	12
1.2 <u>CARACTERISTICAS DE <u>Staphylococcus aureus</u></u>	13
1.2.1 <u>Clasificación</u>	13
1.2.2 <u>Habitat</u>	13
1.2.3 <u>Morfología y fisiología</u>	13
1.2.4 <u>Características bioquímicas</u>	14
1.2.5 <u>Factores que influyen en el crecimiento</u>	14
1.2.5.1 <u>Temperatura</u>	14
1.2.5.2 <u>pH</u>	17
1.2.5.3 <u>Actividad de agua (aw)</u>	17
1.2.5.4 <u>Atmósfera</u>	17

1.2.5.5	Cloruro de sodio.....	17
1.2.6	Métodos de aislamiento y enumeración.....	17
1.2.7	Efectos del calor sobre las células.....	18
1.2.8	Factores que influyen en la resistencia al calor.....	19
1.2.8.1	Medio de suspensión.....	19
1.2.8.2	pH.....	20
1.2.8.3	Aw.....	20
1.3	ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS.....	21
1.3.1	Naturaleza.....	21
1.3.2	Estabilidad.....	21
1.3.3	Síntesis de enterotoxinas.....	23
1.3.4	Métodos de producción.....	24
1.3.5	Factores que intervienen en su producción.....	25
1.3.5.1	Temperatura.....	25
1.3.5.2	pH.....	25
1.3.5.3	Aw.....	25
1.3.5.4	Atmósfera.....	25
1.3.5.5	Cloruro de sodio.....	27
1.3.6	Detección.....	27
1.4	LECHE.....	30
1.4.1	Definición.....	30
1.4.2	Características fisicoquímicas.....	30
1.4.3	La leche como medio de cultivo.....	32
1.4.4	Flora microbiana de la leche.....	34
1.4.5	Situación actual de la industria lechera en México.....	36
1.4.6	Queso.....	38
1.4.7	Proceso de elaboración de queso fresco.....	38

1.4.7.1 Estandarización de la leche.....	38
1.4.7.2 Pasteurización.....	40
1.4.7.3 Coagulación de la leche.....	40
1.4.7.4 Corte de la cuajada y desuerado.....	41
1.4.7.5 Moldeado.....	43
1.4.7.6 Salado.....	43
1.5 JUSTIFICACION.....	44
2. <u>OBJETIVOS</u>	45
3. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	46
3.1 CEPA.....	46
3.2 CARACTERIZACION DE <u>S.aureus</u>	46
3.2.1 Observación microscópica.....	46
3.2.2 Morfología colonial.....	46
3.2.3 Catalasa.....	46
3.2.4 Coagulasa.....	46
3.2.5 Termonucleasa.....	47
3.2.6 Fermentación de azúcares.....	47
3.2.7 Movilidad.....	47
3.2.8 Licuefacción de gelatina.....	48
3.2.9 Reacción de Voges-Proskauer.....	48
3.2.10 Reducción de nitrato.....	48
3.3 METODO DE PRODUCCION DE ENTEROTOXINA B.....	48
3.4 IDENTIFICACION DE ENTEROTOXINA B POR INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE MODIFICADA.....	50
3.5 ADAPTACION DE <u>S.aureus</u> EN CALDO LACTOSADO.....	52
3.6 CURVA DE CRECIMIENTO.....	52
3.6.1 Cuenta viable para bacterias.....	52
3.6.2 Método espectrofotométrico.....	54

3.7	DANO TERMICO SUB-LETAL EN <u>S.aureus</u>	54
3.8	ESTANDARIZACION DEL INOCULO.....	56
3.9	ANALISIS MICROBIOLOGICO.....	56
3.9.1	Preparación de la muestra.....	56
3.9.2	Cuenta de mesófilos aerobios totales.....	57
3.9.3	Cuenta de coliformes totales.....	57
3.9.4	Aislamiento e identificación de <u>Salmonella</u>	57
3.9.5	Cuenta de <u>S.aureus</u>	57
3.10	ELABORACION DE LOS QUESOS.....	57
3.11	ANALISIS MICROBIOLOGICO POST-PROCESO.....	61
3.11.1	Análisis del suero.....	61
3.11.2	Análisis de los quesos.....	61
3.12	EXTRACCION DE ENTEROTOXINA.....	61
4.	<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	65
4.1	CARACTERIZACION DE LA CEPA.....	65
4.1.1	Morfología microscópica.....	65
4.1.2	Morfología colonial.....	65
4.1.3	Catalasa.....	65
4.1.4	Coagulasa.....	65
4.1.5	Termonucleasa.....	67
4.1.6	Fermentación de azúcares.....	67
4.1.7	Movilidad.....	68
4.1.8	Licuefacción de gelatina.....	68
4.1.9	Reacción de Voges-Proskauer.....	68
4.1.10	Reducción de nitrato.....	68
4.2	PRODUCCION DE ENTEROTOXINA B.....	68
4.3	IDENTIFICACION DE ENTEROTOXINA B.....	70
4.4	ADAPTACION DE <u>S.aureus</u> EN CALDO LACTOSADO.....	71

4.5 CURVA DE CRECIMIENTO.....	71
4.5.1 Fase de retardo o lag.....	73
4.5.2 Fase logarítmica o exponencial.....	73
4.5.3 Fase estacionaria.....	73
4.5.4 Fase de declinación o muerte.....	73
4.6 TRATAMIENTO TERMICO.....	74
4.7 ESTANDARIZACION DEL INOCULO.....	79
4.8 ANALISIS MICROBIOLOGICO DE LA LECHE EN POLVO.....	80
4.9 TRATAMIENTOS EN LOS QUESOS ELABORADOS.....	80
4.10 DESARROLLO MICROBIOLOGICO EN LOS QUESOS	82
4.11 APARIENCIA DE LOS QUESOS DURANTE SU ALMACENAMIENTO..	93
4.12 EXTRACCION E IDENTIFICACION DE ENTEROTOXINA B.....	95
5. <u>CONCLUSIONES</u>	98
6. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	99

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Características bioquímicas de <u>S.aureus</u>	15
Cuadro 2.	Factores que influyen en el crecimiento de <u>S.aureus</u>	16
Cuadro 3.	Características fisicoquímicas de las enterotoxinas estafilocócicas.....	22
Cuadro 4.	Factores que intervienen en la producción de enterotoxinas.....	26
Cuadro 5.	Características fisicoquímicas de la leche de vaca.....	31
Cuadro 6.	Composición química media de un litro de leche de vaca.....	33
Cuadro 7.	Tipos bioquímicos de microorganismos en la leche.....	35
Cuadro 8.	Producción nacional de leche de vaca.....	37
Cuadro 9.	Necesidades estimadas de leche fluida.....	37
Cuadro 10.	Volumen de importación de leche en polvo.....	37
Cuadro 11.	Tiempos de incubación empleados en el método de cuenta viable para bacterias.....	53
Cuadro 12.	Formulación del queso fresco.....	58
Cuadro 13.	Morfología colonial de <u>S.aureus</u> S-6.....	66
Cuadro 14.	Características bioquímicas de <u>S.aureus</u> S-6.....	69
Cuadro 15.	Resultados del tratamiento térmico a 72 °C.....	75
Cuadro 16.	Características de los diferentes tratamientos... ..	81
Cuadro 17.	Crecimiento de <u>S.aureus</u> y mesófilos aerobios en los quesos almacenados a 3 - 4 °C.....	84
Cuadro 18.	Crecimiento de <u>S.aureus</u> y mesófilos aerobios en los quesos almacenados a 20 - 22 °C.....	85
Cuadro 19.	Crecimiento de <u>S.aureus</u> y mesófilos aerobios en los quesos almacenados a 37 °C.....	86
Cuadro 20.	Apariencia física de los quesos durante su almacenamiento.....	94
Cuadro 21.	Detección de enterotoxina B en los diferentes tratamientos a las dos semanas de almacenamiento.....	97

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Proceso de obtención de queso fresco.....	39
Figura 2.	Transformaciones en relación a la presencia de ácido láctico.....	42
Figura 3.	Método de celofán sobre agar.....	49
Figura 4.	Método de inmunodifusión radial simple modificado	51
Figura 5.	Método del tubo capilar.....	55
Figura 6.	Proceso de elaboración de queso fresco.....	60
Figura 7.	Método de extracción de enterotoxina de alimentos	62
Figura 8.	Curva de crecimiento.....	72
Figura 9.	Porcentaje de destrucción durante el tratamiento térmico a 72 °C.....	76
Figura 10.	Porcentaje de células viables durante el tratamiento térmico a 72 °C.....	77
Figura 11.	Porcentaje de daño sub-letal durante el tratamiento térmico a 72 °C.....	78
Figura 12.	Crecimiento de <u>S.aureus</u> sin tratamiento térmico a las diferentes temperaturas de almacenamiento..	87
Figura 13.	Crecimiento de <u>S.aureus</u> con 20 s. de trat. term. a las diferentes temperaturas de almacenamiento..	88
Figura 14.	Crecimiento de <u>S.aureus</u> con 30 s. de trat. term. a las diferentes temperaturas de almacenamiento..	89
Figura 15.	Crecimiento de <u>S.aureus</u> a temperatura de 3-4 °C.	90
Figura 16.	Crecimiento de <u>S.aureus</u> a temperatura de 20-22°C	91
Figura 17.	Crecimiento de <u>S.aureus</u> a temperatura de 37 °C..	92

1. INTRODUCCION

1.1 INTOXICACION ESTAFILOCOCCICA.

Este tipo de intoxicación se encuentra entre las enfermedades de origen alimentario más comunes en México y en el mundo; es causada por la ingestión de alimentos que contienen toxinas producidas por ciertas cepas de Staphylococcus (18). Sus síntomas son los característicos de una intoxicación alimentaria gastrointestinal, se presentan en pocas horas, con duración relativamente corta y sin efectos secundarios posteriores. Debido a lo anterior, los médicos son raramente consultados, lo que ocasiona que no existan cifras reales reportadas en relación a su incidencia (37) (52).

1.1.1 Antecedentes históricos.

El interés en el estudio de las intoxicaciones surgió a principios del siglo pasado; sin embargo hasta 1880, Koch y Pasteur observaron al microorganismo causante. Ogston le otorgó el nombre de "Staphylococcus" debido a su agrupación semejante a racimos de uvas. En 1884, Rosenbach obtuvo el primer cultivo puro en medio sólido. Owen en 1907, demostró que el organismo implicado en este tipo de intoxicación alimentaria era específicamente el Staphylococcus aureus. Barber en 1914, fue el primer investigador que relacionó esta intoxicación con sustancias exógenas producidas por el microorganismo. Este reporte no fue reconocido y durante muchos años la enfermedad fue atribuida a otros agentes microbianos. Hacia 1930, numerosos investigadores como Dack, estudiaron la enfermedad asociándola directamente con S.aureus y sus toxinas presentes en alimentos

que son consumidos despues de transcurridas varias horas de su preparacion. Desde 1948 hasta la fecha, se han realizado estudios para conocer de manera mas especifica las características y comportamiento de S.aureus y sus enterotoxinas. Entre los investigadores que mayor información han reportado sobre este tema, se encuentran: Casman, Surgalla, Bennet y Bergdoll (37).

1.1.2 Naturaleza de la enfermedad.

1.1.2.1 Sintomas.- Se presentan despues de la ingestión del alimento que contiene enterotoxina, en un periodo de incubación que varia de 30 minutos a 8 horas. La naturaleza y grado de los sintomas se determinan por la cantidad de toxina consumida y la sensibilidad del individuo a la misma (22) (23).

Los transtornos mas comunes son náuseas, vómito, calambres abdominales y diarrea. Aunque el vómito es el sintoma característico de esta intoxicación, se puede presentar en otras enfermedades de origen alimentario o no manifestarse en todos los casos de intoxicaciones estafilocócicas.

En los casos severos llegan a presentarse cefaleas, contracciones musculares, shock, anorexia, cianosis, salivación, malestar general, nauseas, sudor, deshidratacion, fiebre e hipotensión arterial. Esta última, en ocasiones persiste por algunos días provocando incapacidad en el enfermo para la realización de sus actividades normales (12).

En la mayoría de los casos, la recuperacion es rápida, de 1 a 3 días, por lo que rara vez se aplica tratamiento medico. La mortalidad es extremadamente baja, se llega a presentar en personas débiles o lactantes por un manejo inadecuado de la

intoxicación (37).

1.1.2.2 Diagnóstico.- Para identificar como agente etiológico al S.aureus en enfermedades de origen alimentario, sobre todo cuando involucran a más de una persona con síntomas de intoxicación, como son diarrea y vomito; se requiere conocer los alimentos consumidos en forma previa a la manifestación de los síntomas. De esta lista se descartan aquellos que por sus características no permiten el crecimiento del microorganismo, y de los restantes se eligen los comunmente involucrados en este tipo de enfermedad. A los alimentos sospechosos se les detecta la presencia de S.aureus; si existen cuentas elevadas, se puede inferir que se trata de una intoxicación estafilocócica. Existen pruebas bioquímicas como la coagulasa y termonucleasa, que son auxiliares en la identificación de cepas enterotoxigénicas de este microorganismo. Aunque la prueba definitiva para determinar la causa de la enfermedad es la identificación de la enterotoxina, la mayoría de las ocasiones no se cuenta con el alimento sospechoso en cantidad adecuada, de aproximadamente 100 g, o los reactivos apropiados para la realización del análisis, por lo que el dictamen se hace en forma general con base en la presencia de cepas presuntivamente enterotoxigénicas (16).

1.1.2.3 Mecanismo de intoxicación.- El modo de acción de las enterotoxinas no está enteramente comprendido, pero los principales síntomas suponen una acción sobre las vísceras abdominales. Estos compuestos muestran gran afinidad por las paredes del estómago e intestinos, produciendo enterocolitis (61).

1.1.2.4 Inmunidad.- La susceptibilidad a intoxicaciones estafilocócicas varía de un individuo a otro. Depende de diversos factores como son la cantidad de enterotoxina consumida, distribución de la misma en el alimento y exposiciones anteriores a estas sustancias. Debido a la duración de la enfermedad y a su frecuencia, no se adquiere inmunidad.

Se sabe que la dosis mínima de enterotoxina necesaria para producir síntomas es de 0.015 a 0.357 µg por kg de peso corporal (15) (52).

1.1.3 Epidemiología.

1.1.3.1 Incidencia.- La recurrencia de intoxicaciones estafilocócicas de origen alimentario, ha sido ampliamente estudiada en países desarrollados como Estados Unidos, a diferencia de otros en que comúnmente no se reportan o no se identifica el agente etiológico. En México, el Laboratorio Nacional de Salud Pública, realizó un estudio en el periodo comprendido entre 1980 y 1989, con el fin de conocer los agentes involucrados más comúnmente en brotes de tox infecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. Se realizó la revisión de su incidencia, estudiando 79 brotes, de los cuales se confirmaron 58 (73%). Estos se presentaron en reuniones (24.1%), escuelas o guarderías (10.3%), restaurantes (8.6%) y hospitales (8.6%). El principal microorganismo implicado fue S.aureus, que provocó el 48.2% de los incidentes. Los brotes estudiados constituyen solo una mínima parte de los que en realidad se presentan en nuestro país (30).

1.1.3.2 Alimentos involucrados en los brotes.- Muchos alimentos constituyen un excelente medio de cultivo para el crecimiento de S.aureus. En Mexico, los principales productos alimentarios involucrados en estos brotes son: quesos (29.3%), pasteles (15.5%), carnes (15.1%), leche (13.8%) y pescados o mariscos (7.0%) (30). Su almacenamiento a bajas temperaturas es importante en la inhibición del crecimiento del microorganismo, sin embargo, no siempre esta temperatura es la correcta o los tratamientos térmicos previos adecuados para su destrucción (8) (38).

Se ha observado que el crecimiento de S.aureus en alimentos, alcanza un nivel de 10^5 a 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo, en 4 a 8 horas de permanencia a temperatura ambiente. Esta cantidad de células es suficiente para producir la enterotoxina, en niveles que causan intoxicación (41) (43).

1.1.3.3 Fuente del organismo en alimentos.- Los brotes investigados, mencionados anteriormente, en su mayoría fueron originados por la contaminación de los alimentos a través del personal de la industria alimentaria, generalmente después de la cocción, aunque algunos son atribuidos a alimentos en estado crudo. En ambos casos, la proliferación es favorecida por la ausencia de refrigeración preventiva, la cual inhibe el crecimiento del microorganismo y producción de enterotoxina.

El equipo usado en la elaboración de productos alimentarios es otro factor importante a considerar en la determinación del origen del organismo contaminante (37).

Los animales son también fuente contaminante de S.aureus, siendo los bovinos los transmisores más importantes, ya que sufren infecciones mastíticas que ocasionan la contaminación de grandes volúmenes de leche. En la actualidad el uso de pasteurización y refrigeración de la leche ha ocasionado una disminución en la frecuencia de este fenómeno.

1.2 CARACTERISTICAS DE Staphylococcus aureus.

1.2.1 Clasificación .

Taxonomicamente el S.aureus pertenece a la familia Micrococcaceae. El genero Staphylococcus está dividido en varias especies: S.aureus, S.epidermidis, S.hyicus e S.intermedius, entre otros. Esta división se basa en la habilidad de los microorganismos para producir coagulasa, endonucleasa y fermentar manitol (8) (9).

1.2.2 Hábitat.

Varios informes consideran al S.aureus como ubicuo, debido a su presencia generalizada en la naturaleza: polvo, aire, ropa, suelo, agua, efluentes naturales e insectos. La fuente principal se sitúa en la nariz del hombre, aunque también se encuentra en la piel, manos, heridas infectadas, quemaduras, forúnculos, acné, descargas nasales y de garganta, así como en heces (14) (31).

1.2.3 Morfología y fisiología.

Los estafilococos son células esféricas de 0.8 a 1.0 μ de diámetro. Se presentan individualizadas, por pares o en pequeñas cadenas que se reparten en tres planos, formando racimos irregulares. Algunas cepas jóvenes pueden tener una capa de limo

o capsula; son inmóviles y no esporuladas. El S.aureus es aeróbico facultativo, pero crece mejor en presencia de oxígeno. En medios sólidos de agar, forma colonias opacas, lisas, convexas, de aspecto brillante y de color crema a amarillo anaranjado, por formación de pigmentos de lipocromo que dependen de la cepa y condiciones de crecimiento (68).

En forma aeróbica o anaeróbica el S.aureus produce ácido a partir del manitol, glucosa, lactosa y maltosa, entre otros azúcares y alcoholes polihídricos. Sintetiza, varias toxinas como toxina y enterotoxinas; endonucleasa termorresistente y coagulasa (14).

1.2.4 Características bioquímicas

En el cuadro 1, se muestran las principales características bioquímicas del S.aureus. Estas son de gran ayuda para su diferenciación. También se ha observado que existe correlación entre la enterotoxigenicidad de las cepas de esta especie y la producción de coagulasa y termonucleasa, aunque hay excepciones (10) (62).

1.2.5 Factores que influyen en el crecimiento.

Existen numerosos factores que modifican el crecimiento del microorganismo (cuadro 2).

1.2.5.1 Temperatura.- El rango de temperatura óptimo para el crecimiento de S.aureus es de 35 a 37 °C. no obstante, el microorganismo es capaz de adaptarse a temperaturas de 10 a 45 °C; ocasionalmente algunas cepas pueden crecer incluso por debajo o arriba de estos valores (5) (95).

Cuadro 1. Características bioquímicas del S.aureus

PRUEBA	RESPUESTA
Catalasa	+
Coagulasa	+
Termonucleasa	+
Fermentación de manitol	+
Fermentación de lactosa	+
Fermentación de sacarosa	+
Fermentación de glucosa	+
Movilidad	-
Licuefacción de gelatina	+
Reacción de Voges-Proskauer	+
Reducción de nitrato	+

+ prueba positiva

- prueba negativa

Fuente: Mac Faddin, J.F. (1984)

cuadro 2. Factores que influyen en el crecimiento de S.aureus

FACTOR	VALORES		
	MINIMOS	OPTIMOS	MAXIMOS
Aw	0.83-0.86	0.99-1.0	0.99-1.0
pH	4.0	6.5-7.5	9.8
Temperatura (°C)	6.5	30-37	45-47.8
NaCl (‰)	0	0	18

Fuente: Bergdoll, M. S. (1972)

1.2.5.2 pH.- La mayoría de las cepas de S.aureus se desarrollan entre valores de pH de 4.5 a 9.3, con un óptimo de 7.0 a 7.5. El pH de crecimiento depende del tipo de medio, la concentración de cloruro de sodio (hasta 18%), el tamaño del inóculo y la atmósfera (40) (85).

1.2.5.3 Actividad de agua (aw).- Otro de los factores importantes en el crecimiento del microorganismo es la aw. En numerosas cepas se ha reportado crecimiento a niveles tan bajos como 0.83, aunque el óptimo se encuentra en un rango de 0.99 a 1.0 (30) (96).

1.2.5.4 Atmósfera.- La tasa de crecimiento del S.aureus en condiciones anaeróbicas es mas baja que en presencia de oxígeno y depende de los factores antes mencionados (24).

1.2.5.5 Cloruro de sodio.- El crecimiento del organismo es inversamente proporcional a la concentración de NaCl en el medio de suspensión, aunque es capaz de crecer en presencia de hasta 18% (14) (40) (68).

1.2.6 Métodos de aislamiento y enumeración.

Para recobrar al microorganismo de una gran variedad de alimentos, se utilizan medios de enriquecimiento y selectivos que permiten el crecimiento de S.aureus e impiden el desarrollo de otros microorganismos. El principal problema se presenta cuando es necesario recuperar células dañadas (71).

El método recomendado por la FDA (1976) y AOAC (46.036-46.040) para el aislamiento de S.aureus es el de Baird-Parker (BP). Contiene telurito de potasio como agente selectivo y yema

de huevo como agente diferencial. Puede ser empleado para la recuperación de microorganismos dañados (40). El estafilococo crece a altas concentraciones de sal (18%), por lo que antes de identificarlo se realiza un cultivo de enriquecimiento con agar soya tripticaseína (AST) con 10% de cloruro de sodio; se presenta el inconveniente de que los microorganismos dañados no crecen en presencia de un alto contenido de esta sal (101).

El organismo sembrado en BP, se incuba de 45 a 48 horas, a 35 o 37 °C. Las colonias típicas de S.aureus: circulares, lisas, convexas, húmedas, de color gris a negro azabache, de 2 a 3 mm de diámetro, a menudo con una aureola externa blanca por la reducción de telurito y un halo de opaco a claro por la acción sobre la yema; son contadas y seleccionadas para la realización de las pruebas de coagulasa y termonucleasa (7) (10) (71) (83).

Para la cuenta de células dañadas, se aprovecha su incapacidad de crecer en presencia de NaCl, su número se obtiene de la diferencia entre las que crecen en AST con 7% de NaCl (organismos sin daño) y AST sin NaCl (organismos totales) (44).

1.2.7 Efectos del calor sobre las células

El tratamiento térmico es el método más común para destruir organismos. Cuando la aplicación del calor es insuficiente, el microorganismo es sólo inactivado, sufre lo que se conoce como daño sub-letal, que le impide a la célula reproducirse en condiciones normales (44). El efecto depende de su termorresistencia.

En las células microbianas, el calor produce la desnaturalización o coagulación de las proteínas implicadas en la

multiplicación y respiración, ruptura de enlaces en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN), y daños en membrana citoplasmática (82).

El deterioro de la membrana celular y la presión osmótica interna, producen la ruptura de la membrana en los puntos débiles, facilitando la fuga del material citoplasmático (11) (45) (46) (49).

En el caso de que ocurra daño sub-letal, únicamente se afecta en forma ligera la membrana, el ARN y el resto de la célula. Se ha reportado que los microorganismos dañados, en un medio de cultivo adecuado que contenga una fuente de aminoácidos, glucosa y sales, reparan sus defectos y se reactivan después de un tiempo. No existen estudios que reporten el mecanismo que sigue la reactivación de células dañadas de S.aureus en alimentos procesados (26) (86).

1.2.8 Factores que influyen en la resistencia al calor

La resistencia al calor de los microorganismos depende del tiempo y temperatura del tratamiento térmico, cepa, condiciones de crecimiento, edad del cultivo, medio de suspensión y método de recuento de células dañadas (48) (81) (87).

1.2.8.1 Medio de suspensión.- Los componentes así como las características fisicoquímicas del medio en que se encuentren suspendidos los microorganismos; ya sea una solución reguladora, medio de cultivo o alimento, influyen directamente en su resistencia ante el calor. Cuanto más rico en nutrientes sea el medio, mayor será la protección sobre las células (37).

Los azúcares contenidos en el medio, aumentan la resistencia térmica de las células. Este efecto se debe principalmente a la disminución de la aw, tanto del medio como intracelular.

Se ha reportado que la sacarosa es el carbonhidrato que provoca una mayor resistencia de las células al calor, en comparación con otros carbonhidratos simples (28). Los complejos como el almidón y la pectina, dan protección a los microorganismos y mayor estabilidad ante tratamientos térmicos (11) (50).

Las células suspendidas en grasas, aceites, o medios con alto contenido de ácidos grasos, son difícilmente destruidas, a diferencia de las suspendidas en medio acuoso, debido a la escasa conductividad térmica de los lípidos (11) (50) (92).

Se ha demostrado que los ácidos grasos de cadena larga son más efectivos que los de cadena corta en la protección contra daño térmico (11).

1.2.8.2 pH.- Los estafilococos resisten mejor el calor en un pH próximo a 7.0, a medida que el pH se aleja de este valor, las células se hacen más sensibles al tratamiento, debido a la pérdida en estabilidad de las proteínas celulares. Por ello, un alimento muy ácido requerirá de un período más corto de tratamiento térmico o menor temperatura, para la destrucción de los microorganismos presentes (50).

1.2.8.3 Aw.- Conforme se reduce el contenido de humedad del medio de suspensión, la resistencia de los microorganismos disminuye (36) (96).

La forma exacta en que la humedad facilita la desnaturalización térmica de las proteínas, no ha sido establecida, pero se cree que es determinante en la formación de grupos libres -SH, con el consiguiente aumento en la capacidad de captación de agua. La presencia de esta, permite entonces la ruptura por calor de enlaces peptídicos (50).

1.3 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS.

1.3.1 Naturaleza.

Se descubrió, que las enterotoxinas de S.aureus son proteínas extracelulares (14). En forma posterior a su purificación, se diferenciaron mediante anticuerpos específicos, los siguientes tipos: A, B, C, D y E. Tres formas de enterotoxinas C fueron identificadas con base a su variación en la respuesta inmunológica y punto isoelectrico; denominandoles C₁, C₂ y C₃ (93). Los antisueros correspondientes han sido preparados (52) (80).

Las enterotoxinas son moléculas simples de proteína, altamente tóxicas, de color blanco cuando están puras, con peso molecular relativamente bajo, son higroscópicas, solubles en agua y soluciones salinas. Se han determinado también sus secuencias de aminoácidos y puntos isoelectricos (14) (69) (cuadro 3).

1.3.2 Estabilidad.

Las enterotoxinas estafilocócicas, son mucho más estables que el resto de las proteínas celulares (98). En su estado activo resisten la acción de enzimas proteolíticas como la renina, papaina, tripsina y quimotripsina.

Cuadro 3. Características fisicoquímicas de las enterotoxinas estafilocócicas.

PROPIEDAD	TIPO DE ENTEROTOXINA					
	A	B	C	C	D	E
PESO MOLECULAR*	27,000	28,366	34,100	34,000	27,000	29,600
DOSIS EMETICA (ED ug/ mono)	5	5	5	5-10	20	10-20
CONTENIDO DE NITROGENO (%)	16.2	16.1	16.2	16.0	-	-
PUNTO ISOELECTRICO	6.9	8.6	8.6	7.0	7.4	7.0
ABSORCION MAXIMA (nm)	277	277	277	277	378	377
VISCOSIDAD REDUCIDA (ml/g)	4.07	3.81	3.40	3.70	-	-
COEFICIENTE DE SEDIMENTACION (S° ,w) . S	3.03	2.78	3.00	2.99	-	2.60
EXTINCION (E 1cm)	14.6	14.4	12.1	12.1	10.8	12.5

* Daltones

Fuente: Bryan, F.L. (1979)

A valores de pH bajos, su resistencia a las enzimas disminuye. Las irradiaciones solo reducen la concentración de las toxinas sin inactivarlas. Son relativamente termorresistentes, siendo la E mas que la A y la D (15). La inactivación por calor esta influida por el pH y la composición del medio térmico (13) (75). Se ha informado así mismo de su reactivación durante el almacenamiento posterior al tratamiento térmico (14) (50). En los alimentos, las enterotoxinas no resultan completamente inactivadas por la cocción normal, pasteurización u otros tratamientos térmicos usualmente aplicados. Además, a dosis iguales las toxinas calentadas presentan mayor actividad biológica que las no tratadas (94) (14).

1.3.3 Síntesis.

La evidencia acumulada indica que la síntesis de enterotoxinas en la célula se lleva a cabo por dos vías diferentes, B y C por medio de plásmidos y A, D y E cromosomalmente. Esto se confirma con lo siguiente:

-Las cantidades de enterotoxinas B y C son mucho mas variables de un organismo a otro, que las de A, D y E.

-Las células pueden incrementar la síntesis de enterotoxinas B y C, bajo ciertas condiciones y en el resto de enterotoxinas es muy difícil aumentarlo.

Se ha demostrado que la superficie de la célula está relacionada con la producción de enterotoxinas B y C.

La enterotoxina B ha sido estudiada con mayor detalle, debido a las grandes cantidades producidas por algunas cepas. Su síntesis se realiza en mayor cantidad en la fase exponencial de

crecimiento de S.aureus. Se han estudiado los requerimientos mínimos para la producción de estas toxinas, concluyéndose la necesidad de aminoácidos como arginina, cistina y fenilalanina, sales inorgánicas y vitaminas. Con estos nutrientes se han obtenido de 5 a 6 µg/ml de enterotoxina B, con un mínimo de crecimiento celular (3).

1.3.4 Métodos de producción.

Los métodos usados para la producción de enterotoxinas, dependen de la extensión y propósito del estudio, siendo mas breves los utilizados en la determinación de la enterotoxigenicidad de las cepas, que los empleados para su purificación (37) (14).

Numerosos cambios se han realizado en las técnicas de laboratorio desde el método que aplicó Dack en 1930, con caldo infusión de ternera en medio semisólido (1% de agar), incubado a 37 °C por 48 a 72 horas, bajo 20% de dióxido de carbono (67).

Actualmente, para producir pequeños volúmenes con alta concentración de enterotoxina, se usa caldo infusión cerebro corazón (BHI) en medio sólido empleando el método de celofán sobre agar y en medio líquido aplicando la técnica de cultivo en saco.

La caseína hidrolizada pancreática y sus variantes, son utilizadas para la obtención de grandes volúmenes de enterotoxina, por las ventajas que presentan al contener compuestos de bajo peso molecular de fácil eliminación durante la purificación (67).

1.3.5 Factores que intervienen en su producción.

Para la obtención de enterotoxinas, se requieren de condiciones más rígidas que las empleadas para el crecimiento del microorganismo, pero de igual forma dependen una de la otra. En alimentos, los factores son semejantes a los aplicados a medios de cultivo (cuadro 4).

1.3.5.1 Temperatura.- Se ha observado una mayor síntesis de enterotoxinas a 37 °C, aunque se han reportado pequeñas producciones entre 10 y 30 °C (88). Vandebosh, obtuvo la máxima producción de enterotoxina B, en una cepa S-61 y C, en cepa FR1-137, a 40 °C. Otros investigadores han delimitado temperaturas desde 10 hasta 50 °C como mínimas y máximas para su síntesis. Cambios en temperatura, afectan en mayor grado la síntesis de enterotoxina, que el crecimiento del microorganismo (63).

1.3.5.2 pH.- El rango de pH para la producción de enterotoxinas, va de 5.15 a 9.0, observándose un óptimo de 7.0. para la síntesis de enterotoxinas que se incrementa en forma directa con la concentración de cloruro de sodio (42) (86).

1.3.5.3 Aw.- La aw necesaria varía con el medio de suspensión, sin embargo se ha mencionado que debe encontrarse entre valores de 0.9 a 0.97 (96).

1.3.5.4 Atmósfera.- La producción de enterotoxinas ocurre tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y no depende directamente de esta condición, sin embargo la presencia de oxígeno incrementa su síntesis (88).

Cuadro 4. Factores que intervienen en la producción de enterotoxinas estafilocócicas.

FACTOR	MINIMOS	VALORES OPTIMOS	MAXIMOS
Aw	0.9	0.99	1.0
pH	5.15	7.0	9.0
Temperatura (°C)	10	30 - 38	45
NaCl (%)	0	0	10
Atmósfera (% O ₂)	-	10	-

- no ha sido reportado

Fuente: Minor, T. E. (1971)

La presencia de un 10% de oxígeno disuelto, es suficiente para lograr una máxima producción (32) (63).

1.3.5.4 Cloruro de sodio.- La presencia de minerales como cloruro de sodio, afecta la producción de enterotoxinas. Se ha observado que la síntesis óptima se realiza con 0%, pero puede llevarse a cabo en un rango de 0 a 10 % (42) (63).

1.3.6 Detección.

La detección de enterotoxinas es importante, tanto para el diagnóstico de brotes de intoxicaciones estafilocócicas, como para investigaciones al respecto (76). Al presentarse un brote, se aplican técnicas de aislamiento de S.aureus en los alimentos sospechosos. se implementa un método para inducir la producción de enterotoxinas y posteriormente se identifica el tipo, por comparación con enterotoxinas de referencia. Finalmente se puede confrontar con la extraída a partir de heces y orina del enfermo, para definir la causante de la intoxicación. En los casos en que no es posible aislar al microorganismo, es necesario extraer las toxinas directamente del alimento. Esta técnica es larga y tiene como finalidad obtener la enterotoxina en forma concentrada para una mejor identificación (37).

Los métodos existentes para la detección de enterotoxinas, presentan cierta eficiencia, y su elección se basa en la finalidad del estudio.

Las principales técnicas pueden dividirse en sistemas biológicos y serológicos.

Los biológicos, resultan en la mayoría de las ocasiones los más accesibles, rápidos y menos costosos. La toxina es aplicada

al animal de experimentación y la aparición de los síntomas de intoxicación observables, como vómito y diarrea, se interpretan como evidencia de la presencia de un toxico. Ya que otras toxinas provocan estos síntomas, se requiere de una digestión previa con tripsina para eliminarlas. De cualquier forma, los sistemas biológicos no permiten diferenciar el tipo de enterotoxina, ni la cantidad presente.

Los sistemas serológicos, pueden ser empleados tanto para mediciones cualitativas, como cuantitativas de enterotoxinas. Se aprovecha la propiedad que tienen de producir anticuerpos en animales de laboratorio. La posibilidad de que las enterotoxinas formen un precipitado al reaccionar con los anticuerpos específicos, se emplea como base en la demostración de su presencia. Los principales sistemas de este tipo, se mencionan a continuación (14):

-Tubo de difusión en gel o método de Oudin. Se emplea un tubo en el cual se tiene antitoxina incorporada en agar. Se agrega la muestra presuntiva y se observa la precipitación en la zona de equivalencia. Tiene una sensibilidad de 5 - 200 $\mu\text{g/ml}$.

-Doble difusión en gel. Esta prueba presenta una sensibilidad de 5 - 10 $\mu\text{g/ml}$. Se utiliza una placa con perforaciones, en la del centro se coloca la solución con el antígeno y la enterotoxina de referencia y los extractos a probar en pozos adyacentes; al existir difusión, se formará una banda de precipitación en el punto en que interaccionen ambos compuestos.

-Precipitación en tubo. Es cuantitativa, se realiza mediante el contacto entre la toxina y antitoxina correspondiente, en forma semejante al método de Oudin. Finalmente se cuantifica

nitrógeno total en la zona de precipitación, por la técnica de micro-kjeldahl, que se relaciona con la cantidad de enterotoxina presente (100).

-Hemaglutinación. En esta técnica, los anticuerpos están unidos a eritrocitos. Dicha solución al ponerse en contacto con la toxina, genera la reacción de aglutinación. Su sensibilidad es de 0.0015 µg/ml.

-Difusión radial simple. Presenta una sensibilidad de 1.0 µg/ml. El antisuero se agrega al agar, se mezcla y vierte en placas que se dejan enfriar. Se realizan perforaciones a las que se agrega el extracto de enterotoxina. Después de 24 horas, las placas se revelan con ácido acético-etanol, la formación de un halo de precipitación indica la presencia de enterotoxina.

-Radioinmunoensayo. Sensibilidad de 0.0015 - 0.010 µg/ml. El procedimiento incluye la adsorción de la enterotoxina específica sobre una placa sensible para antígenos. Posteriormente se añade la toxina marcada con iodo radiactivo, se deja actuar por un tiempo, se remueve la enterotoxina excedente y se determina la radiactividad emitida (17) (51) (100).

-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Es una técnica rápida y específica. La sensibilidad en el caso de alimentos es de menos de 0.1 ng/ml de extracto. Los principios de este método son idénticos a los de radioinmunoensayo. Se emplea una enzima unida a la enterotoxina o anticuerpo específico; la cantidad de esta, será directamente proporcional a la cantidad de enterotoxina probada. Se mide a través de una variación de color, producto de la reacción de un cromógeno con la enzima (35) (55).

1.4 LECHE.

1.4.1 Definición.

La leche es el producto íntegro del ordeño completo de una hembra lechera sana, bien alimentada y no fatigada. Ha de ser recogida higiénicamente y no contener calostro (97). Es un líquido complejo, heterogéneo, variable en su composición y fácilmente alterable (2).

1.4.2 Características fisicoquímicas.

La leche es un líquido blanco, opaco, dos veces más viscoso que el agua, de sabor ligeramente dulce y olor poco acentuado. Sus principales características fisicoquímicas se describen en el cuadro 5 (84).

De modo esquemático, se puede considerar la leche como una emulsión de materia grasa, en forma globular, en una solución acuosa que contiene numerosos elementos: unos en solución y otros en estado coloidal. Este líquido es al mismo tiempo, una suspensión de materias proteínicas en un suero constituido por una solución verdadera que contiene principalmente lactosa y sales minerales (2).

Cuantitativamente, el agua es el elemento más importante, representa aproximadamente el 90 % del peso de la leche. Los otros elementos constituyen el extracto seco total (EST), que alcanza habitualmente la cifra de 125 - 130 g/l.

El extracto seco magro (ESM), expresa el contenido de la leche en materia seca libre de grasa. Esta cifra es mucho más constante que la del EST y casi siempre se aproxima a 90 g/l.

**Cuadro 5. Características fisicoquímicas de la leche
de vaca**

DENSIDAD A 15°C (g / cm ³)	1.030-1.034
CALOR ESPECIFICO (cal/g)	0.93
PUNTO DE CONGELACION (°C)	-0.5
pH	6.5-6.6
ACIDEZ (°D)	16-18
INDICE DE REFRACCION A 20 °C	1.35

Estas cifras se refieren a leche fresca y normal

Fuente: Santos, M.A. (1987)

Algunos componentes de la leche están presentes en cantidades medibles y pueden determinarse con mayor o menor facilidad, otros se encuentran sólo en cantidades vestigiales y su determinación es más difícil.

Entre los primeros pueden citarse: la grasa, lactosa, sales minerales y sustancias nitrogenadas. Entre los segundos: enzimas, pigmentos y vitaminas. El carácter esencial de la composición de la leche es la armonía y equilibrio en que se encuentran sus componentes, siendo por tanto, un alimento de valor nutritivo inestimable, en particular para los niños (cuadro 6) (70) (97).

1.4.3 La leche como medio de cultivo.

La leche de vaca es una solución neutra, fuertemente tamponada, rica en sustancias nutritivas de los cuatro grupos: glucídicos, proteídicos, lípidos y sales; contiene factores de crecimiento especiales como vitaminas del grupo B, por lo que antes expuesto constituye un buen medio de cultivo para los organismos heterotróficos aptos para asimilar la lactosa y proteínas; pero no es un medio de cultivo universal, como algunos consideran, por diversas razones (99):

-La fuente energética está constituida solamente por lactosa: azúcar que es metabolizado menos frecuentemente que la glucosa.

-Si el contenido de proteínas es elevado, más del 3%, la cantidad de aminoácidos libres y péptidos es baja, lo que limita el crecimiento de numerosas especies bacterianas (81).

-En la leche cruda se han encontrado sustancias antibacterianas, que existen en forma natural, como lacteninas.

Cuadro 6. Composición química media de un litro de leche de vaca

I	Constituyente plástico o energético:			
	Agua	900-910 g		
	EST	125-130 g	Grasa	35-40 g
			ESM	90-95 g
			Lactosa	47-52 g
			Sustancias nitrogenadas	37-36 g
			Sales	9-9.5g
II	Biocatalizadores difícilmente determinables o en muy pequeña proporción:			
	Pigmentos			
	Enzimas y			
	Vitaminas			
III	Gases disueltos (4-5 % del volumen de la leche a la salida de la mama:			
	Gas carbónico			
	Oxígeno y			
	Nitrógeno			

Fuente: Veisseyre, R. (1980)

aglutininas y lisozimas, que la protegen contra la invasión de ciertos germen sensibles o producen un estado de latencia en los mismos al principio de su desarrollo (6) (73).

1.4.4 Flora microbiana de la leche.

La leche proveniente de animales sanos, contiene microorganismos, debido a la penetración de los mismos en la ubre y arrastre mecánico; posteriormente también está sujeta a contaminación por manipulación y contacto con diversos recipientes (39) (90).

Las vacas, area de ordeño, equipo y personal de procesamiento, son las principales fuentes de microorganismos en la leche y sus derivados. Por tanto es de suma importancia la higiene y sanidad en cada aspecto de la obtención de un producto lácteo, para asegurar un bajo contenido microbiano y calidad persistente.

Debido a la gran diversidad de las fuentes de contaminación, la magnitud y tipo de organismos presentes es muy variable y depende de las condiciones particulares de cada lote de líquido (56).

En el cuadro 7 se mencionan los principales grupos de microorganismos presentes en la leche, clasificados de acuerdo a su tipo bioquímico y respuesta a la temperatura.

Los microorganismos contaminantes en la leche que revisten mayor importancia son los patógenos, como el S.aureus. Este organismo tiene su origen principalmente en infecciones mastíticas de las vacas (71).

Cuadro 7. Tipos bioquímicos de microorganismos en leche

TIPO BIOQUÍMICO	MICROORGANISMOS REPRESENTATIVOS	FUENTE	SUBSTRATOS Y PRODUCTOS FINALES	OTRAS CARACTERÍSTICAS
Productoras de ácido	<p>Streptococos: <u>S.lactis</u> <u>S.cremoris</u></p>	Utensilios para la ordeña, pastura y plantas	Lactosa a ácido láctico y/o ác. acético, alcohol etílico y dióxido de carbono	A los que solo producen ác. láctico se los conoce como tipo homofermentativo; a los que producen varios compuestos, como heterofermentativos
	<p>Lactobacilos: <u>L.casei</u> <u>L.plantarum</u></p>	Alimentos almacenados en silos, estiércol	Lactosa a ácido láctico y otros productos	Algunos Lactobacilos son homofermentativos, otros son heterofermentativos
	<p>Microbacterias: <u>Nitrobacterium lacticum</u></p>	Estiércol, utensilios para ordeñar y derivados de la leche	Lactosa a ác. láctico y otros productos finales; no producen tanto ácido como los streptococos y lactobacilos	Algunas de estas bacterias pueden sobrevivir la exposición a temperaturas altas como 80-85°C por 10 min.
	<p>Micrococcos: <u>M.luteus</u> <u>M.varians</u> y <u>M.fraudenreichii</u></p>	Conductos de las glándulas mamarias de las vacas, utensilios para ordeña	Pequeñas cantidades de ácido resultan de la débil fermentación de la lactosa. Los micrococcos son ligeramente proteolíticos	Resisten al calor moderado; algunas pocas son capaces de sobrevivir a 63°C por 30 min.
	<p>Coliformes: <u>E.coli</u> <u>Enterobacter aerogenes</u></p>	Estiércol, agua contaminada, suelo y plantas	Lactosa a mezcla de productos finales, como ácidos, gases y compuestos neutros	La presencia de coliformes en leche es un indicador de su calidad sanitaria
Productoras de gas	<p>Coliformes: <u>Clostridium butyricum</u></p>	Suelo, estiércol, agua y alimentos	La lactosa se fermenta con acumulación de gas, éste es una mezcla de dióxido de carbono e hidrógeno, o solo dióxido de carbono en el caso de la fermentación por levaduras	Los grandes recipientes tienen sus tapas levantadas por la presión cuando la contaminación por las bacterias productoras de gas es muy elevada
Fermentación filante o en tiras	<p>Alcaligenes viscolactis <u>Enterobacter aerogenes</u> <u>Streptococcus cremoris</u></p>	Tierra, agua, plantas y alimentos	Los microorganismos sintetizan un material polisacárido viscoso que forma capas de limo o cápsulas a las células	La leche favorece la formación de cápsula; la leche estéril descremada se usa frecuentemente como medio de cultivo para la formación de cápsula
Proteolíticos	<p><u>Bacillus</u> sp.: <u>B.subtilis</u> <u>B.cremoris</u> <u>Pseudomonas</u> sp. <u>Proteus</u> sp. <u>Straptococcus licuefaciens</u></p>	Tierra, agua, utensilios	Degradan la caseína hasta péptidos que pueden ser degradados hasta aminoácidos, la proteólisis está precedida por la coagulación de la caseína con la renina	Los productos finales de la proteólisis imparten a la leche olores y sabores anormales. <u>Pseudomonas</u> sp. puede impartirle color a la leche
Lipolíticos	<p><u>Pseudomonas fluorescens</u> <u>Achromobacter lipolyticum</u> <u>Candida lipolytica</u> <u>Penicillium</u> sp.</p>	Tierra, agua, utensilios	Hidrolizan la grasa de la leche hasta glicerol y ácidos grasos	Algunos ácidos grasos dan a la leche olor desagradable y sabor agrio

1.4.5 Situación actual de la industria lechera en México.

En México, la problemática de la leche como alimento básico, radica en la insatisfacción del consumo de los sectores sociales que la requieren: niños, mujeres embarazadas y en periodo de lactancia.

Otro problema importante, es la presencia de contaminantes microbianos como S.aureus enterotoxigénico, en leches principalmente en polvo y de importación (99).

A pesar de la deficiencia en la producción de leche; existen estados de la república que tienen una producción mayor que la de autoconsumo. Esto implica, que la leche producida en regiones en las que la transportación hacia las ciudades que cuentan con empresas procesadoras sea difícil se pierdan grandes volúmenes, sobre todo en épocas en que la producción se incrementa.

Durante 1986, existieron excedentes de hasta 1,384 millones de litros, de los cuales, algunos fueron canalizados a regiones deficitarias, que en ese mismo año presentaron un déficit de 2,154 millones de litros.

Sin embargo, la producción lechera durante 1986 fue de 7,400 millones de litros aproximadamente, necesitándose un total de 9,500 millones de litros para satisfacer las necesidades de la población. En los cuadros 8 y 9 se observa la producción nacional de leche, de 1980 a 1988 y la demanda desde 1988 hasta 1995.

Los faltantes de leche fluida, generan la necesidad de importación de volúmenes considerables de leche en polvo, para cubrir la demanda nacional (cuadro 10) (1) (19).

Cuadro 8. Producción nacional de leche de vaca

AÑO	PRODUCCION DE LECHE (MILLONES DE LITROS)	INCREMENTO EN RELACION AL AÑO ANTERIOR (%)
1980	6741.5	1.49
1981	6856.4	1.70
1982	6923.6	0.98
1983	6768.4	2.24
1984	6860.0	1.35
1985	7474.4	8.96
1986	7696.1	2.99
1988	8160.2	
1995*	9500.0	

* Estimado

Cuadro 9. Necesidades estimadas de leche fluida
(Millones de litros).

AÑO	MINIMA	MAXIMA
1986	8662.3	9569.3
1987	9088.5	9973.1
1988	9551.0	10395.0
1989	10138.4	10209.2
1990	10316.3	10420.0
1991	10478.7	10638.8
1992	10646.3	10862.3
1993	10816.7	10090.36
1994	10989.7	11323.3
1995	11165.5	11561.0

Cuadro 10. Volumen de importación de leche en polvo

AÑO	VOLUMEN (MILES DE TONELADAS)
1980	194.631
1981	133.282
1982	97.427
1983	95.000
1986	119.391
1987	182.876
1988	173.000

Fuente: Aguirre, M.E. (1989)

1.4.6 Queso.

El queso es un producto lácteo concentrado, que contiene principalmente grasa, caseína, sales insolubles. agua con pequeñas cantidades de sales solubles, lactosa y albúmina (2) (60) (77).

Puede ser elaborado a partir de leche entera, parcialmente descremada, descremada o suero y puede o no contener crema o sólidos lácteos deshidratados no grasos.

Se obtiene por la coagulación de la caseína mediante renina y/o ácido láctico u otros ácidos o enzimas útiles, seguida del desuerado, en el curso del cual el lactosuero se separa de la cuajada (2) (9) (97) (101). Pueden adicionarse o no agentes de maduración y someterse a tratamientos adicionales durante el proceso: calor, presión y salado (74) (90).

La importancia de la elaboración de queso, radica en que constituye una forma de aumentar la vida de anaquel de la leche, y al igual que esta, tiene pocos rivales en el campo de la nutrición, por ser una fuente rica en calcio y proteínas. También por sus cualidades organolépticas y gran variedad es uno de los mejores alimentos del hombre (27) (54).

1.4.7 Proceso de elaboración de queso fresco.

En la figura 1 se presentan las principales operaciones que se realizan para la fabricación de queso fresco (60) (97).

1.4.7.1 Estandarización de la leche.- Es necesario uniformar los contenidos de grasa y sólidos totales presentes en leche, de tal forma que el producto cumpla con las especificaciones legales. Dicha composición se puede ajustar añadiendo crema,

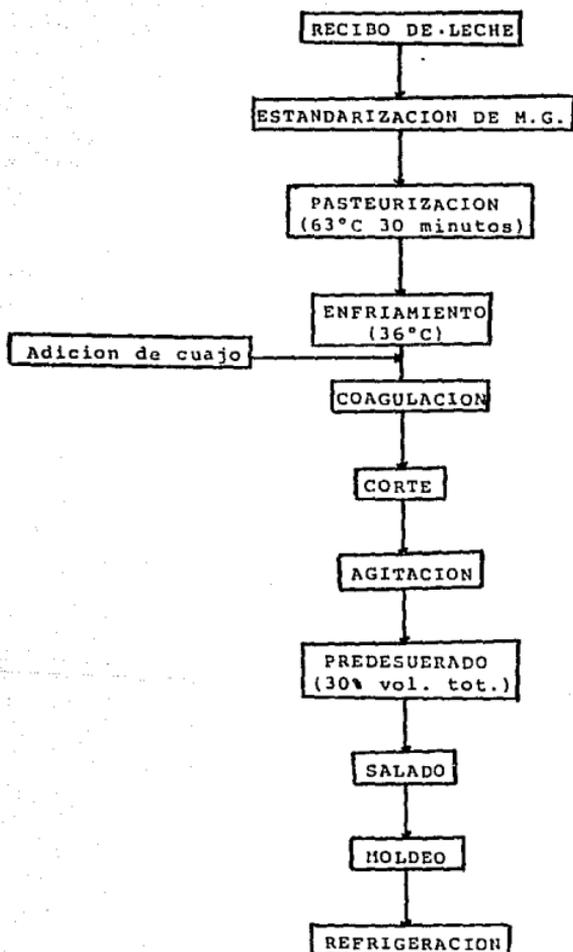


Figura 1. Proceso de obtención de queso fresco

Fuente: Lobato, C. (1987)

descremando, o mediante la adición de leche descremada o sólidos lácteos no grasos (97).

1.4.7.2 Pasteurización.- La generalización del uso de este proceso, en la leche, ha aumentado en los últimos años. Aunque presenta numerosas variantes; de las cuales la más utilizada es la pasteurización rápida a 72 °C, 15 segundos; todas persiguen las mismas finalidades:

-Destrucción de microorganismos patógenos, principalmente Mycobacterium tuberculosis.

-Reducción de la flora banal, con el fin de mejorar la conservación del producto y facilitar la actividad de cepas seleccionadas.

-Aumento del rendimiento quesero (1 a 10%). debido a la desnaturalización de proteínas solubles, mayor retención de grasa en la cuajada e insolubilización de sales minerales (60).

1.4.7.3 Coagulación de la leche.- Es el cambio de la leche de su estado líquido a sólido; o de un coloide complejo a una solución coloidal semisólida, por precipitación de la caseína. La estructura de este coloide es tan particular, que la mayor parte de la grasa, bacterias, sales minerales y otros compuestos quedan atrapados en la matriz proteínica formada por la caseína (72) (97).

Esta operación puede llevarse a cabo principalmente de dos formas:

-Acidificación. La acidificación espontánea o adicionando ácido hasta un pH de 4.7 provoca la precipitación de la caseína eliminando el calcio. El coágulo formado pierde toda su

flexibilidad, los gránulos no se unen para formar una pasta homogénea y el queso siempre queda granuloso.

-Coagulación enzimática. La hidrólisis o acción proteolítica de la renina u otras enzimas con el mismo efecto, desestabiliza el sistema micelar. Primeramente se separan las fracciones soluble e insoluble de la caseína, invirtiendo su carga y haciéndola más sensible a la precipitación con iones calcio. Posteriormente las micelas se agregan en la presencia de calcio, formando una red que agrupa los globulos de grasa, suero y demás partículas presentes. El coágulo formado es elástico y firme (60) (97).

1.4.7.4 Corte de la cuajada y desuerado.- A través de esta operación, se favorece la sinéresis que provoca la expulsión de suero retenido en la cuajada. Esta pérdida de agua confiere mayor firmeza al producto determinando su consistencia final, contenido de lactosa y por tanto de ácido láctico.

El desuerado y la acidificación están íntimamente relacionados y deben guardar cierta proporción para la obtención de buenos resultados. La acidez afecta la naturaleza química y apariencia física del coágulo; después de la coagulación enzimática la caseína se encuentra en forma de paracaseinato dicálcico. al reaccionar con el ácido láctico producido por la acción de los microorganismos se transforma en paracaseinato monocálcico que da elasticidad y ductibilidad al queso, si existe mayor cantidad de ácido se forma paracaseína libre que provoca la pérdida de elasticidad dando dureza y consistencia quebradiza (figura 2) (9) (27).

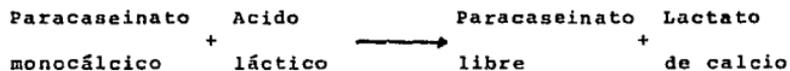
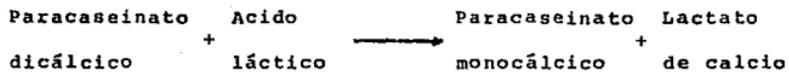


Figura 2. Transformaciones de la caseína en relación a la presencia de ácido láctico

Fuente: Lobato, C. (1987)

1.4.7.5 Moldeado.- Al colocar la cuajada en moldes se le da forma al queso, continuan el desuerado y destruccion de la lactosa (2) (60).

1.4.7.6 Salado.- Los métodos mas comunes para la aplicación de sal al queso fresco, consisten en la colocación de éste en una salmuera fuerte o frotación de su superficie con sal seca. Tiene la finalidad de protegerlo contra microorganismos indeseables, coadyuvar al desuerado por su acción higroscópica, impartirle sabor, actuar sobre las enzimas, aumentar la solubilidad de las proteínas del suero y regular la acidez (39) (60).

1.5 JUSTIFICACION

Las intoxicaciones estafilocócicas, se encuentran entre las enfermedades de origen alimentario mas comunes en México y en el mundo. Por otra parte, el caracter ubicuo del S.aureus y las malas prácticas higienicas en el manejo, procesamiento y conservacion de los alimentos, aumenta la suceptibilidad de los mismos a ser contaminados con este microorganismo.

En nuestro país, los principales alimentos involucrados en este tipo de intoxicación, son la leche y sus derivados como el queso.

Se han realizado numerosos estudios acerca del crecimiento y produccion de enterotoxina de S.aureus en medios de cultivo de laboratorio, pero no se han estudiado aplicados a un alimento como el queso fresco.

Se sabe que a temperaturas y tiempos determinados de tratamiento termico, el S.aureus sufre lo que se conoce como daño sub-letal, que le provoca pérdida de actividad, no obstante, con medios de cultivo adecuados y condiciones de laboratorio controladas, el microorganismo puede reactivarse recuperando la mayoría de sus funciones metabólicas.

Por lo anterior, se propone el estudio del efecto del daño sub-letal, en el crecimiento y producción de enterotoxina B de S.aureus, a traves de la inoculación del microorganismo dañado en quesos, posteriormente sometidos a diferentes temperaturas de almacenamiento, tanto adecuadas como inadecuadas para su conservación.

2.OBJETIVOS

- Determinar las condiciones de tiempo y temperatura, que ocasionen un mayor porcentaje de daño sub-letal en S.aureus.
- Analizar el desarrollo de S.aureus, con y sin daño sub-letal, durante el almacenamiento a diferentes temperaturas, de los quesos frescos inoculados con este microorganismo.
- Evaluar la capacidad de producción de enterotoxina B de S.aureus, con y sin daño sub-letal, en queso fresco sometido a diferentes temperaturas de almacenamiento.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 CEPA.

La cepa de Staphylococcus aureus (S-2), productora de enterotoxina B, mantenida en agar BHI, fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Sanitaria de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

3.2 CARACTERIZACION DEL S.aureus.

La identidad de la cepa proporcionada para la realización de este trabajo, se comprobó mediante las siguientes pruebas.

3.2.1 Observación microscópica.

A una asada de un cultivo puro, de 24 horas de S.aureus en caldo BHI, se le aplicó tinción de Gram, posteriormente se observó al microscopio. La agrupación de cocos en racimos irregulares, Gram (+), es típica del microorganismo (20) (71).

3.2.2 Morfología colonial.

Se sembró por la técnica de estria cruzada en agar BHI, una asada de cultivo de S.aureus y se observó morfología colonial.

3.2.3 Catalasa.

Se añadió una gota de peróxido de hidrógeno al 3%, sobre una colonia pura del microorganismo. La formación casi inmediata de burbujas de oxígeno, indica prueba positiva (62).

3.2.4 Coagulasa.

En un tubo de ensayo se colocaron 0.5 ml de plasma humano o de conejo y 0.5 ml de un cultivo puro de S.aureus en caldo BHI de 18 a 24 horas, se giro suavemente el tubo para lograr la

suspensión del organismo y se incubó en baño de agua a 37 °C. Como prueba positiva se considera la formación de un coágulo o filamentos de fibrina (62) (78).

3.2.5 Termonucleasa.

En una caja de petri, se añadieron 6 ml de agar DNAsa fundido. Una vez solidificado, se realizaron perforaciones de 2mm de diametro. Un cultivo puro de S. aureus en caldo BHI, se calentó en baño maria a 90 °C, durante 15 minutos. Con una pipeta Pasteur, se tomó parte del cultivo y se colocó en los pozos. Se incubó en cámara húmeda a 37 °C, durante 4 horas. Para revelar se agregó una solución de ac. clorhídrico 1N, de tal forma que cubriera la superficie de la caja. Como actividad positiva se considera la formación de un halo claro alrededor de los pozos (58) (62) (78).

3.4.6 Fermentación de azúcares.

Una asada de un cultivo puro de S. aureus de 24 horas en BHI, se inoculó en cuatro tubos, conteniendo cada uno caldo base rojo de fenol y los siguientes azúcares: manitol, glucosa, lactosa y sacarosa. Se incubaron 24 horas a 37 °C. El vire del indicador rojo de fenol a amarillo, representa la fermentación del azucar correspondiente (10) (62).

3.2.7 Movilidad.

Se emplea un medio semisólido específico, sulfídrico indol movilidad (SIM), que se siembra por picadura para observar movilidad. El crecimiento solo sobre la línea de picadura indicará la ausencia de movilidad (62).

3.2.8 Licuefacción de gelatina.

El medio de gelatina nutritiva inoculado por picadura con el microorganismo se incubó de 22 a 25 °C por 1 a 4 días. Una prueba positiva consiste en la licuefacción a las 24 horas (62).

3.2.9 Reacción de Voges-Proskauer.

Determina la capacidad de producir acetilmetilcarbinol mediante la fermentación de la glucosa. Se detecta por la variación de color del reactivo agregado al medio de crecimiento (62).

3.2.10 Reducción del nitrato.

Evalúa la capacidad del organismo para producir nitritos o nitrógeno libre a partir de la reducción de nitratos, observable por el cambio de color (62).

3.3 METODO DE PRODUCCION DE ENTEROTOXINA.

Para poder identificar la enterotoxina que produce la cepa de S.aureus utilizada, se indujo la producción aplicando el metodo de celofán sobre agar que a continuación se describe (figura 3) :

-Recortar círculos de celofán para diálisis y papel filtro, con un diámetro ligeramente menor al de la caja de petri (9cm). Humedecerlos con agua destilada y colocarlos alternadamente en una caja petri. Esterilizar a 121 °C, 15 minutos.

-De un cultivo puro de S.aureus en BHI, incubado a 37 °C durante 18 a 24 horas, se tomaron 0.1 ml, se sembró y distribuyó perfectamente, con una varilla de vidrio sobre placas de agar BHI, en las que se colocó previamente una membrana de celofán.

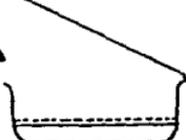
 9 cm. diámetro
 Celofán para diálisis
 9 cm. diámetro
 Papel filtro


 Caja petri
 Colocar las círculos húmedos alternadamente

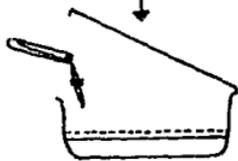
 Esterilizar 121°C/15 minutos


 5 ml cultivo de S.aureus

Inocular 0.1 ml sobre el celofán y distribuir con hisopo estéril


 Agar BHI pH=6 con membrana de celofán

Incubar a 37°C/24 hrs


 Cosechar crecimiento con 2.5 ml de buffer de fosfatos 0.01 M.

Prueba de inmunodifusión radial simple


 Centrifugar 3,500 rpm/30 min.

Figura 3. Método de celofán sobre agar

-Se incubó a 37 °C, durante 24 horas.

-El crecimiento se cosechó con 2.5 ml de solución reguladora de fosfatos 0.01M y centrifugó a 3,500 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se utilizó para la prueba de inmunodifusión radial simple modificada (78) (79).

3.4 IDENTIFICACION DE ENTEROTOXINA B POR INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE MODIFICADA.

La técnica de inmunodifusión radial simple, se empleó para detectar la presencia de enterotoxina B, en los extractos obtenidos a partir de la cepa mediante el método de celofán y de los quesos elaborados (figura 4). En su realización se llevaron a cabo las siguientes operaciones:

-Para la preparación del medio base para las placas (agar al 1.8 %), se disolvieron 18 g de agar purificado en 900 ml de solución reguladora de fosfatos 0.2 M y se agregaron 100 ml de timerosal al 1 %. Se guardó en volúmenes de 5 ml.

-Para cada placa se prepararon 10 ml de agar antitoxina. A 9.3 ml de agar al 1.8%, fundido a 70 °C, se le agregaron 0.7 ml de antitoxina B. Posteriormente se vació en una caja de petri, se mezcló y enfrió hasta que solidificara.

-Las placas ya preparadas se colocaron sobre un papel con cuadrículado de 1 cm. En el centro de cada cuadrícula se hizo una perforación con la base de una pipeta aseptada, de 6 mm de diámetro.

-Uno de los pozos se llenó con la enterotoxina de referencia y el resto con los extractos a probar. Se incubó a 37 °C, en cámara húmeda, durante toda la noche.

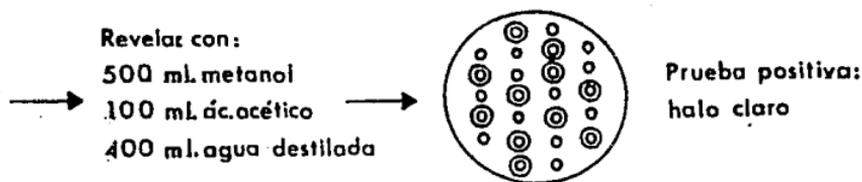
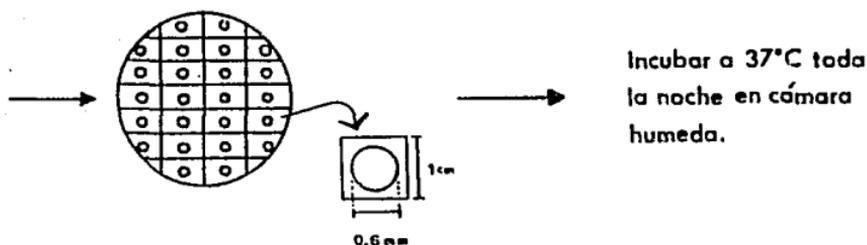
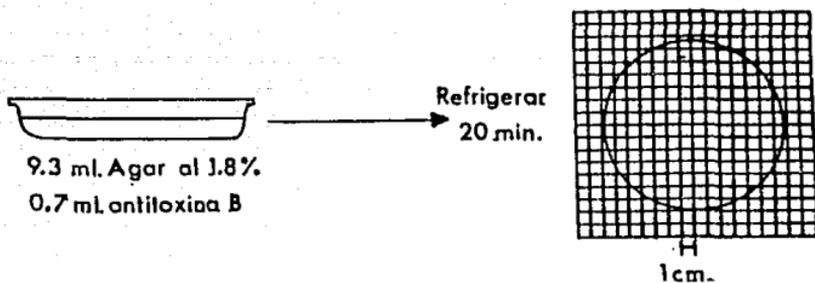


Figura 4. Método de inmunodifusión radial simple modificado

-El revelado de las placas se realizó con una mezcla 5:1:4 de etanol, ac. acético y agua destilada. La formación de un halo opaco alrededor de los pozos indica la presencia de enterotoxina B (91).

3.5 ADAPTACION DEL S.aureus EN CALDO LACTOSADO.

Con el fin de adaptar al microorganismo usado, a la utilización de la fuente energética de la leche, la lactosa, se hicieron resiembras consecutivas en caldo lactosado.

3.6 CURVA DE CRECIMIENTO.

Se realizó mediante dos métodos: cuenta viable para bacterias y espectrofotométricamente.

3.6.1 Cuenta viable para bacterias.

-Se preparo un cultivo puro de S.aureus en caldo lactosado, incubado a 37 °C, durante 18 a 24 horas.

-Con 3 ml del cultivo antes mencionado se inocularon 500 ml de caldo lactosado estéril, se homogenizó perfectamente. Este medio se mantuvo a 37 °C antes y después de tomar cada muestra.

-La cuenta de bacterias se llevo a cabo a diferentes tiempos de incubación, efectuandose diluciones decimales en serie (cuadro 11).

-Se tomó 1 ml de las tres últimas diluciones y se colocó en cajas Petri, posteriormente se adicionaron 15 a 20 ml de agar para cuenta estandar (ACS), previamente fundido y enfriado a 45 °C; las cajas se homogenizaron por rotación en la superficie de la mesa de trabajo e incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Cuadro 11. Tiempos de incubación en el método de cuenta viable para bacterias.

TIEMPO DE INCUBACIÓN (horas)	DILUCIONES
0.0	10^{-4} a 10^{-6}
1.0	10^{-4} a 10^{-6}
2.0	10^{-4} a 10^{-6}
3.0	10^{-5} a 10^{-7}
4.0	10^{-5} a 10^{-7}
5.0	10^{-5} a 10^{-7}
6.0	10^{-5} a 10^{-7}
7.0	10^{-7} a 10^{-9}
8.0	10^{-7} a 10^{-9}
9.0	10^{-7} a 10^{-9}
10.0	10^{-7} a 10^{-9}
11.0	10^{-7} a 10^{-9}
12.0	10^{-7} a 10^{-9}

3.6.2 Método espectrofotométrico.

-Para esta técnica se empleo el espectrofotómetro "Spectronic 20", calibrado con agua destilada a 600 nm, y se utilizo como blanco el medio de cultivo empleado ACS.

-Se tomo una alicuota de 15 a 20 ml del medio empleado para la cuenta viable simultaneamente y en los tiempos especificados, se anotó el porcentaje de transmitancia (%T) y absorbancia (%A) para cada caso.

3.7 DAÑO TERMICO SUB-LETAL EN S.aureus.

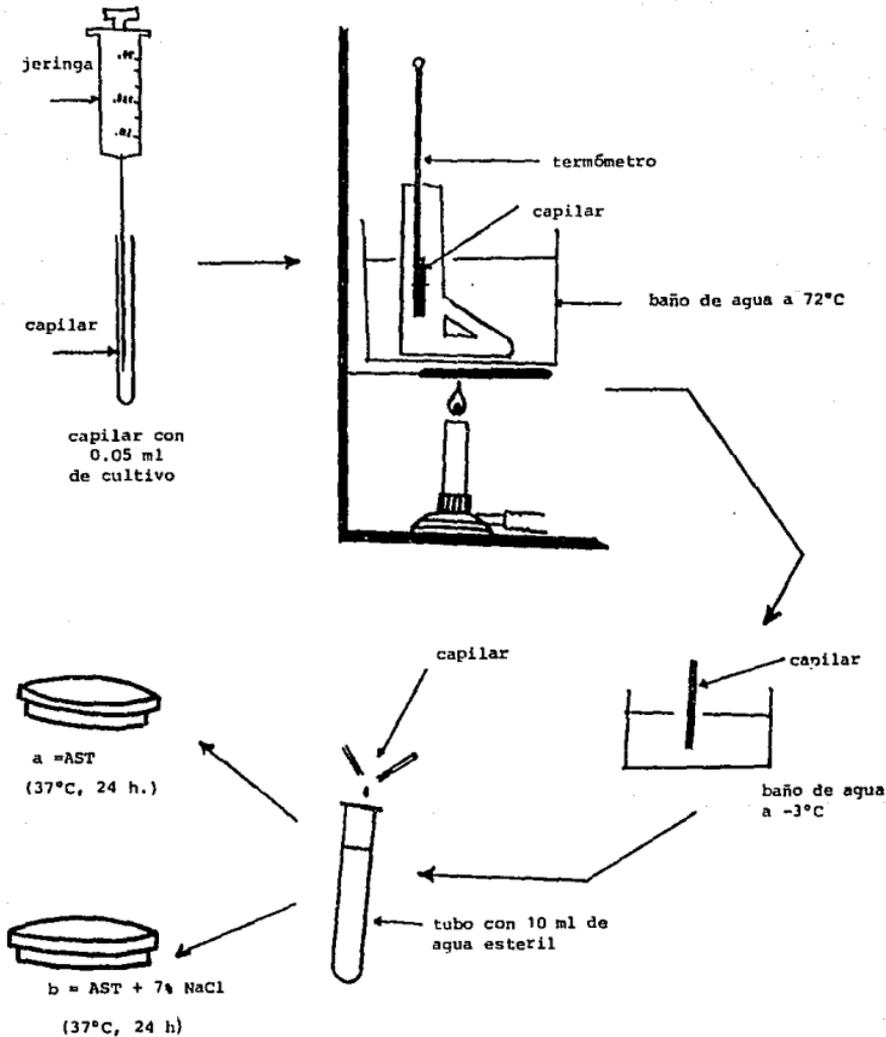
Para ocasionar el daño sub-letal en los microorganismos a inocular en los quesos, se empleo el método del tubo capilar. La temperatura empleada fue la correspondiente a la pasteurización rápida de la leche (72 °C). El medio de calentamiento usado fue leche en polvo reconstituida. El procedimiento se describe a continuación (figura 5) (36) (47):

-Con 3 ml de un cultivo puro de S.aureus en caldo lactosado de 18 a 24 horas, se inocularon 100 ml de leche entera en polvo reconstituida. Se incubo a 37 °C, durante el tiempo determinado a través de la curva de crecimiento, en el que el microorganismo alcanza su fase exponencial de crecimiento (6 horas).

-Se colocaron 0.05 ml del cultivo antes citado, en un tubo capilar de 1 mm de diametro.

-El capilar con el cultivo se sujetó a un termómetro, dentro de un tubo de Thiell con agua a 72 °C. Los tiempos de exposicion aplicados fueron 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 segundos.

-Inmediatamente despues de aplicado el tratamiento térmico, cada tubo capilar se introdujo en un baño de agua helada y colocó en un tubo para dilucion con 9.95 ml de agua esteril.



a = agar soya tripicaseína sin NaCl
 b = agar soya tripicaseína con 7% de NaCl

a - b = células dañadas

Figura 5. Método del tubo capilar

-Se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-5} y sembraron las tres últimas en AST con 7.0 % de cloruro de sodio y AST. La incubación fue a 37 °C, durante 18 a 24 horas.

-Las colonias de S.aureus se contaron, expresándose como UFC/ml.

-El número de células dañadas se calculó restando al número de células que crecieron en AST sin NaCl (células viables totales) las que crecieron en AST con 7.0 % de NaCl (células sin daño) (26).

3.8 ESTANDARIZACION DEL INOCULO.

Para conocer el número de células necesarias a ser inoculadas en la leche empleada en la elaboración de los quesos, se eligió el tiempo de tratamiento térmico que generó un mayor porcentaje de células dañadas. Se repitió cinco veces y se hizo cuenta viable en la misma forma que en el método del tubo capilar. Debido a que también se inocularon células sin daño subletal, se realizaron repeticiones en el tiempo cero de tratamiento térmico y se calculó el promedio de UFC/ml.

3.9 ANALISIS MICROBIOLOGICO DE LA LECHE EN POLVO.

Para conocer la calidad microbiológica de la leche en polvo empleada como materia prima de los quesos, se llevaron a cabo las siguientes determinaciones.

3.9.1 Preparación de la muestra.

Se pesaron 10 g de leche en polvo y homogenizaron con 90 ml de agua esteril (dilución 10^{-1}). A partir de esta mezcla se prepararon diluciones decimales hasta 10^{-4} .

3.9.2 Cuenta de mesófilos aerobios totales.

Se inoculó 1 ml de las tres últimas diluciones en una caja Petri, después se adicionaron 20 ml de P.S. La homogeneización se hizo por rotación sobre la mesa de trabajo. La incubación fue a 37 °C durante 18 a 24 horas. El número de colonias se reportó en UFC/ml (4) (27) (28).

3.9.3 Cuenta de coliformes totales.

Una asada de la primera dilución se sembró en placas de agar bilis rojo violeta (RVBA). Se incubó de 24 a 48 horas y contó el número de colonias características (27) (28).

3.9.4 Aislamiento e identificación de Salmonella.

Se sembraron 2 g de muestra en tubos con caldo selenito y tetracionato. Se incubó de 18 a 24 horas a 37 °C. Una asada de cada tubo se sembró en agar verde brillante, agar eosina azul de metileno (EMB) y sulfito de bismuto. A las colonias sospechosas se les hacen pruebas bioquímicas para comprobar la presencia Salmonella (27) (28).

3.9.5 Cuenta de S.aureus.

Se utilizó el método de Baird-Parker, que consiste en sembrar 0.1 ml de las tres últimas diluciones y distribuir perfectamente con una varilla de vidrio estéril. Se realizó el recuento de colonias típicas de S.aureus (27) (28) (89).

3.10 ELABORACION DE LOS QUESOS.

Quesos de 500 g, se elaboraron a partir de leche en polvo reconstituida "Nido" del mismo lote. La formulación para cada queso se muestra en el cuadro 12.

Cuadro 12. Formulación del queso fresco

MATERIA PRIMA	CANTIDAD
Leche en polvo	650 g
Cloruro de calcio	1 g
Cuajo (Cuamex XXX, fuerza 1:10,000)	2.5 ml
Cloruro de sodio	15 g
Agua	2 lt

El proceso de elaboración de los quesos abarcó las siguientes operaciones (figura 6):

-Reconstitución de la leche en polvo. Se prepararon 2 lt disolviendo perfectamente la leche en el agua, manteniendo una temperatura de 37 °C.

-Suplementación de calcio iónico a la leche. Con el fin de obtener una coagulación mas eficiente, se adicionó una solución de cloruro de calcio, 0.2 g en 10 ml de agua, y se mezcló perfectamente.

-Inoculación de la leche con S.aureus. Se utilizaron para este fin inóculos de 300×10^7 UFC de este microorganismo en leche, con daño sub-lethal en tubo capilar o sin daño, según el tratamiento a realizar. Se mezclaron perfectamente con la leche en polvo reconstituida.

-Coagulación. Se agregó a la leche una disolución acuosa de cuajo (Cuamex XXX, fuerza 1:10 000), en una concentración de 0.05 % de este agente coagulante por litro de leche. Se mezcló cuidadosamente y dejó reposar hasta la formación de un coágulo consistente, aproximadamente 15 min.

-Corte de la cuajada. Se realizó el corte del coágulo en pequeños cubos de aproximadamente 2 cm por lado.

-Salado. Se eliminó el 30 % del suero presente y se adicionó a la cuajada una mezcla de cloruro de sodio suero, que permitiera obtener alrededor de 3% de sal en el queso. Se esperó unos minutos.

-Desuerado. Se separó el suero restante de la cuajada.

-Moldeado. La cuajada se colocó en moldes de acero inoxidable con 500g de capacidad, permaneciendo en refrigeración, 24 horas.

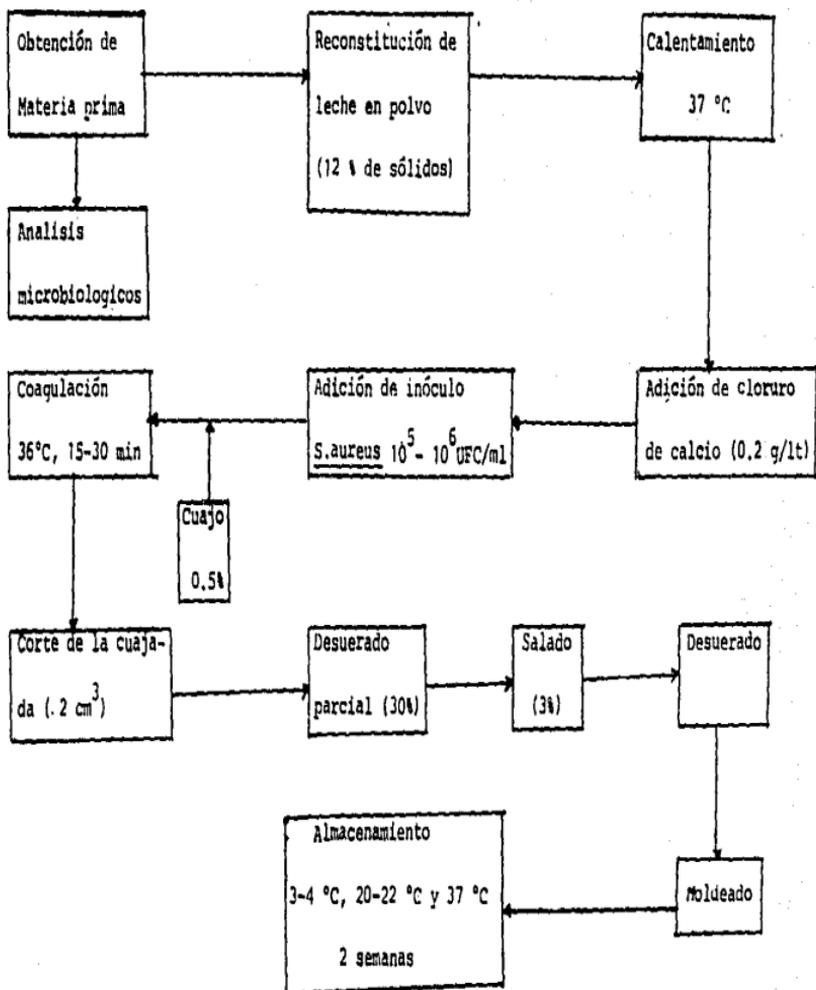


Figura 6. Proceso de elaboración de queso fresco.

-Almacenamiento. Se aplicaron tres temperaturas de almacenamiento: durante dos semanas, refrigeración (3 a 4 °C), Ambiente (20 a 22 °C); y a (37 °C) temperatura óptima de crecimiento por una semana (60).

3.11 ANALISIS MICROBIOLOGICOS POST-PROCESO.

3.11.1 Analisis del suero.

Se reunió el suero obtenido del desuerado y se mezcló perfectamente. Se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-4} , y se obtuvo la cuenta de mesofilicos aerobios totales y S.aureus (4) (27) (89).

3.11.2 Analisis de los quesos.

Se tomaron muestras de 10 g de cada queso en diferentes periodos de almacenamiento: inicial, primera semana, y segunda semana; y se realizaron cuentas de mesofilicos aerobios y S.aureus (4) (27) (89).

3.12 EXTRACCION DE ENTEROTOXINA.

Despues de transcurrido el periodo de almacenamiento, se tomaron muestras de los quesos y se llevó a cabo la extracción de enterotoxina por el siguiente metodo (figura 7):

-Pesar 100 g de queso. Agregar 140 ml de agua destilada, triturar y homogeneizar 3 min. en licuadora.

-Agregar 10 ml de HCl 0.1 M, mezclarlo bien y ajustar el pH final a 4.5.

-Centrifugar a 3 500 rpm a 4 °C durante 50 min.

-Pasar el sobrenadante a un vaso de precipitados, ajustar el pH a 7.5 con NaOH 5 M.

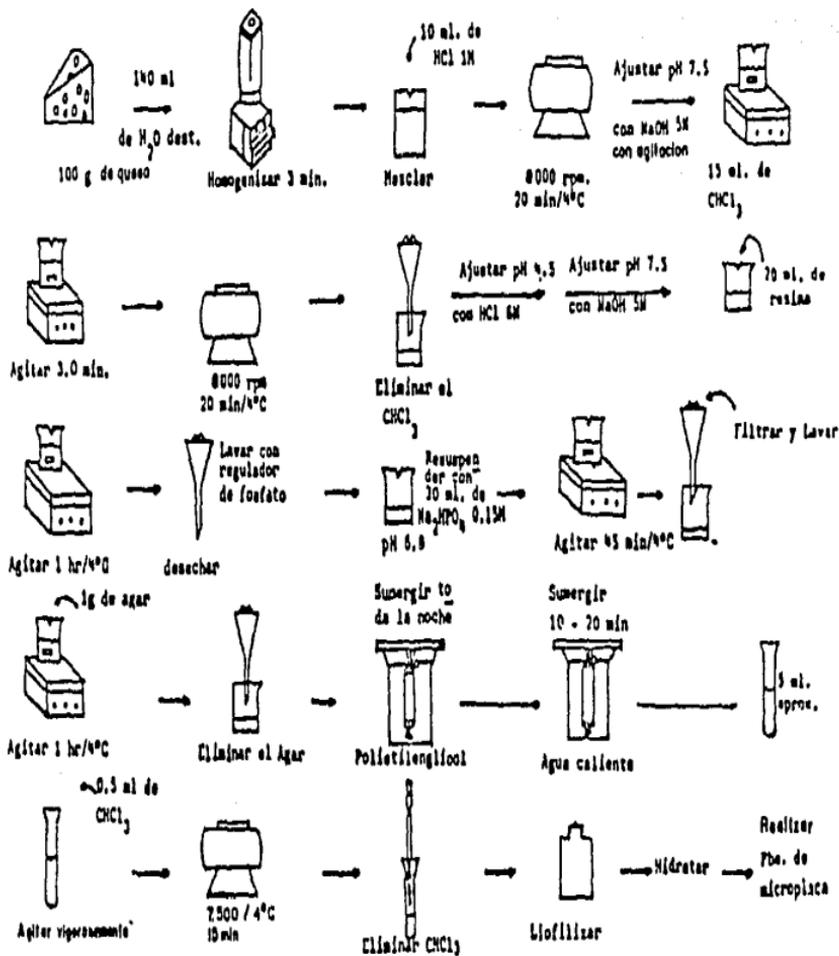


Figura 7. Método de extracción de enterotoxina de alimentos

-Agregar 15 ml de cloroformo y mezclar con agitador magnético por 3 min.

-Centrifugar a 3 500 rpm a 4 °C durante 30 min.

-Separar el cloroformo ajustando el sobrenadante a un pH de 4.5 con HCl 0.1 M (si hay precipitación centrifugar de nuevo y descartar).

-Ajustar el pH a 7.5 con NaOH 5 M, si hay precipitado centrifugar de nuevo y descartar.

-Agregar 30 ml de resina Amberlite CG-50 con pH de 5.6, previamente tratada.

Tratamiento de la resina.- Pesar 100 g y suspenderla en 1.5 lt de agua destilada. Agregar NaOH 5 M hasta pH de 12, agitar durante 1 hora. Lavar varias veces con agua destilada. Agregar HCl 6M hasta pH de 2. Agitar durante 1 hora. Lavar varias veces con agua destilada y suspender en solución amortiguadora de fosfatos a pH 5.6. El pH de la resina debe de ser de 5.6 a 5.9.

-Mezclar durante 1 hora con agitador magnético a 4 °C.

-Filtrar la resina a través de un embudo buchner y lavar con 200 ml de solución reguladora de fosfatos 0.015 M y pH 5.9. Descartar el lavado.

-Suspender la resina en 30 ml de solución reguladora de fosfatos 0.15 M con 0.9 % de cloruro de sodio. Ajustar el pH lentamente a 6.8 y agitar con barra magnética por 45 min. a 4 °C.

-Filtrar la resina, guardar el eluido y descartar la resina.

-Agregar 1 g de agar purificado y agitar 1 hora a 4 °C con barra magnética.

-Filtrar y colocar el filtrado en un tubo de celofán para dialisis. Introducir en una disolución de polietilen glicol al

30 % durante toda la noche.

-Extraer el saco de diálisis y lavar con agua tibia. Dejarlo reposar en agua tibia.

-Colocar el extracto en un tubo de centrifuga, al igual que los lavados del saco, con un volumen no mayor de 5 ml.

-Centrifugar a 3 500 rpm a 4 °C durante 30 min.

-Transferir a un frasco pequeño y liofilizar.

-Disolver el liofilizado con 0.4 ml de tripsina al 1 %, dejando digerir por 30 min. a 37 °C.

-Hacer la prueba de inmunodifusion radial simple modificada, para la detección de enterotoxina B (33) (76).

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1 CARACTERIZACION DE LA CEPA.

4.1.1 Morfología microscópica.

Después de realizar la tinción de Gram, se observaron al microscopio, células esféricas (cocos), agrupadas en racimos irregulares con reacción de Gram (+), propia de S.aureus; sin embargo, esta prueba por si sola no permite su diferenciación de otras especies de la familia Micrococcaceae que presentan estas mismas características (21).

4.1.2 Morfología colonial.

Unas de las principales características de las bacterias son su apariencia y crecimiento en un medio de cultivo específico. Los resultados de la morfología colonial de la cepa de S.aureus S-6, concuerdan con los reportados en la literatura (cuadro 13) (53).

4.1.3 Catalasa.

Es una enzima producida por S.aureus, que descompone la molécula de peróxido de hidrógeno, liberando oxígeno el que se hace patente mediante la formación de burbujas. El microorganismo estudiado produce esta enzima. Por medio de esta prueba se puede diferenciar el estafilococo (catalasa positivo), de estreptococos (catalasa negativos) (53).

4.1.4 Coagulasa.

Es una prueba simple, utilizada como presuntiva en la identificación de cepas enterotoxigénicas de S.aureus.

Cuadro 13. Morfología colonial del S.aureus S-6

CARACTERISTICA	RESULTADO
Medio de crecimiento	Agar BHI
Tamaño	2 - 3 mm
Color	Amarillento
Consistencia	Cremosa
Borde	Entero
Aspecto	Húmedo
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Luz reflejada	Brillante
Superficie	Lisa

La producción de la enzima coagulasa, que actúa como activador del plasma coagulando el fibrinógeno, permite que se lleve a cabo esta prueba.

El resultado de esta prueba fue positivo, lo que da una pauta para suponer la enterotoxigenicidad de la cepa que se usó, pero no asegura esta función metabólica ya que se han reportado excepciones a esta relación. se sabe que 90 % o mas de las cepas de S.aureus enterotoxigenicas producen coagulasa (61).

4.1.5 Termonucleasa.

La termonucleasa es producida por algunas cepas de S.aureus, hidroliza los enlaces fosfato del DNA, es termoestable y resiste altas concentraciones de NaCl.

Al igual que la prueba de coagulasa, la termonucleasa fue positiva (50).

Se ha reportado una relación mas estricta entre la producción de esta enzima y la de enterotoxina, por lo que las pruebas de coagulasa y termonucleasa en conjunto son utilizadas para la presunción de cepas enterotoxigenicas de S.aureus (57) (58).

4.1.6 Fermentación de azúcares.

Todos los azúcares probados: manitol, lactosa, sacarosa y glucosa, fueron fermentados por la cepa representando por tanto una prueba positiva. La prueba de manitol, resulta altamente selectiva para la confirmación de cepas patógenas de S.aureus (62) (68).

4.1.7 Movilidad.

El S.aureus es un microorganismo que no tiene flagelo, organelo que tiene la función de permitir la movilidad de la célula. El resultado de esta prueba fue negativo, con un crecimiento acentuado en la línea de siembra y con el medio circundante claro (62).

4.1.8 Licuefacción de gelatina.

La gelatinasa, enzima producida en grandes cantidades por S.aureus, permite su identificación, a través de su acción sobre un medio de gelatina nutritivo, provocando la licuefacción del mismo. La cepa estudiada mostró esta actividad enzimática.

4.1.9 Reacción de Voges-Proskauer.

Mediante esta prueba se determina la capacidad del microorganismo para producir acetilmetilcarbinol (acetoina), producto final neutro de la fermentación de glucosa. El S.aureus S-6 presentó reacción positiva.

4.1.10 Reducción de nitrato.

En esta prueba se observó un resultado positivo, que confirmó la capacidad del S.aureus S-6 para producir sustancias que reducen los nitratos a nitritos o nitrógeno libre (62).

Todos los resultados de las pruebas bioquímicas, concuerdan con los reportados en la literatura (cuadro 14).

4.2 PRODUCCION DE ENTEROTOXINA B.

El método de celofán sobre agar, hace posible obtener altas concentraciones de enterotoxina, que permiten comprobar su producción e identidad, al someterla posteriormente a una

Cuadro 14. Características bioquímicas de S.aureus

Prueba	Respuesta
Coagulasa	+
Catalasa	+
DNasa	+
Glucosa	+
Manitol	+
Sacarosa	+
Lactosa	+
Movilidad	-
Acido sulfhídrico	+
Licuefacción de gelatina a 22 °C	+
Voges-Proskauer	+
Reducción de nitrato	+

reacción de identificación antígeno-anticuerpo. Además, la duración de esta técnica (24 horas a 37 °C), permite obtener resultados rápidos con una pequeña cantidad de medio (22).

El agar BHI que se utilizó, contiene la cantidad suficiente de nutrimentos, para permitir el crecimiento y producción de enterotoxina a niveles suficientes para su detección. La membrana de celofán sobre el medio contribuye a una purificación y extracción de la enterotoxina más sencillas, ya que facilita la eliminación de productos metabólicos no importantes con un peso molecular menor de 12 000 D. La enterotoxina B, al poseer un peso de 28 366 D, queda retenida en la superficie de la membrana, por lo que su recuperación se lleva a cabo, mediante el lavado de la misma con una solución amortiguadora (65).

Mediante este método se obtuvo un extracto de la cepa de S.aureus S-6.

4.3 IDENTIFICACION DE ENTEROTOXINA B.

La posibilidad de identificar enterotoxinas por un método serológico como el de inmunodifusión radial simple modificada, se favorece por la capacidad que tienen las toxinas de reaccionar con su antisuero específico, uniéndose de tal forma que después de un revelado con una mezcla ácido y alcohol, se formen halos opacos alrededor del pozo, en la zona en que las dos sustancias se unen por difusión.

El diámetro del halo de precipitación es proporcional a la cantidad de toxina agregada al pozo, por lo que esta prueba puede ser de carácter semicuantitativo.

El extracto obtenido mediante el método de celofán sobre

agar, se probó mediante inmunodifusión, comprobándose que la cepa proporcionada de S.aureus S-6 produce la enterotoxina B (21) (66) (91).

4.4 ADAPTACION DE S.aureus A CALDO LACTOSADO.

El S.aureus degrada la lactosa cuando este azucar representa su único medio energético. Al principio el microorganismo no se encontraba adaptado a su utilización directa por falta de algunos metabolitos, por lo que fue necesario llevar a cabo cinco resiembras que facilitaron su óptimo crecimiento.

En nuestro caso, deseabamos conocer el efecto de la temperatura de almacenamiento y daño termico, sobre el crecimiento del microorganismo y producción de enterotoxina B, en un derivado lacteo como el queso; por lo que se hizo necesario adaptarlo a la utilización de lactosa (azúcar de la leche), y de esta forma impedir que la desadaptación interviniera en los factores a determinar.

4.5 CURVA DE CRECIMIENTO.

Debido a que las partículas suspendidas en un líquido absorben la luz, es posible medir con un instrumento sensible como el espectrofotómetro la concentración del mismo, o en nuestro caso el crecimiento celular relacionado con el grado de absorción de luz. En la figura B, se observa la curva de crecimiento obtenida a partir del método espectrofotométrico, a una longitud de onda de 600 nm; en ella se aprecian tres de las cuatro fases del crecimiento celular (20) (71).

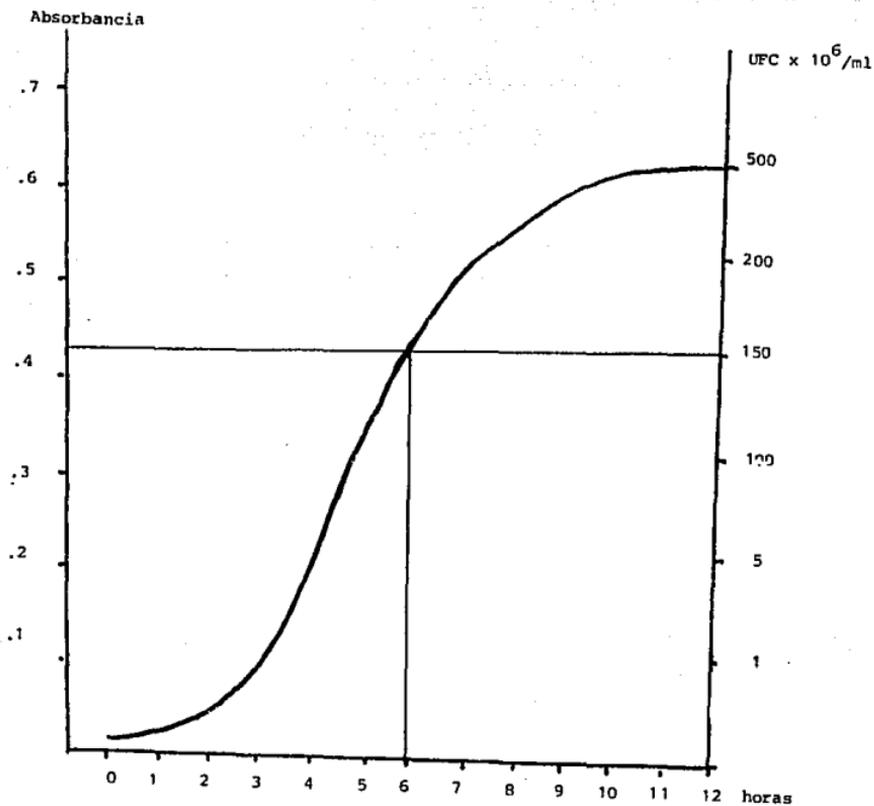


Figura 8. Curva de crecimiento

4.5.1 Fase de retardo o lag.

En este periodo que comprendió las dos primeras horas de incubación, las células aumentan su tamaño permaneciendo inalterada la población celular total. Fisiológicamente dichas células se encuentran muy activas, sintetizando las enzimas y coenzimas necesarias para su óptimo funcionamiento. En la parte final de esta fase, las células comienzan a dividirse de manera irregular, hasta que inicia la siguiente etapa.

4.5.2 Fase logarítmica o exponencial.

Esta etapa se presentó entre las 2 y 9 horas de incubación, presentandose multiplicación regular y a ritmo constante. El desarrollo, así como la producción de enterotoxina B son máximos, por lo que los microorganismos en esta fase resultan de gran interés para el estudio de la producción de enterotoxina. Posteriormente todas las funciones de desarrollo y producción de sustancias comienzan a disminuir gradualmente.

4.5.3 Fase estacionaria.

La tendencia al cese del desarrollo que se observa en las tres últimas horas de nuestra curva, representa la fase estacionaria de crecimiento, que puede deberse al agotamiento de algunos nutrientes y el inicio de la acumulación de sustancias tóxicas de desecho. El que la curva permanezca constante indica que el desarrollo se ha detenido o que se ha equilibrado con el ritmo de muerte celular.

4.5.4 Fase de declinación o muerte.

En esta etapa las bacterias mueren rápidamente en forma

exponencial, a la inversa de lo que sucede en la fase logarítmica. No se observó en nuestra curva, ya que el espectrofotómetro detecta tanto células muertas como vivas.

4.6 TRATAMIENTO TERMICO.

El tratamiento térmico se llevo a cabo a 72 °C. utilizando el método del tubo capilar ya descrito. Se calcularon los porcentajes promedio de células que mueren, viables y dañadas (cuadro 15).

En la figura 9, se observa que al aumentar el tiempo de tratamiento térmico, hay un mayor porcentaje de destrucción de células que va desde un 18% a los 5 segundos hasta un 72% a los 30 segundos. Estos datos muestran que las condiciones empleadas en la pasteurización rápida de la leche, 72 °C, 15 segundos, fueron insuficientes para la destrucción total de S.aureus, aun cuando mediante el método del tubo capilar se obtuvo una transferencia de calor casi instantanea. Bajo estas condiciones solo se destruyó el 46 % de la población de S.aureus. Sin embargo, estos dos tratamientos no son totalmente equiparables, debido a que existen diferencias en sus metodologías, y otros factores como la cantidad inicial de microorganismos.

A partir del número de células que permanecieron viables (figura 10), se calculó el porcentaje de células dañadas (figura 11), eligiendose dos tiempos de tratamiento térmico: 20 segundos (72% de daño) y 30 segundos (92% de daño); para ser inoculados en los quesos a elaborar y observar el desarrollo del S.aureus y producción de enterotoxina B durante el almacenamiento.

Cuadro 15. Resultados del Tratamiento Térmico a 72°C

Tiempo (s)	a	b	c	d
0	100	0	0	0
5	82	18	2	98
10	65	35	15	85
15	54	46	53	47
20	45	55	72	28
25	36	64	85	15
30	28	72	92	8

a= % de células viables

b= % de células destruidas

c= % de células dañadas

d= % de células sin daño

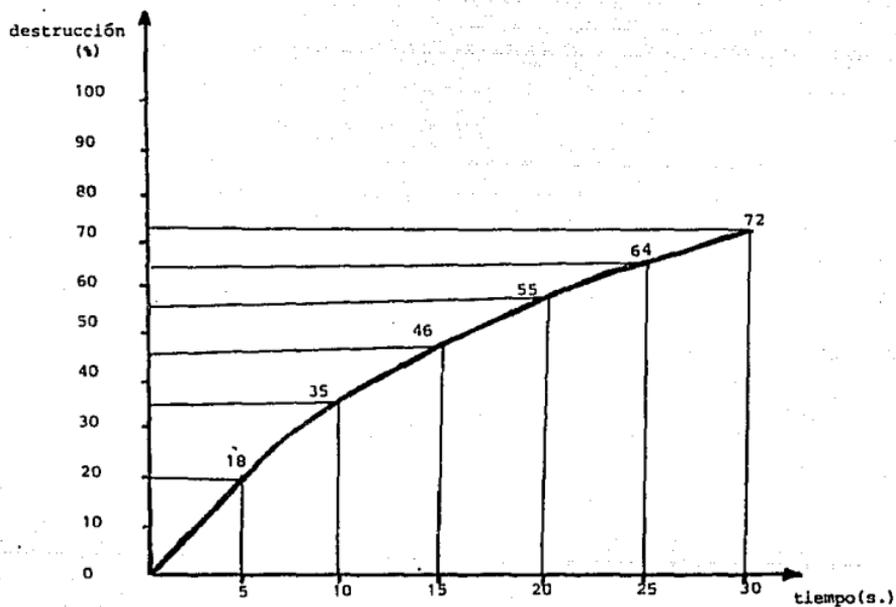


Figura 9. Porcentaje de destrucción durante el tratamiento térmico a 72°C

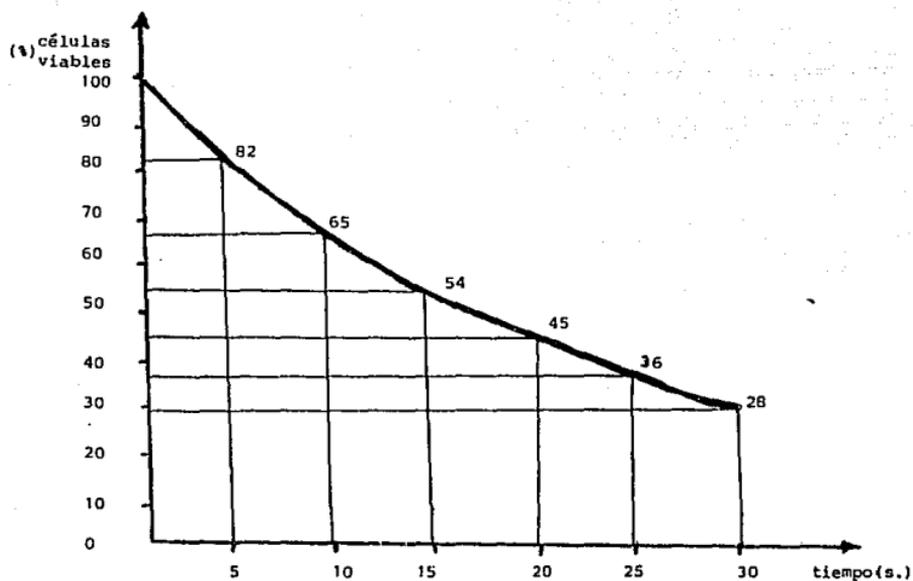


Figura 10. Porcentaje de células viables durante el tratamiento térmico a 72°C

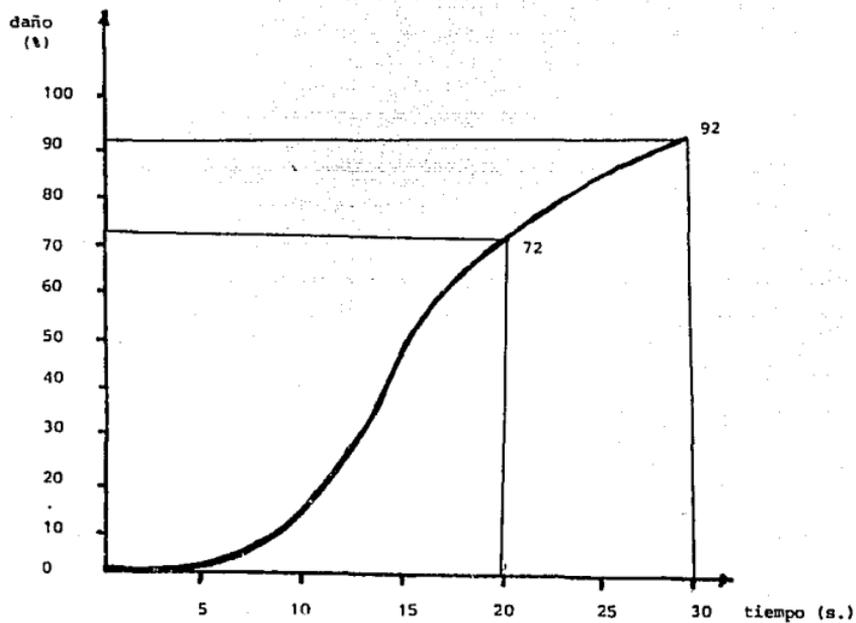


Figura 11. Porcentaje de daño sub-lethal durante el tratamiento térmico a 72°C

El calor aplicado a los microorganismos puede causar la desnaturalización de proteínas, ruptura de la estructura del DNA y daños a la membrana citoplasmática (11). La degradación del DNA y desnaturalización de proteínas implicadas en la respiración, están relacionadas directamente con la muerte celular (82).

Las células dañadas, disminuyen su capacidad metabólica, presentando una disminución selectiva de las enzimas y desnaturalización parcial de las proteínas celulares (11). A pesar de esto, se ha reportado la recuperación de los microorganismos en su crecimiento y metabolismo incluyendo la producción de enterotoxina al ser transferidos a un medio con aminoácidos, glucosa y minerales como fosfatos y magnesio (25) (45) (49).

La pasteurización rápida de la leche a 72 °C, 15 s, debería destruir a todas las células presentes, pero mediante el tratamiento aplicado a un cultivo del organismo en leche, no se logro destruir al total de la población microbiana. Esto puede deberse, ha que se ha comprobado un efecto protector, sobre los microorganismos, de los componentes del medio de suspensión, que en el caso de la leche son principalmente: proteínas, grasa y sales minerales (25) (38) (40) (89).

4.7 ESTANDARIZACION DEL INOCULO.

Con el fin de conocer el número promedio de células a inocular en los quesos, se hicieron cinco repeticiones del tratamiento térmico por el método del tubo capilar, con un cultivo puro de S.aureus en fase logarítmica de crecimiento (6 horas), tratando térmicamente a los microorganismos 20 y 30 s.

De la misma forma se hicieron repeticiones sin tratamiento térmico para estandarizar el inóculo en 300×10^7 UFC.

4.8 ANALISIS MICROBIOLOGICO DE LA LECHE EN POLVO.

La leche en polvo, por el proceso que sufre para su elaboración y contenido de humedad tan bajo, difícilmente debería presentar el problema de contaminación con microorganismos. Sin embargo, en leche en polvo de importación se ha encontrado S.aureus enterotoxigénico. Estudios realizados por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, sobre la presencia de cepas enterotoxigénicas de S.aureus en leches en polvo Nacionales, muestran cantidades importantes de este organismo en las mismas.

Por las condiciones antes mencionadas, y con el fin de tener un control del lote de leche en polvo "Nido" empleado en la elaboración de los quesos, se hizo el análisis de Mesófilos aerobios totales (150 UFC/g) y S.aureus (4 UFC/g), obteniéndose una cuenta promedio de ambos muy baja. En cuanto a los coliformes y Salmonella no se observó su presencia.

4.9 TRATAMIENTOS EN LOS QUESOS ELABORADOS.

Se elaboraron quesos por duplicado con S.aureus sin tratamiento térmico, con 20 s (72% de células dañadas) y 30 s (92% de células dañadas) de tratamiento, con el fin de comparar el desarrollo y producción de enterotoxina del microorganismo con diferente porcentaje de daño, elaborándose seis quesos para cada temperatura de almacenamiento a probar (refrigeración 3-4 °C, ambiente 20-22 °C y óptima 37 °C) (cuadro 16).

Cuadro 16. Características de los diferentes tratamientos

TRATAMIENTO	TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO	# DE QUESOS	TRATAMIENTO TERMICO APLICADO A <i>S.aureus</i>
1	refrigeración 3-4 °C	2	sin tratamiento
2		2	20 s de tratamiento
3		2	30 s de tratamiento
4	ambiente 20-22 °C	2	sin tratamiento
5		2	20 s de tratamiento
6		2	30 s de tratamiento
7	óptima 37 °C	2	sin tratamiento
8		2	20 s de tratamiento
9		2	30 s de tratamiento

La temperatura de 37 °C se utilizó como referencia, por ser la óptima para el crecimiento y la producción de enterotoxina.

El control de la temperatura se llevó a cabo diariamente, usando un termómetro de máximas y mínimas.

4.10 DESARROLLO MICROBIOLÓGICO EN LOS QUESOS.

En los cuadros 17, 18 y 19 se tabularon las cuentas obtenidas del análisis microbiológico de los quesos elaborados y almacenados a temperatura de refrigeración, ambiente y óptima. Para un mayor entendimiento se graficaron los resultados, figuras 12, 13 y 14, en las que se ilustra el comportamiento de los quesos sin tratamiento térmico, con 20 segundos de tratamiento y 30 segundos respectivamente. Las tomas de muestra en todos los casos, se llevaron a cabo en tres periodos de almacenamiento: 1er. día, 1a. semana y 2a. semana.

En todos los tratamientos de los quesos, se notó una tendencia de crecimiento directamente proporcional a la temperatura de almacenamiento (3-4 °C, 20-22 °C y 37 °C), obteniéndose una mayor tasa de crecimiento a 37 °C, por ser la temperatura óptima. Esto es congruente, ya que al aumentar la temperatura de almacenamiento, desde la refrigeración a 3-4 °C hasta la óptima a 37 °C, también aumentan las funciones metabólicas de los microorganismos y la velocidad de las reacciones, por lo que hay un mayor desarrollo (21).

A pesar de que los quesos almacenados a la temperatura de refrigeración de 3-4 °C, se encuentran por debajo de la temperatura normalmente empleada para la conservación de los mismos (8 °C), y para el crecimiento de S.aureus (6.5 °C), se observó crecimiento (figura 15).

En esta misma figura, los quesos con tratamiento térmico a 72 °C durante 30 segundos, crecieron en una mayor proporción que los de 20 segundos de tratamiento y sin tratamiento, por lo que se confirma que la recuperación del S.aureus dañado es mas rápida conforme aumenta el tiempo de tratamiento, y su tasa de crecimiento es mayor que en el microorganismo no tratado. Este mismo comportamiento se observa a temperatura ambiente (figura 16) y óptima (figura 17) (2)(44)(49).

Cabe suponer que el daño ocasionado en el 72 y 92% de las células de S.aureus fue mínimo, de manera que en condiciones adecuadas de crecimiento les es muy fácil recuperarse y continuar su crecimiento normal (45) (49).

Sin embargo, se observó que aun en ambiente no adecuado como es la refrigeración a 3-4 °C, se obtuvo recuperación del crecimiento de los organismos dañados.

En las estadísticas de intoxicaciones estafilocócicas y alimentos involucrados (30), se reporta que la leche y sus derivados, principalmente los quesos, representan los alimentos con mayor incidencia, 43% de los brotes de intoxicaciones en México, y tomando en cuenta que en nuestra investigación el S.aureus aun con tratamiento térmico y a la temperatura de refrigeración tuvo crecimiento, debe cuidarse el procesamiento higiénico y almacenamiento correcto de los quesos.

En cuanto a las cuentas de mesófilos aerobios, el S.aureus representa la mayor cantidad de los mismos y a pesar de que es un microorganismo de baja competitividad, no se vio afectado por la presencia de otros microorganismos propios de la leche (71).

Cuadro 17. Crecimiento de S.aureus y mesófilos aerobios en los quesos almacenados a 3 -4 °C (expresado en UFC x 10³)

TRATAMIENTO A 72 °C	PRUEBA	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (días)		
		1	7	14
sin tratamiento	MAT	149	320	389
	<u>S.aureus</u>	136	310	328
20 s.	MAT	124	342	398
	<u>S.aureus</u>	118	329	362
30 s.	MAT	123	368	420
	<u>S.aureus</u>	120	342	398

MAT mesófilos aerobios totales

Cuadro 18. Crecimiento de S.aureus y mesófilos aerobios en los quesos almacenados a 20 - 22 °C (Datos expresados en UFC x 10³)

TRATAMIENTO A 72 °C	PRUEBA	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (días)		
		1	7	14
sin tratamiento	MAT	122	12,000	175,000
	<u>S.aureus</u>	109	11,200	158,000
20 s.	MAT	117	14,200	213,000
	<u>S.aureus</u>	104	13,800	197,000
30 s.	MAT	129	20,300	220,000
	<u>S. aureus</u>	102	19,500	202,000

MAT mesófilos aerobios totales

Cuadro 19. Crecimiento de *S.aureus* y mesófilos aerobios en los quesos almacenados a 37 °C (Datos expresados en UFC x 10³)

TRATAMIENTO a 72 °C .	PRUEBA	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (días)	
		1	7
sin tratamiento	MAT	135	142,000
	<u>S.aureus</u>	118	130,000
20 s.	MAT	128	208,000
	<u>S.aureus</u>	119	173,000
30 s.	MAT	130	240,000
	<u>S.aureus</u>	113	228,000

MAT mesófilos aerobios totales

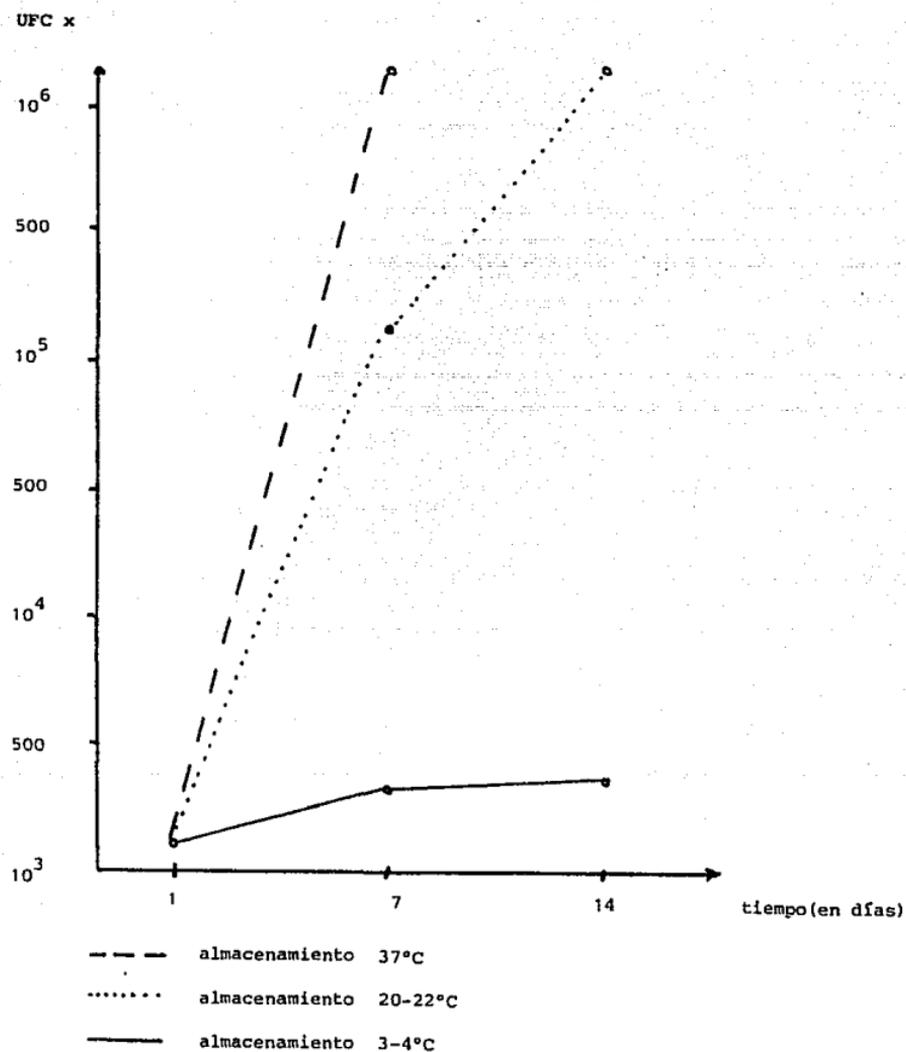
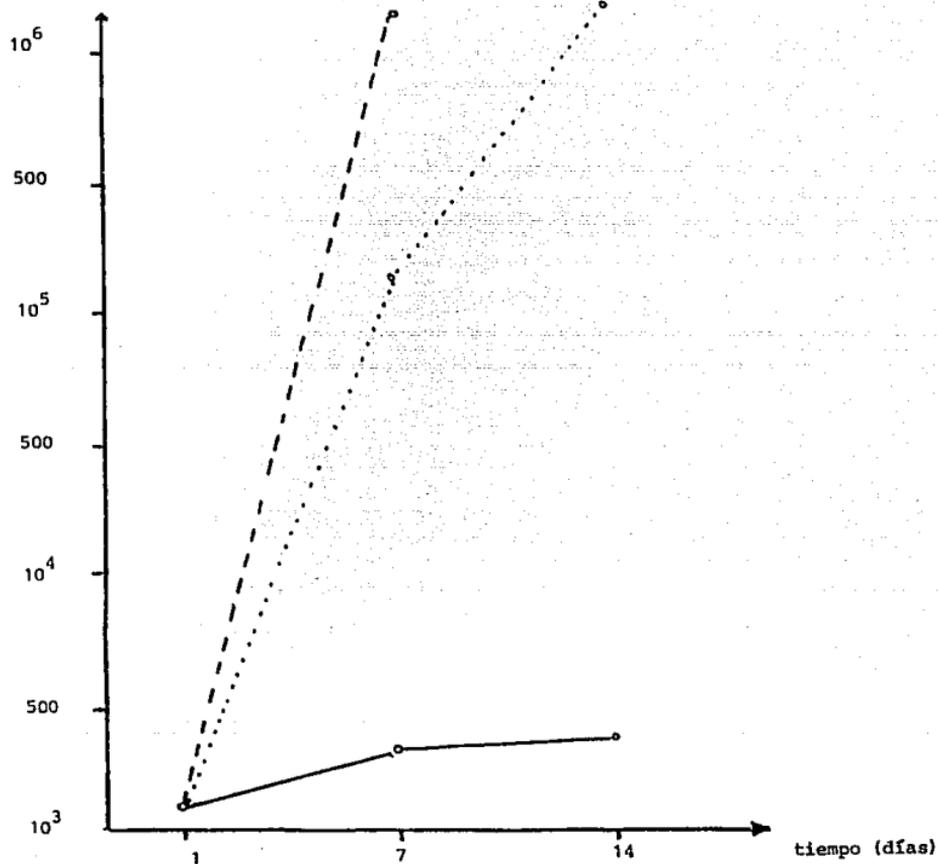


Figura 12. Crecimiento de *S. aureus* sin tratamiento térmico a las diferentes temperaturas de almacenamiento

UFC x



- almacenamiento 3-4°C
- - - almacenamiento 37°C
- almacenamiento 20-22°C

Figura 13. Crecimiento de *S.aureus* con 20 s. de trat. térm. a las diferentes temperaturas de almacenamiento

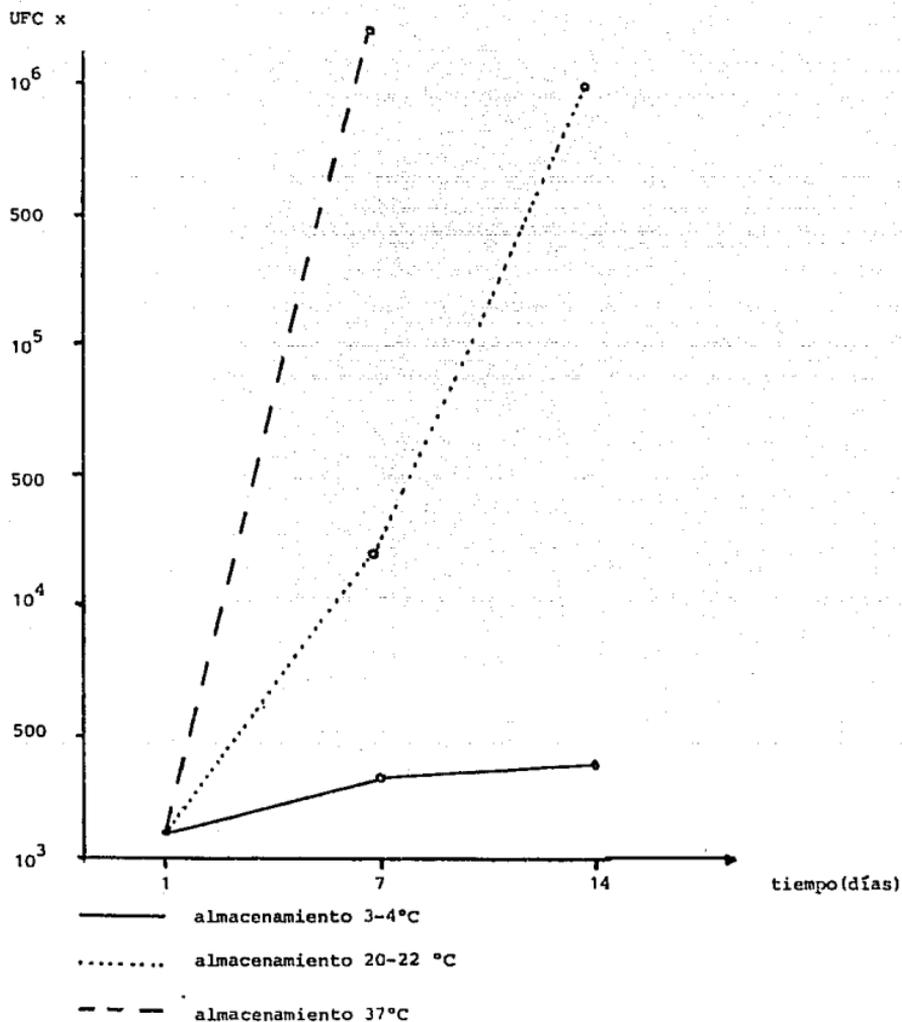
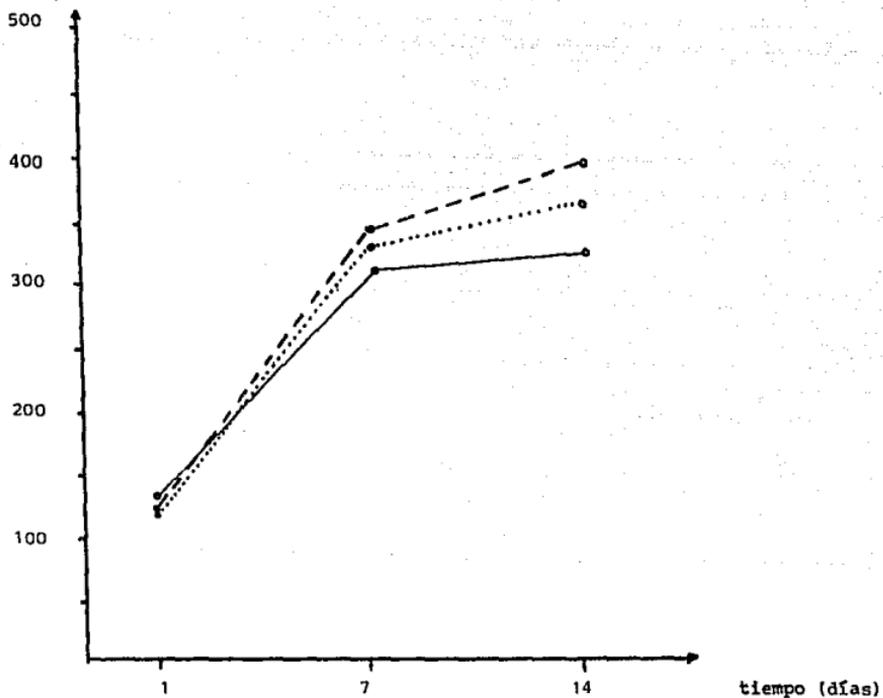


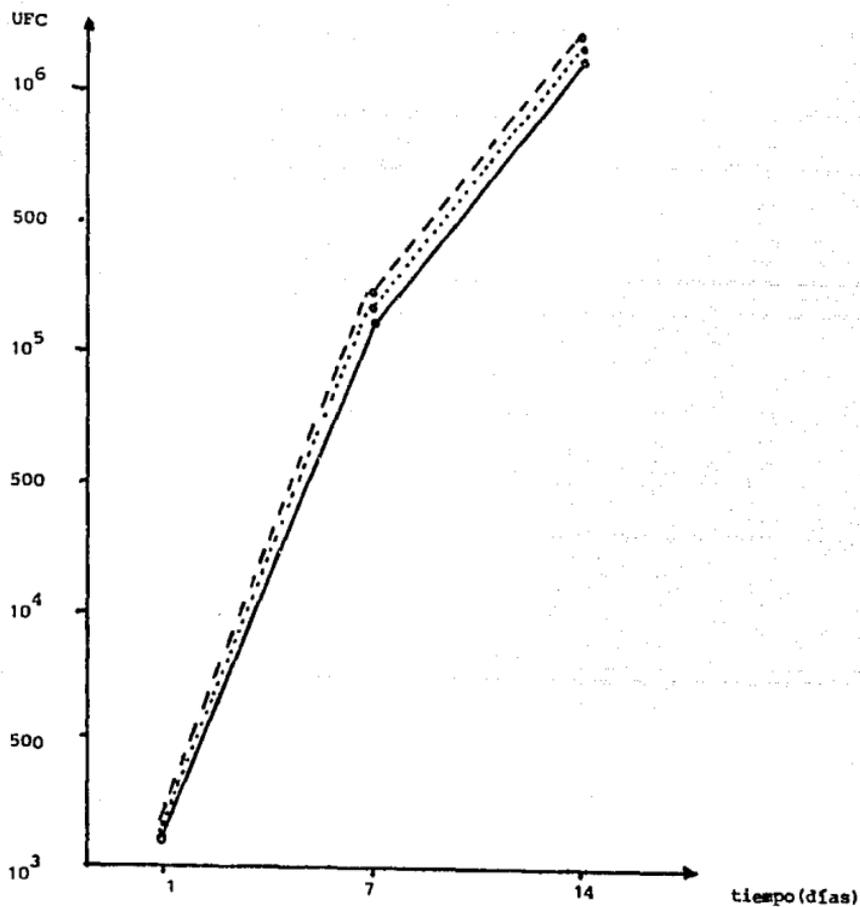
Figura 14. Crecimiento de *S.aureus* con 30 s. de tratamiento térm. a diferentes temperaturas de almacenamiento

UFC x 10³



- queso sin tratamiento
- queso con 20 s. de tratamiento
- - - queso con 30 s. de tratamiento

Figura 15. Crecimiento de S.aureus a temperatura de 3-4°C



- queso sin tratamiento
- queso con 20 s. de tratamiento
- - - queso con 30 s. de tratamiento

Figura 16. Crecimiento de S. aureus a temperatura de 20-22°C

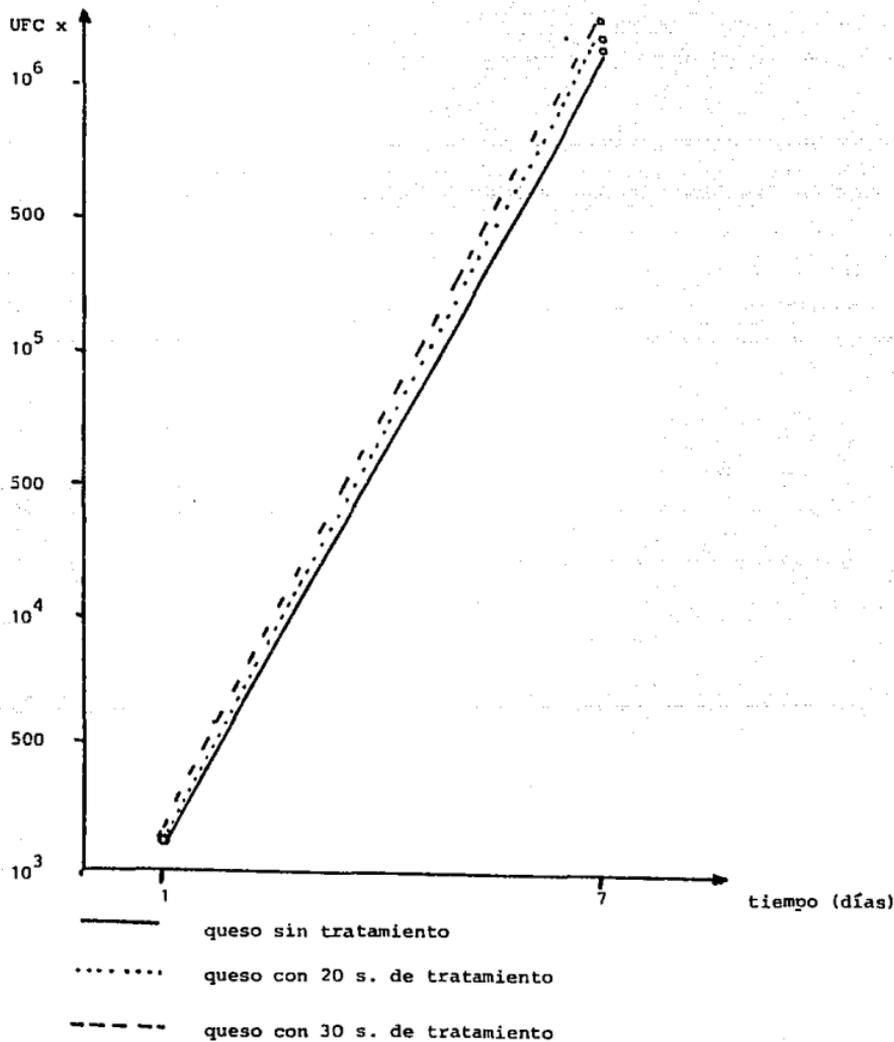


Figura 17. Crecimiento de S. aureus a temperatura de 37°C

4.11 APARIENCIA DE LOS QUESOS DURANTE SU ALMACENAMIENTO.

La apariencia de los quesos es un factor determinante para su ingestión, de manera que quesos con cuentas altas de S.aureus que presenten una apariencia física y olor desagradables como consecuencia de la flora asociada, difícilmente serán ingeridos, disminuyendo así el riesgo de intoxicación.

En forma paralela a los análisis microbiológicos en los quesos elaborados, se realizó una inspección visual durante su almacenamiento. Como se observa en el cuadro 20, los quesos refrigerados a 3-4 °C durante el periodo de almacenamiento presentan una apariencia totalmente agradable, porque la refrigeración inhibe la descomposición de los mismos, aunque no impide totalmente el crecimiento de S.aureus.

Los quesos almacenados a temperatura ambiente presentaron una ligera descomposición al final del periodo de almacenamiento debido a que la temperatura es propicia para la degradación microbiana de los principales componentes del queso: proteínas y grasas, dando olores y colores desagradables. Por otro lado, la humedad propia del queso fresco activa el crecimiento de S.aureus y otros microorganismos, generando la degradación de los componentes del queso en niveles suficientes para alterar sus propiedades organolépticas.

Los quesos almacenados a 37 °C, presentaron una apariencia desagradable desde los tres días de almacenamiento, por lo que este se suspendió a los siete días. A esta temperatura, óptima para el crecimiento de gran parte de la flora asociada, era de esperarse el desarrollo de microorganismos causantes de descomposición.

Cuadro 20. Apariencia física de los quesos durante su almacenamiento

TIEMPO (días)	TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO (°C)		
	3-4	20-22	37
1	a	a	a
7	a	a	c
14	a	b	-

a Apariencia fresca y agradable, olor fresco

b Ligero crecimiento de hongos, olor a fermentado

c Aspecto y olor desagradables

4.12 EXTRACCION Y DETECCION DE ENTEROTOXINA.

A las muestras de queso tomadas al término del almacenamiento, se les sometió al método de extracción de enterotoxina, anteriormente descrito, obteniéndose un extracto translúcido de color ligeramente amarillento. Esta solución se empleó para la identificación de la enterotoxina por el método de Inmunodifusión Radial Simple Modificada con una sensibilidad de 1 µg/ml de extracto (cuadro 21). En todos los casos se detectó la presencia de enterotoxina.

Se ha observado que cuentas de S.aureus enterotoxigenico, que se encuentran en un rango de 10^5 a 10^6 UFC/ml, son suficientes para producir enterotoxina. Por lo anterior, en los quesos almacenados a temperatura ambiente y óptima y con apariencia física desagradable en los que se alcanzó la población de microorganismos antes mencionada, existió la presencia de enterotoxina, ocurriendo este fenómeno aun en los que contenían al microorganismo dañado; ya que la temperatura y ambiente no impidieron su crecimiento por ser los adecuados para la recuperación de todas las actividades metabólicas incluyendo la producción de enterotoxina B.

En los quesos almacenados bajo refrigeración a 3-4 °C, no se presuponia la presencia de enterotoxina. De acuerdo con las condiciones aptas para la producción de toxina y recuperación de microorganismos dañados termicamente, una temperatura de 3-4 °C, impediría estos dos procesos; se ha observado que la mínima temperatura a la que se produce la enterotoxina es de 10 °C.

Por otro lado, los quesos almacenados bajo refrigeración, tuvieron una cuenta final muy baja de 10^5 que disminuiría el

riesgo de producción de enterotoxina e intoxicación.

El riesgo que presentan los quesos almacenados bajo refrigeración reside principalmente en que su apariencia física no denota la presencia del microorganismo y mucho menos de enterotoxina, por lo que podría ser consumido causando una intoxicación.

Cuadro 21. Detección de enterotoxina B en los diferentes tratamientos
a las dos semanas de almacenamiento.

TRATAMIENTO TERMICO PREVIO A 72 °C	TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO (°C).		
	3 a 4	20 a 22	37
NINGUNO	+	+	+
20 s	+*	+	+
30 s	+*	+	+

+ Detección positiva de enterotoxina

+* Poca producción de enterotoxina

5. CONCLUSIONES.

- La temperatura de 72 °C, empleada en el método del tubo capilar para ocasionar daño sub-letal en S.aureus S-6 productor de enterotoxina B, fue insuficiente para destruir al microorganismo, permaneciendo viables después de 30 s. de tratamiento térmico el 28 % de las células.

- El S.aureus S-6 inoculado en los quesos, observó un índice de crecimiento directamente proporcional a la temperatura de almacenamiento.

- El daño sub-letal ocasionado con el tratamiento térmico dado al S.aureus es mínimo, lo que le permite recuperarse rápidamente y crecer de manera normal.

- La producción de enterotoxina detectada por el método semicuantitativo de inmunodifusión radial simple modificado, se presentó en todos los quesos, aunque en menor proporción en los almacenados a temperatura de refrigeración de 3 - 4 °C, lo que implica la reactivación de su producción en los microorganismos dañados.

7. BIBLIOGRAFIA.

1. Aguirre, M.E. (1989). ELABORACION DE CASEINATO DE SODIO APARTIR DE LECHE FRESCA APTA PARA CONSUMO HUMANO Y LECHE EN POLVO DE IMPORTACION DESVIADA A ALIMENTACION ANIMAL. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autonoma de Mexico.
2. Alais, C. (1986). CIENCIA DE LA LECHE. PRINCIPIOS DE LA TECNICA LECHERA. Ed. CECSA, 6a Ed. pp.16-17, 87-140, 478-527.
3. Altbaum, J. and Sarid, S. (1985). FENICILLINASE PLASMID-LINKED GENETIC DETERMINANTS FOR ENTEROTOXINS B AND C PRODUCTION IN S.aureus. Infect. Immun. 47:514-521.
4. Andrews, D.M. (1987). MICROBIOLOGICAL METHODS. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70:87.
5. Angelotti, R., Foter, M.J. and Lewis, R.H. (1961). TIME-TEMPERATURE EFFECTS ON Salmonella AND Staphylococci IN FOODS. 1. BEHAVIOR IN REFRIGERATED FOODS. Am. J. Public Health. 51:76-83.
6. Auclair, J. (1964). SUBSTANCES ANTIBACTERIENNES DU LAIT CRU. Report 4o. Symp. Intern. Microbiol. Alim., Goteborg.
7. Baird-Parker, A.C. (1962). AN IMPROVED DIAGNOSTIC AND SELECTIVE MEDIUM FOR ISOLATING COAGULASE POSITIVE Staphylococci. J. Appl. Bacteriol. 25:12-19.
8. Baird-Parker, A.C. (1962). THE OCCURENCE AND ENUMERATION, ACCORDING TO A NEW CLASSIFICATION, OF Micrococci AND Staphylococci IN BACON AND HUMAN AND PIG SKIN. J. Appl. Bacteriol. 25:352-361.
9. Baird-Parker, A.C. (1963). A CLASSIFICATION OF Micrococci AND Staphylococci BASED ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL TEST. J. General Microbiol. 30:409-427.
10. Baird-Parker, A.C. (1974). FAMILY I: Micrococaceae. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. Ed. R.E. Buchnam y N.E. Gigns. 8a Ed. Williams, Co. Baltimore, USA. pp. 478-489.
11. Banwart, J.G. (1979). MICROBIOLOGIA BASICA DE LOS ALIMENTOS. Avi Pub. Co. Inc. Westport, Conn. USA. pp. 226-250.
12. Beery, J.T., Taylor, S.L., Schlunz, L.R., Freed, R.C. and Bergdoll, M.S. (1984). EFFECTS OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN A ON THE RAT GASTROINTESTINAL TRACT. Infect. Immun. 44:234-240.
13. Bergdoll, M.S. (1970). ENTEROTOXINS. IN MICROBIAL TOXINS. Vol. III. S.J. Ajl, T.C. Montie and S. Kadis (Eds). Academic Press, New York. pp. 265-296.
14. Bergdoll, M.S. (1972). THE ENTEROTOXINS. IN THE Staphylococci. Ed. J.O. Cohen Wiley Interscience. USA.

15. Bergdoll, M.S. (1979). STAPHYLOCOCCAL INTOXICATION. IN FOOD BORN INFECTIONS AND INTOXICATIONS. H. Riemann and F.L. Bryan (Eds). 2a. Ed. Academic Press, New York. pp. 443-494.
16. Bergdoll, M.S., Bennett, R.W. (1979). STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS. IN COMPENDIUM OF METHODS FOR THE MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS. Speack, M.L. (Ed). Washington. D.C.: American Public Health Association. pp. 387-416, 428-457.
17. Bergdoll, M.S. and Reiser, R. (1980). APPLICATION OF RADIOIMMUNOASSAY FOR DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS IN FOODS. J. Food Protect. 43:68-72.
18. Bergdoll, M.S. (1986). THE ROLE OF THE STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN IN STAPHYLOCOCCAL DISEASE. IN BACTERIAL PROTEIN TOXIN. P. Falmagne, et. al. (Eds). 2b1. Bacteriol. Microbiol. Hyg. 1, Suppl. 15:321-326.
19. BOLETIN DE INFORMACION OPORTUNA DEL SECTOR ALIMENTARIO. (1990). INEGI. No. 59.
20. Bradshaw, L.J. (1976). MICROBIOLOGIA DE LABORATORIO. Ed. El Manual Moderno, S.A. 3a. Ed. México D.F.
21. Brock, T.D., Smith, D.W. and Madigan, M.T. (1987). MICROBIOLOGIA. Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. 4a. Ed. Mexico D.F.
22. Bryan, F.L., Fanelli, M.J. and Riemann, H. (1979). FOOD BORNE INFECTIONS AND INTOXICATIONS. 2a. Ed. Academic Press, N.Y.
23. Busta, F.F. (1976). PRACTICAL IMPLICATIONS OF INJURED MICROORGANISMS IN FOODS. J. Milk Food Technol. 39:138-145.
24. Carpenter, D.F. and Silverman, G.J. (1974). STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B AND NUCLEASE PRODUCTION UNDER CONTROLLED DISSOLVED OXYGEN CONDITIONS. Appl. Microbiol. 28:628-637.
25. Chirife, J., Vaamonde, G. and Scarmato, G. (1982). ON THE MINIMAL WATER ACTIVITY FOR THE GROWTH OF S.aureus. J. Food Sci. 47:2054-2057.
26. Collins-Thompson, D.L., Hurst, A. and Kruse, H. (1973). GROWTH AND ENTEROTOXIN B SYNTHESIS BY S.aureus S-6 AFTER RECOVERY FROM HEAT INJURY. Can. J. Microbiol. 19:1463-1468.
27. Compaire, F.C. (1976). QUESOS, TECNOLOGIA Y CONTROL DE CALIDAD. 2a. Ed. Publicaciones de Extension Agraria. p 23.
28. COMPENDIUM OF METHODS FOR THE MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS. (1976). American Public Health Ass. A.P.H.A. USA.
29. Corry, J.E. (1974). THE EFFECT OF SUGARS AND POLYOLS ON THE HEAT RESISTANCE OF Salmonella. J. Appl. Bacteriol. 37:31-43.

30. CURSO INTERNACIONAL SOBRE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS. (1991). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Microbiología Sanitaria. IPN. Mexico D.F.
31. Daguet, I. (1977). EXAMENES DE LABORATORIO TECNICO EN BACTERIOLOGIA. TOMO I: AEROBIOS. ED. Jims. Barcelona. Esp. pp. 93-102.
32. Dietrich, G., Watson, R.J. and Silverman, G.J. (1972). EFFECT OF SHAKING SPEED ON THE SECRETION OF ENTEROTOXIN B BY S.aureus. Appl. Microbiol. 24: 561-566.
33. Doorne, H.V., Pauwels, H.P. and Mossel, D.A. (1982). SELECTIVE INSOLATION AND ENUMERATION OF LOW NUMBERS OF S.aureus BY A PROCEDURE THAT RELIES ON ELEVATED TEMPERATURE CULTURING. Appl. Environ. Microbiol. 44:1459-1462.
34. Egan, H. (1988). ANALISIS QUIMICO DE ALIMENTOS DE FEARSON. Ed. CECSA. 3a. Ed Mexico D.F.
35. Fey, H., Pfister, H. and Ruegg, O. (1984). COMPARATIVE EVALUATION OF DIFFERENT ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY SYSTEMS FOR THE DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS A, B, C AND D. J. Clin. Microbiol. 19:34-38.
36. Firstenberg-Eden, R., Rosen, B. and Mannheim, C.H. (1977). DEATH AND INJURY OF S.aureus DURING THERMAL TREATMENT OF MILK. Can. J. Microbiol. 23:1034-1037.
37. FOOD BORNE INFECTIONS. IX. STAPHYLOCOCCAL INTOXICATIONS. M.S. Bergdoll. Academic Press Inc. pp. 443-447.
38. Frazier, W.C. (1981). MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS. Ed. Acribia. 2a. Ed. Zaragoza, Esp.
39. Galesloot, T.E. (1953). SOME ASPECTS OF THE BACTERIOLOGY OF PASTEURIZED MILK. Neth. Milk Dairy J. 7:1-13.
40. Genigeorgis, C. and Sadler, W.W. (1966). EFFECT OF NaCl AND pH ON ENTEROTOXIN B PRODUCTION. J. Bacteriol. 92:1383-1387.
41. Genigeorgis, C., Riemann, H. and Sadler, W.W. (1969). PRODUCTION OF ENTEROTOXIN B IN CURED MEATS. J. Food Sci. 34:62-68.
42. Genigeorgis, C., Foda, M.S., Mantis, A. and Sadler, W.W. (1971). EFFECTS OF NaCl AND pH ON ENTEROTOXIN C PRODUCTION. Appl. Microbiol. 21:862-866.
43. Hobbs, B.C. (1962). STAPHYLOCOCCAL AND C.welchii FOOD POISONING. IN FOOD POISONING. Royal Society of Health. London. pp. 49-59.
44. Hobbs, B.C. and Olson, J.C. (1971). SYMPOSIUM ON THE RESTORATION OF SUBLETHALLY IMPAIRED BACTERIAL CELLS IN FOODS. J. Milk Food Technol. 34:548-552.

45. Huones, A. and Hurst, A. (1976). MAGNESIUM REQUIREMENTS OF S. aureus AFTER SUBLETHAL HEATING. Can. J. Microbiol. 22:1202-1205.
46. Hurst, A., Huones, A., Beare-Rogers, J.L. and Collins-Tompson, D.L. (1973). PHYSIOLOGICAL STUDIES ON THE RECOVERY OF SALT TOLERANCE BY S. aureus AFTER SUBLETHAL HEATING. J. Bacteriol. 91:134-142.
47. Hurst, A., Hendry, G.S., Hughes, A.A. and Faley, B. (1976). ENUMERATION OF SUBLETHALLY HEATED Staphylococci IN SOME DRIED FOODS. Can. J. Microbiol. 22:677-683.
48. Hurst, A. and Hughes, A. (1983). THE PROTECTIVE EFFECT OF SOME FOOD INGREDIENTS ON S. aureus. J. Appl. Bacteriol. 55:81-88.
49. Iandolo, J.J. and Ordal, Z.J. (1966). REPAIR OF THERMAL INJURY OF S. aureus. J. Bacteriol. 91:134-142.
50. Jay, J.M. (1978). MICROBIOLOGIA MODERNA DE LOS ALIMENTOS. Ed. Acribia. 2a. Ed. Zaragoza, Esp.
51. Johnson, H.M., Bukovic, J.A. and Kauffmann, F.E. (1973). STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS A AND B: SOLID-PHASE RADIOIMMUNOASSAY IN FOOD. APPL. MICROBIOL. 26:309-313.
52. Jones, C.L. and Saleem, A.K. (1986). NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE ENTEROTOXIN B GENE FROM S. aureus. J. Bacteriol. 166:29-33.
53. Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R. and Sommers, H.M. (1989). DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO. Ed. Medica Panamericana. México D.F.
54. Kosikowski, F.V. y Moquot, G. (1958). RECIENTES PROGRESOS EN LA TECNOLOGIA DEL QUESO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. pp. 1-6.
55. Kuo, J.K. and Silverman, G.J. (1980). APLICATION OF ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS IN FOOD. J. Food Protect. 45:404-407.
56. Kuzdzał-sardie, S., Moquot, G. (1960). OBSERVATIONS SUR LES QUALITES ORGANOLEPTIQUES DU LAIT. Ann. Technol. Agric. 1:5-52.
57. Lachica, F.V.R., Weiss, K.F. and Derbel, R.H. (1969). RELATIONSHIPS AMONG COAGULASE, ENTEROTOXIN AND HEAT STABLE DESOXIRIBONUCLEASE PRODUCTION BY S. aureus. Appl. Microbiol. 18:126-127.
58. Lachica, F.V.R., Barry, A.L. and Atchinson, F.W. (1973). IDENTIFICATION OF S. aureus BY SIMULTANEOUS USE OF TUBE COAGULASE AND TERMONUCLEASE TESTS. Appl. Microbiol. 25:496-497.
59. Lachica, F.V.R. (1980). ACCELERATED PROCEDURE FOR THE ENUMERATION AND IDENTIFICATION OF FOOD-BORNE S. aureus. Appl. Microbiol. 29:17-19.

60. Lobato, C. (1987). EFECTO DE LA ADICION DE CASEINATO DE SODIO, EN EL RENDIMIENTO Y LAS PROPIEDADES REOLOGICAS DE QUESO FRESCO TIPO FANELA MODIFICADO. Tesis de Maestria. Universidad Iberoamericana. México D.F.
61. Lotter, P.L. and Genigeorgis, C.A. (1975). DEOXYRIBONUCLEIC ACID BASE COMPOSITION AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF CERTAIN COAGULASE-NEGATIVE ENTEROTOXIGENIC COCCI. Appl. Microbiol. 29:152-158.
62. MacFaddin, J.F. (1984). PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLINICA. Ed. Panamericana. México. D.F.
63. McLean, F.A., Lilly, H.D. and Alford, J.A. (1968). EFFECTS OF MEAT-CURING SALTS AND TEMPERATURE ON PRODUCTION OF Staphylococcus ENTEROTOXIN B. J. Bacteriol. 95:1207-1211.
64. Mendoza, M.E. (1980). PRACTICAS DE LABORATORIO: TECNOLOGIA DE ALIMENTOS CARNICOS. Instituto Nacional de la Nutrición. Salvador Zubiran.
65. Metzger, J.F., Johnson, A.D., Collins, W.S. and McGann, V. (1973). S. aureus ENTEROTOXIN B RELEASE UNDER CONTROLLED CONDITIONS OF FERMENTATIONS. Appl. Microbiol. 25:770-773.
66. Meyer, R.F. and Palmieri, M.J. (1980). SINGLE RADIAL IMMUNODIFFUSION METHOD FOR SCREENING STAPHYLOCOCCAL ISOLATES FOR ENTEROTOXIN. Appl. Environ. Microbiol. 40:1080-1085.
67. Miller, R.D., Fung, D.Y.C. (1977). AMINO ACID REQUIREMENTS FOR THE PRODUCTION OF ENTEROTOXIN B BY S. aureus S-6 IN A CHEMICALLY DETINED MEDIUM. Appl. Microbiol. 25:800-806.
68. Minor, T.E. and Marth, E.H. (1971). S. aureus AND STAPHYLOCOCCAL FOODS INTOXICATIONS. A Review. I.J. Milk Food Tech. 34:557-564.
69. Minor, T.E. and Marth, E.H. (1972). LOSS OF VIABILITY BY S. aureus IN ACIDIFIED MEDIA. INACTIVATION BY SEVERAL ACIDS, MIXTURES OF ACID AND SALTS OF ACID. J. Milk Food Tech. 35:191-196.
70. Mocquot, G., Alais, C. Auclair, J. y Blanc patin, E. (1952). COMPOSITION DES LAITS DE MAMMITE. Ann. Technol. Agric. INRA. p. 241.
71. Felczar, M.J., Reid, R.D. y Chan, E.C.S. (1981). MICROBIOLOGIA. Ed. McGraw Hill. México, D.F. pp. 717-734.
72. Pérez Gavilán, E.J. (1984). BIOQUIMICA Y MICROBIOLOGIA DE LA LECHE. Ed. Limusa. México, D.F. pp. 69-88, 129-135, 176-182.
73. Portmann, A., Plommet, M. y Auclair, J. (1960). CARACTERE IMMUNOLOGIQUE DES LACTENINES. Ann. Inst. Pasteur. 98:902.

74. Potter, N. (1973). LA CIENCIA DE LOS ALIMENTOS. E.D.U.T.E.X. S.A. Mexico, D.F. pp. 408-429.
75. Reichert, C.A. and Fung, D.Y.C. (1975). Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 18:1041-1043.
76. Reiser, R.D., Conaway, D. and Bergdoll, M.S. (1974). DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN IN FOOD. Appl. Microbiol. 27:83-85.
77. Revilla, A. (1977). TECNOLOGIA DE LA LECHE. Herrero Hermos Sucesores, S.A. Sa. Ed. p. 11.
78. Reyes, L., Mota, L., Costarrica, L. y Parrilla. (1984). DETERMINACION DE LA ENTEROTOXIGENICIDAD DE CEPAS DE S.aureus AISLADAS DE QUESOS. Rev. Lat-amer. Microbiol. 26:277-283.
79. Robbins, R., Gould, S. and Bergdoll, M.S. (1974). DETECTING THE ENTEROTOXIGENICITY OF S.aureus STRAINS. Appl. Microbiol. 28:946-950.
80. Robbins, R. and Bergdoll, M.S. (1983). PRODUCTION OF RABBIT ANTISERA TO THE STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS. J. Food. Protect. 47:172-176.
81. Rowland, S.J. (1938). THE DETERMINATION OF NITROGEN DISTRIBUTION IN MILK. J. Dairy Res. 9:42.
82. Russell, F.E. (1968). THE SAFETY OF FOODS. H.D. Graham Editors. Avi Publishing Co. Westport, Conn.
83. SAMPLING FOR MICROBIOLOGICAL ANALYSIS. (1978). International Commission on Microbiological Specification for Food (ICMSF). 2a. Ed. Academic Press Ass. Toronto, Can.
84. Santos, M.A. (1987). LECHE Y SUS DERIVADOS. Ed. Trillas. 1a. Ed. pp.27-33.
85. Scheusner, D.L., Hood, L.L. and Harmon, L.G. (1973). EFFECT OF TEMPERATURE AND pH ON GROWTH AND ENTEROTOXIN PRODUCTION BY S.aureus. J. Milk Food Technol. 36:249-252.
86. Scheusner, D.L. and Harmon, L.G. (1973). GROWTH AND ENTEROTOXIN PRODUCTION BY VARIOUS STAINS OF S.aureus IN SELECTED FOODS. J. Food Sci. 38: 474-476.
87. Smith, J.L., Benedict, R.C. and Palumbo, S.A. (1982). PROTECTION AGAINST HEAT-INJURY IN S.aureus. J. Food. Protect. 45:54-58.
88. Smith, J.L., Buchanan, R.L. and Palumbo, S.A. (1982). EFFECT OF FOOD ENVIRONMENT ON STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN SYNTHESIS. J. Food Protect. 46:545-555.
89. Smith, J.L., Benedict, R.L. and Kalinowski, S.M. (1985). SOLUTES THAT PROTECT S.aureus AGAINST HEAT-INDUCED INJURY AND THEIR EFFECT ON CELLULAR LEAKAGE. J. Food Protect. 48:600-607.

90. Stanier, R.Y., Doudoroff, M. y Anelberg, E.A. (1966). MICROBIOLOGIE GENERALE. Masson et Cie, Paris.
91. Sokari, T.G. and Anozie, S.O. (1989). MODIFIED SINGLE RADIAL IMMUNODIFFUSION METHOD FOR SCREENING STAPHYLOCOCCAL ISOLATES FOR ENTEROTOXIN. Food Microbiol. 6:45-48.
92. Sugiyama, H. (1951). STUDIES OF FACTORS AFFECTING THE HEAT RESISTANCE OF SPORES OF C. botulinum. J. Bacteriol. 62:81-90.
93. Tatini, S.R. (1973). INFLUENCE OF FOOD ENVIRONMENTS ON GROWTH OF S. aureus AND PRODUCTION OF VARIOUS ENTEROTOXINS. J. Milk Food Technol. 36:559-563.
94. Tatini, S.R., Stein, S.A. and Soo, H.M. (1976). INFLUENCE OF PROTEIN SUPPLEMENTS ON GROWTH OF S. aureus AND PRODUCTION OF ENTEROTOXINS. J. Food Sci. 41:133-135.
95. Thota, F.H., Tatini, S.R. and Bennett, R.W. (1973). EFFECT OF TEMPERATURE, pH, AND NaCl ON PRODUCTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS E AND F. Abst. Am. Soc. Microbiol. Ann. Meeting, p.1.
96. Troller, J. (1986). WATER ACTIVITY OF FOOD BORNE BACTERIAL PATHOGENS. J. Food Protect. 49:656-670.
97. Veissevre, R. (1980). LACTOLOGIA TECNICA. Ed. Acirbia. Mexico, D.F. pp. 1-3.
98. Walker, G.C. and Harmon, L.G. (1966). THERMAL RESISTANCE OF S. aureus IN MILK, WHEY AND PHOSPHATE BUFFER. Appl. Microbiol. 14: 584-590.
99. Weeb, B.H., Johnson, A.H. and Alford, J.A. (1974). FUNDAMENTALS OF DAIRY CHEMISTRY. 2a. Ed. The Avi Publishing Com, Inc. Westport, Conn. pp. 73,700.
100. Weir, D.M. (1985) HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY. Blackwell Scientific Publications. 4a. Ed. Oxford.
101. White, D.G., Mantus, J.S., Hamon, R.J. and Langlais, B.E. (1988). A COMPARISON OF SIX SELECTIVE MEDIA FOR THE ENUMERATION AND ISOLATION OF STAPHYLOCOCCI. J. Food Protect. 51: 685-690

IMPRESOS "ALMA"

**TESIS - LIBROS - FOLLETOS
TRIPTICOS Y REVISTAS
EN OFFSET**

**Mariana R. del Toro de Lazarín No 28 "C"
Entre Chile y Allende, C.P. 06010
Col. Centro, México, D.F.**

ESTA TESIS FUE ELABORADA EN ESTE ESTABLECIMIENTO