



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

"INCIDENCIA DE *Brochothrix thermosphacta*
EN PIERNA FRESCA DE CERDO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
ORIENTACION ALIMENTOS
P R E S E N T A :
NATALIA ALARCON VAZQUEZ



MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: PROF. BISERKA SVESHTAROVA PEKARKOVA.
Vocal: PROF. ZOILA NIETO VILLALOBOS.
Secretario: PROF. MERCEDES PALAO RINCÓN.
1er. Suplente: PROF. EDUARDO MENDOZA MARTÍNEZ.
2do Suplente: PROF. BEATRIZ DE GUADALUPE SERRANO LÓPEZ.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ANEXO DEL LABORATORIO 1-D
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE QUÍMICA, U.N.A.M.

SUSTENTANTE:

Natalia Alarcón Vázquez
NATALIA ALARCÓN VÁZQUEZ.

ASESOR DEL TEMA:

B. Sveshtarova
BISERKA SVESHTAROVA PEKARKOVA.

A Dios por concederme la vida y la oportunidad de culminar éste trabajo.

A mis padres Rosa María Vázquez Sánchez y Arturo Alarcón Ibarra por su amor, por lo que me han enseñado y por todo lo que de ellos recibo.

A mis hermanos Arturo y Andrés por su amor y por ser parte de mi familia.

A mis tíos Margarita, Esperanza, Leonor, Alicia, Tomás y Erasmo por la ayuda tan valiosa que en su momento me brindaron.

A Joel por todo lo que juntos hemos aprendido, por su amor y ayuda incondicional, siempre.

Un agradecimiento especial a la M. en C. Biserka Sveshtarova Pekarkova, porque gracias a su valiosa ayuda fue posible la realización de este trabajo.

A todas las personas que de una o de otra forma me brindaron su apoyo.

A todos mis maestros por contribuir a mi formación.

A la Facultad de Química por ser única y bella.

A la UNAM por permitirme ser parte de su grandeza.

¿Cuál fue el propósito de Dios al crear el Universo ?.

Einstein.

La fuerza de la razón es tal que nos permite descubrir mundos maravillosos, y al mismo tiempo lograr la conquista de metas muchas veces insospechadas.

Vasconcelos.

INDICE

	Páginas
Capítulo I. Introducción	3
Objetivo	7
Capítulo II. Generalidades	
2.1 Características químicas de la carne	8
2.2 Factores que favorecen el desarrollo microbiano en la carne	9
2.2.1 Factores intrínsecos	9
2.2.2 Factores extrínsecos	14
2.2.3 Factores implícitos	18
2.3 Microorganismos relacionados con la alteración de la carne	20
2.4 Alteraciones en la carne	31
2.4.1 Alteraciones ocasionadas por microorganismos aerobios	32
2.4.2 Alteraciones ocasionadas por microorganismos anaerobios	34
2.5 Microorganismos deteriorantes de la carne fresca de cerdo	35
2.6 Flora contaminante de la carne empacada	45
2.7 Características de <i>Bruchothrix thermosphacta</i>	50

2.7.1	Temperatura de crecimiento	56
2.7.2	Naturaleza de la termosensibilidad de los microorganismos psicrótrofos	58
2.7.3	Pleomorfismo celular	62
2.7.4	Metabolismo aerobio	63
Capítulo III	Metodología	65
3.1	Toma de muestra	65
3.2	Morfología colonial	66
3.3	Pruebas bioquímicas generales	67
3.4	Morfología microscópica	68
3.5	Medición celular	69
3.4	Pruebas bioquímicas específicas	70
Capítulo IV	Resultados y Discusión de resultados	72
Capítulo V	Conclusiones	112
Capítulo VI	Recomendaciones	113
Capítulo VII	Bibliografía	114
Capítulo VIII	Anexo	122

CAPÍTULO I

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La carne fresca es un producto altamente perecedero, por lo cual debe de manejarse con especial cuidado durante todas las operaciones de procesado ya que de no ser así, las alteraciones y la descomposicion del tejido muscular se llevaran a cabo en un periodo de tiempo muy corto

Cabe mencionar que los cambios postmortales, asociados con la conversion de la canal en cortes menores, el almacenamiento y manipulacion, se acompañan de cierto deterioro cualesquiera que sean las precauciones tomadas durante el procesado y su manipulacion (Forrest, 1979)

Aunque cada uno de los cambios alterativos contribuye a la no aceptacion de la carne, el mayor problema durante su manipulacion y almacenamiento en condiciones adecuadas, es la contaminacion y actividad microbiana (Guerrero y Calderon, 1994)

La contaminacion por microorganismos se puede originar durante el proceso de obtencion de la canal, al entrar en contacto con utensilios o material y equipo sucios, a traves de las manos y vestimenta de manipuladores desaseados, por gotas de agua y polvo procedentes de un ambiente contaminado, por las particulas desprendidas de cueros, pieles, pezuñas y en el eviscerado, ya que la ruptura del intestino contamina la canal al ensuciar la carne con heces y una vez que los microorganismos se encuentran en la carne, raramente se puede controlar o inhibir por completo su actividad deteriorante (Noskowa, 1972, Jay, 1992).

Cuando la carne se obtiene de animales sanos sacrificados en condiciones higiénicas, los microorganismos se localizan únicamente en la superficie

En la carne fresca sin empacar, el número de generos bacterianos presentes, es muy grande. Dicha flora esta conformada aproximadamente por unos 3-4 generos bacterianos, 13 géneros de mohos y 6 generos de levaduras, mientras que cuando la carne se encuentra empacada, la flora deteriorante se reduce considerablemente a unos cuantos generos bacterianos, siendo los de mayor importancia *Lactobacillus*, *Enterobacterias*, *Brochothrix*, *Carnobacterium* y *Clostridium* (Jay, 1994).

Debido a las características intrínsecas de la carne, el crecimiento microbiano se ve favorecido por factores tales como, el contenido de humedad, el pH, el potencial oxidoreducción, y presencia o ausencia de barreras o sustancias inhibidoras (Guerrero y Calderón, 1994).

Sin embargo los factores que ejercen la máxima influencia en el crecimiento de los microorganismos en la carne son, la temperatura de almacenamiento, la humedad y la disponibilidad de oxígeno (Jay, 1992; Jürgen, 1987; Noskova, 1972)

El empleo de bajas temperaturas es uno de los procedimientos mas efectivos para controlar el crecimiento microbiano. En los conteos comparativos entre la carga bacteriana de la carne a su entrada a las camaras, y la carga existente durante la conservacion por refrigeracion, se advierte una reduccion importante en el número de germenés. Ocurre que

en los cultivos donde conviven microorganismos distintos, solo los mas capaces se reproducen. Son éstos un determinado grupo de psicrófilos mismos que alcanzan una característica cifra maxima (Noskowa, 1972).

Al mismo tiempo que crecen los diferentes microorganismos, que componen la microflora de un producto, se pueden presentar asociaciones antagonicas o sinérgicas, mismas que tienen una influencia definitiva con respecto al tipo de flora contaminante presente en la carne (Jay, 1992, Jurgén, 1987, Noskowa, 1972).

Cuando la conservación de los alimentos se realiza combinando el control de la temperatura con otros procedimientos auxiliares, como el envasado en condiciones de anaerobiosis, entre otros, se logra reducir la flora contaminante a especies psicrófilas y anaerobias (Noskowa, 1972).

Generalmente en la carne fresca, *Pseudomonas* esta presente en cuentas elevadas, lo que trae como consecuencia que otras especies contaminantes tengan una baja incidencia, tal es el caso de *Brochothrix thermosphacta* (Gill y Newton, 1978, Jay, 1992).

Brochothrix thermosphacta es un microorganismo aerobio facultativo y lo mismo se encuentra en la carne fresca sin empacar que en la carne empacada bajo atmósferas controladas, aunque cabe señalar que en esta última, la incidencia de este organismo es mayor que en la carne fresca (Gardner, Carson y Patton, 1967).

El presente trabajo tiene como propósito, determinar la incidencia que tiene *Brochothrix thermosphacta* en distintas muestras de pierna fresca de cerdo, debido a que es uno de los microorganismos responsables del deterioro de la carne al producir olores y sabores sumamente desagradables.

Para llevar a cabo este estudio, se eligió la pierna de cerdo tomando en cuenta que en las partes bajas del cuerpo del animal, las cuentas microbianas son considerablemente más elevadas que en otras piezas de la misma canal (Jurgen, 1987).

JUSTIFICACIÓN

Brochothrix thermosphacta es un microorganismo que tiene como habitat natural el suelo y su presencia en el tejido muscular de los animales de abasto, se encuentra asociado con una contaminación procedente del mismo. En nuestro país, solamente se toman en cuenta los microorganismos de importancia para salud pública al momento de realizar un estudio microbiológico de la carne destinada para consumo humano, para conocer la calidad sanitaria de la misma, dejando de lado a un gran número de microorganismos responsables de la alteración del alimento, tal es el caso de *Brochothrix thermosphacta*, el cual debido a su crecimiento y actividad metabólica, genera olores y sabores desagradables ocasionando con ello importantes pérdidas económicas.

En México, en los últimos 20 años no se ha realizado ningún trabajo de investigación experimental sobre *Brochothrix thermosphacta*, razón por la cual se consideró conveniente llevar a cabo un estudio para el aislamiento e identificación de dicho microorganismo a partir de diferentes muestras de pierna fresca de cerdo.

En países como Inglaterra, *Brochothrix thermosphacta* está incluido dentro del grupo de microorganismos de importancia económica presentes en la carne y responsables del deterioro de la misma. Al tener un control sobre este tipo de flora, es posible incrementar

considerablemente la vida de anaquel, tanto de la carne fresca como de los productos carnicos, con lo que se evitan grandes perdidas económicas

Con el presente trabajo se pretende contribuir a divulgar la importancia que tiene la presencia de *Brochothrix thermosphacta* en la pierna fresca de cerdo, así como la metodología para el aislamiento e identificación de dicho microorganismo

OBJETIVO

Aislar, identificar y determinar la incidencia de *Brochothrix thermosphacta* a partir de diferentes muestras de pierna fresca de cerdo

CAPÍTULO II

GENERALIDADES

2.1 Características químicas de la carne,

La carne siempre ha sido considerada en todo el mundo como un alimento con un alto valor nutricional. En el caso específico de la carne roja procedente de mamíferos, el músculo está formado por elementos miofibrilares contractiles y proteínas sarcoplasmicas solubles, una cuarta parte de su peso es tejido conjuntivo y dependiendo de la especie de abasto de que se trate, una tercera parte puede ser grasa (ICMSF, 1980)

El tejido conjuntivo, el tendinoso y el adiposo son considerados como barreras naturales que posee la carne, las cuales retardan el ataque microbiano. Cuando estas barreras son eliminadas, el tejido muscular queda más expuesto, razón por la cual el deterioro de la carne es más rápido en los puntos de seccion en donde las fibras musculares han sido cortadas transversalmente (ICMSF, 1980, Guerrero y Calderon, 1994)

La composición química de la carne varía según la especie, edad, sexo, raza y corte (Tabla 1). Estas diferencias influyen de manera decisiva determinando la microflora característica de cada tipo de carne.

El agua es el componente mayoritario en peso, mientras que las proteínas representan la fracción más importante de la materia seca del músculo. Los porcentajes de agua y proteínas se mantienen relativamente constantes en las diferentes especies animales y varían única e inversamente en función del contenido de grasa (Flores, 1983, Paltrinieri, 1984, Price, 1976)

Tabla 1. Composición aproximada de músculo de diferentes especies (Flores,1983)

Componentes	Porcino	Vacuno	Ovino	Pollo
	%	%	%	%
Agua	68-72	70-75	70-75	70-75
Proteínas	18-20	20-25	20-22	20-25
Grasa	5-12	4-8	5-10	4-6
Comp. nitrogenados no proteicos		del orden de 1.5		
Carbohidratos		del orden de 1.0		
Minerales		del orden de 1.0		

2.2 FACTORES QUE FAVORECEN EL DESARROLLO

MICROBIANO EN LA CARNE

2.2.1 FACTORES INTRÍNSECOS

El tejido muscular, posee ciertas características internas que favorecen la proliferación microbiana, entre las que se encuentran, agua disponible para el crecimiento microbiano (a_w), valores de potencial oxido-reducción bajos y pH cercano al pH óptimo de crecimiento de los microorganismos responsables de la descomposición de la carne.

Cuando el animal es sacrificado, en el tejido muscular, ocurren toda una serie de cambios enzimáticos que influyen en la carga microbiana (Fig. 1), por ejemplo, cesa el aporte de oxígeno y se provoca una glucólisis anaerobia que produce ácido láctico lo que ocasiona, una disminución del pH y como consecuencia se logra una reducción importante de la carga microbiana (Carballo, 1991)

AGUA DISPONIBLE EN EL TEJIDO MUSCULAR

Desde el punto de vista microbiológico la propiedad más importante que presenta la carne, es su alto contenido de agua que corresponde a un 70-75%, de aproximadamente 0.99, lo que permite el crecimiento de la mayoría de los microorganismos. Para evitar dicho crecimiento se debe de eliminar una gran cantidad de agua de la superficie. El músculo contiene aproximadamente un 75% de agua en la que se encuentran disueltos una gran variedad de sustratos importantes para el crecimiento microbiano, por lo que se considera que el músculo es un medio apto para el desarrollo de una gran cantidad de microorganismos y en especial de bacterias, a quienes favorecen las condiciones de humedad (ICMSF, 1980)

El crecimiento de los microorganismos en la carne, tiene lugar fundamentalmente a expensas de los componentes solubles en agua presentes en el músculo, como son carbohidratos, ácido láctico y aminoácidos (Jurgen, 1987)

POTENCIAL OXIDO-REDUCCION

El potencial redox puede ser considerado como una medida de la cantidad de oxígeno disuelto en el tejido muscular. Durante el proceso de almacenamiento, el potencial redox, disminuye de forma importante a causa del metabolismo microbiano y de los procesos enzimáticos consumidores de oxígeno, lo que ocasiona una variación desde +250 hasta -50 mVoltios (Fig. 1). Cuando el potencial redox es pequeño y negativo, se favorece el desarrollo de los microorganismos anaerobios (Jurgen, 1987, Carballo, 1991).

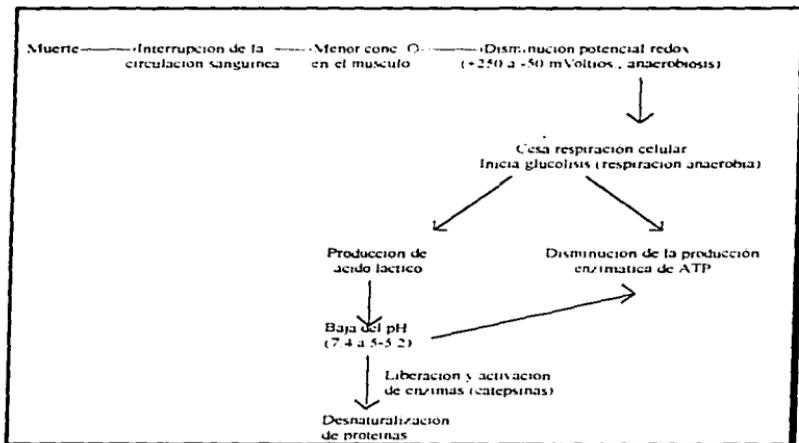
Las propiedades redox de la carne tienen una gran influencia en su microbiología. El dióxido de carbono que se genera como consecuencia de la respiración tisular y de la actividad bacteriana, ejerce una acción inhibitoria sobre un considerable número de microorganismos (Jurgen, 1987).

En los animales vivos, el oxígeno necesario para llevar a cabo las funciones metabólicas, es abastecido a través del torrente sanguíneo. Al cesar con la muerte la circulación de la sangre, el contenido de oxígeno y el potencial redox del músculo disminuyen gradualmente, llevando a la producción y acumulación anaeróbica de ácido láctico. La acidez desarrollada puede ser suficiente para reducir el metabolismo tisular que, sin embargo, continúa varios días a una velocidad que supera a la que el oxígeno puede difundir unos pocos milímetros en la carne, por lo tanto la masa carnica en unas pocas horas puede alcanzar condiciones anaerobias (ICMSF, 1980).

ACIDEZ Y pH DE LA CARNE

Es muy común encontrar en el músculo un desbalance entre la cantidad de carbohidratos y la de compuestos nitrogenados. Cuando esto sucede, la carne es más propensa al ataque microbiano debido a que no se logra desarrollar suficiente acidez para inhibir el desarrollo microbiano, incluso esta situación prevalece aun en presencia de flora láctica (Jürgen, 1987)

Figura 1. Secuencia de condiciones que se presentan en el tejido muscular *post mortem* (Carballo, 1991)



Durante las primeras horas después del sacrificio del animal, el pH de la carne se encuentra muy próximo a la neutralidad (7.0), valor que está muy cerca del óptimo de las bacterias patógenas y causantes de alteración. Posteriormente este pH, puede disminuir hasta alcanzar valores de 5.0 a 5.2, mismos que son desfavorables para el desarrollo de muchas bacterias. El pH de la carne está relacionado con la cantidad de ácido láctico producido por la glucólisis muscular después de la muerte (Fig. 1).

La cantidad de ácido láctico, depende a su vez, de la cantidad de glucógeno presente en el músculo en el momento de la muerte del animal, un pH de 7.0 corresponde prácticamente a una glucólisis nula o ausente, lo que ocasiona una mayor susceptibilidad de ataque microbiano, mientras que un pH de 5.0-5.2, es indicativo de la presencia de ácido láctico en el músculo en una concentración aproximada de un 1.0%. Con un pH de 5.0-5.2, es posible inhibir el crecimiento de gran parte de la flora contaminante, quedando activos solo aquellos microorganismos que toleran una acidez alta (ICMSI, 1980; Jørgen, 1987).

Otra de las consecuencias del descenso del pH es la desnaturalización de las proteínas, liberación y activación de enzimas (catepsinas) y desarrollo de la rigidez cadavérica (Jay, 1992).

1.2.2 FACTORES EXTRÍNSECOS

CARACTERISTICAS DEL MEDIO

Los factores externos juegan un papel fundamental durante el proceso de conservación de la carne

El deterioro de la carne ocasionado por la actividad de los microorganismos contaminantes y por las enzimas endógenas, puede ser minimizado por el manejo de ciertas condiciones de almacenamiento y lograr así, una mayor vida de anaquel, de tal manera que la carne conserve en la medida de lo posible las características organolépticas y sanitarias adecuadas para su consumo (Guerrero y Calderon, 1994)

Entre los factores externos que más influyen para prolongar la vida de anaquel de la carne, se encuentra la refrigeración, el empleo de atmósferas modificadas, uso de empaques y la adición de conservadores (Stiles, 1991a) Cuando se combinan estos factores es posible potencializar el efecto conservador, logrando un deterioro menor en el tejido muscular (Lioutas, 1988, Labuza y Breene, 1989)

REFRIGERACION

La refrigeración favorece un ambiente selectivo en el que preferentemente, crecen microorganismos psicrófilos, estos son los que proliferan en forma óptima a más de 20 °C, y que además son capaces de crecer en refrigeración a menos de 5 °C e incluso a 0 °C, siempre y cuando haya agua disponible (Waites, 1988)

Para que la carne pueda ser destinada para el consumo humano, es necesario dejar que ésta madure con el propósito de que adquiera una consistencia más suave. El tiempo de maduración es aquel en el cual se verifican toda una serie de cambios físico-químicos en la estructura proteica del tejido muscular, dando lugar a una carne mas suave si se compara con la que se tiene durante la etapa del rigor mortis, en la que la carne es sumamente dura (Ponce, 1989).

El rigor mortis o rigidez cadavérica es ocasionado por la falta de ATP el cual interviene en toda una serie de cambios de índole metabólico. Cuando la concentración del ATP es menor a $0.1 \mu\text{mol/g}$ se forman puentes transversales entre los filamentos de actina y miosina que normalmente se forman y destruyen durante la contracción muscular y en ausencia de ATP, dichos puentes no pueden romperse, lo que ocasiona la rigidez muscular que se mantiene debido a la tensión continua que ejercen los filamentos delgados de la actina (Price, 1976)

El tiempo de maduración varía de una carne a otra, así por ejemplo, para la carne de cerdo se requiere de un periodo de 24 h, mientras que para la carne de res el periodo de maduración es mayor (48-72 h). Para llevar a cabo este proceso de maduración, se debe de controlar la temperatura durante el tiempo necesario.

Si no se tuviera un control térmico, se favorecería el crecimiento y proliferación microbiana, incluyendo a los patógenos con el consiguiente riesgo que implicaría el consumo

de la carne, además de que se reduciría en forma drástica el tiempo de vida de anaquel de la misma (Frazier, 1988).

El almacenamiento en refrigeración de la carne, generalmente se limita a periodos de tiempo cortos, dado que los cambios alternativos continúan y la velocidad de muchos de estos cambios se acelera con el tiempo (Forrest, 1975)

Para prolongar el tiempo de conservación de la carne refrigerada, la técnica del frío se complementa con procedimientos que dificulten el crecimiento de los agentes que causan alteración en las condiciones habituales de refrigeración. Los procedimientos complementarios más usados son disminución de la humedad relativa, desecación de la superficie de las piezas, atmósferas con baja concentración de oxígeno y alta velocidad de enfriamiento (Noskova, 1972)

La disminución de la humedad relativa y la desecación de la superficie de los cortes, se logra dentro de las cámaras de refrigeración haciendo circular un aire con un bajo contenido de humedad, con lo que se consigue disminuir considerablemente el a_w de la superficie de la canal (Forrest, 1975)

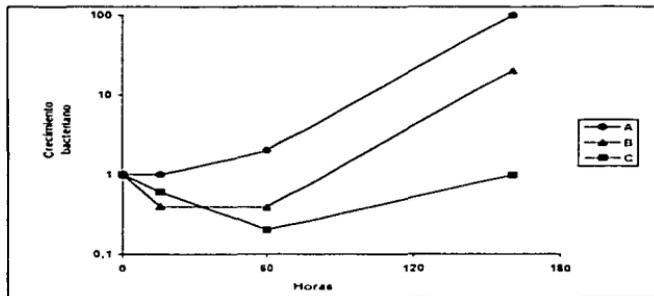
Las atmósferas modificadas se emplean dentro de las cámaras de refrigeración con el propósito de retrasar el deterioro de la carne debido al crecimiento microbiano y a la actividad de las enzimas endógenas. El empleo de este tipo de atmósferas, se fundamenta en

la sustitución parcial del oxígeno por otros gases como el nitrógeno y el dióxido de carbono, con lo cual se logra reducir de manera importante la microflora responsable de las alteraciones y deterioro del tejido muscular, debido a que el nitrógeno es un gas inerte y el dióxido de carbono a determinadas concentraciones puede inhibir el crecimiento de algunas especies bacterianas, aunque cabe señalar que en el caso de otras puede estimularlo (Gardner, 1966, Guerrero y Calderón)

La velocidad de enfriamiento de una canal, esta influenciada por varios factores tales como el calor específico de la canal, su tamaño, la cantidad de grasa externa y la temperatura del entorno refrigerante (Forrest, 1975)

Cuanto mas rápidamente se elimine el calor de la canal, menos posibilidades tendrán los microorganismos de multiplicarse. Si se logra disminuir la temperatura de la carne en poco tiempo, manejando condiciones de baja humedad dentro de la cámara de refrigeración, las cuentas bacterianas se reducirán drásticamente, mientras que a menor velocidad de enfriamiento (Fig. 2), los microorganismos alcanzarán cuentas mas elevadas, ocasionando el deterioro de la carne en un menor tiempo y una disminución importante en la vida de anaquel del alimento (Brown, 1982)

Fig 2 Influencia de la velocidad de enfriamiento de la carne de cerdo almacenada a baja temperatura sobre el crecimiento bacteriano (A), refrigeración lenta, (B), refrigeración rápida, (C), refrigeración rápida con baja humedad (Moerman, 1972)



2.2.3 FACTORES IMPLÍCITOS

A las influencias internas y externas que son independientes de la naturaleza de cada población microbiana, se deben de sumar los factores resultantes de la interacción de los microorganismos durante el crecimiento y que obedecen al comportamiento peculiar de cada especie durante su multiplicación y a las asociaciones entre ellas (Jurgen, 1987)

INTERACCIONES MICROBIANAS

Las interacciones pueden manifestarse de distinta manera, ya sea estimulando o inhibiendo el crecimiento de otras especies. Se pueden originar acciones antagónicas por el consumo de los nutrientes disponibles o por la síntesis de sustancias inhibitoras (antibióticos, bacteriocinas, etc.), aunque también puede presentarse una mutua estimulación (sinergismo), que se da cuando una especie microbiana genera sustancias que son aprovechadas por otra especie (Jürgen, 1987).

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

La tasa de crecimiento es característica de cada cepa y está determinada genéticamente, siendo un factor importante durante el desarrollo de asociaciones microbianas. Es fácilmente comprensible que en determinadas condiciones del medio, los microorganismos puedan exhibir una máxima tasa de crecimiento ocupando rápidamente todo el espacio disponible, anulando con ello a la flora restante (Jürgen, 1987).

2.3 MICROORGANISMOS RELACIONADOS CON LA ALTERACIÓN DE LA CARNE

CONTAMINACIÓN INICIAL

La carne es un alimento altamente perecedero, debido a la composición química del músculo, ya que este contiene una abundante cantidad de todos los nutrientes necesarios para permitir el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras (Jay, 1994)

Para tener una buena calidad sanitaria en la carne, es fundamental que los animales destinados a la matanza estén sanos, de tal forma que los microorganismos contaminantes se encuentren en la superficie de la carne y no dentro de esta. Cabe señalar que aun en animales sanos el tejido muscular no es estéril al concluir el proceso de matanza y limpieza de la canal, sino que existe una población microbiana superficial

Entre menor sea la carga microbiana inicial, mayor será la probabilidad de aumentar la vida de anaquel del alimento fresco (Guerrero y Calderon, 1994)

Para llevar a cabo el proceso de matanza del animal, se realiza un corte a nivel de la yugular con lo que se inicia el desangrado y la contaminación masiva microbiana, ya que la presión negativa que prevalece en la yugular y en la vena cava anterior, absorbe la suciedad existente en el punto de sección introduciéndola a la circulación corporal. Cabe mencionar

que un solo miligramo de material altamente contaminado, es suficiente para cargar la totalidad de la canal con una cifra media de microorganismos de unos cuantos cientos o miles de bacterias por gramo, cantidad suficiente para poner en marcha los procesos de descomposicion de la carne en sus partes mas profundas (Jurgen, 1987)

Tabla 2 Fuentes de contaminacion de la carne (Carballo, 1991)

Fuentes de carga microbiana inicial	Bacterias	Hongos	Levaduras
Piel /cm ²	33 × 10 ⁶	850	580
Heces /gr seco	970 × 10 ⁶	600 × 10 ³	2 × 10 ⁶
Panza	53 × 10 ⁶	16 × 10 ³	18 × 10 ⁶
Suelo	11 × 10 ⁶	12 × 10 ⁶	0.5 × 10 ⁶

Durante las operaciones de desollado, descuartizado, despiezado, seccion de la cabeza y puntas de las extremidades y posteriormente durante el deshuesado, se produce la contaminacion superficial masiva. Esta contaminacion, obedece en primer lugar a particulas de la piel y suciedad de las pezuñas que contienen heces, lo que ocasiona la presencia de microorganismos intestinales (Tabla 2)

Actúan como primera flora de contaminación en la superficie de la carne fresca los siguientes microorganismos enterobacterias, micrococcos, estreptococos fecales, lactobacilos y germen esporulados aerobios, mientras que de la piel y de las partículas de polvo adheridas a la piel, proceden organismos de la flora del suelo, que constituyen una contaminación inicial importante. Además, el hombre también es responsable de una contaminación adicional ocasionada por el contacto del tejido muscular con las manos sucias de los operadores, la ropa y los utensilios de trabajo, falta de higiene en la sala de matanza y las cámaras de refrigeración (Patterson y Gibbs, 1977, Newton y col, 1978)

La cuenta microbiana total presente en una misma canal puede oscilar en torno a un factor comprendido entre 100 y 1000 ufc/cm². Las cifras más altas se encuentran por lo general en los puntos de corte, en las partes traseras (Tabla 3) y en la superficie de sección de las medias canales en las regiones del torax y abdomen (Jürgen, 1987)

La pierna es una de las piezas de la canal que presenta mayores problemas de contaminación, tal como lo demuestran los datos recopilados por Ingram y Roberts en 1976 (Tabla 3), aunque los datos corresponden a canales de bovinos, se puede considerar que el patrón de contaminación es similar al que presentan las canales de otros animales. Al comparar las cuentas microbianas presentes en la pierna (tanto delantera como trasera) y el lomo de diferentes canales de borrego, se encontraron cuentas considerablemente más

elevadas en la pierna que en resto de los cortes para la misma canal como es el caso del lomo (Jürgen, 1987)

Los datos recopilados en la tabla 3, ponen de manifiesto una contaminación microbiana superficial similar para un mismo corte, a pesar de que las canales fueron almacenadas a distinta temperatura y proceden de diferentes países

Tabla 3. Cuenta microbiana superficial (\log_{10} UFC/cm²) en canales de borrego, según datos bibliográficos de distintos países (Ingram y Roberts, 1976)

	Inglaterra	Antigua URSS	Nueva Zelanda
Número de canales	6	15	9
Superficie estudiada (cm ²)	50	16	5
T. de almacenamiento (°C)	20	2	25
Superficies externas			
Lomo	2.6	2.7	2.4
Pierna (trasera)	3.0	3.6	3.4
Superficies internas			
Lomo	2.4	2.4	2.2
Pierna (delantera)	3.7	2.7	3.7

FLORA CONTAMINANTE

En el suelo, se encuentra gran parte de la flora contaminante no solo de la carne sino tambien de todo tipo de alimentos. Dicha flora contaminante esta constituida principalmente por bacterias ademas de hongos y levaduras (Forrest, 1979)

Las bacterias son los microorganismos que contribuyen en mayor grado a deteriorar la calidad de la carne, aunque hay que aclarar que no son los unicos microorganismos responsables de la alteración del alimento, ya que tambien es posible encontrar hongos y levaduras.

Debido a que las bacterias tienen una velocidad de crecimiento elevada, se multiplican mas rapido, logrando superar en numero a otros microorganismos presentes en el alimento, con lo que impiden el crecimiento de estos ultimos debido a una disminucion en la cantidad de los nutrimentos (Cabrillo, 1991)

Entre de los generos bacterianos que frecuentemente se encuentran presentes en las primeras etapas de almacenamiento de la carne estan los siguientes *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Moraxella-Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter* y *Penicillium* (Jay, 1992)

Del total de la flora contaminante, *Acromobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter spp.*, organismos esporulados, bacterias cromogenas, mohos y levaduras en conjunto, constituyen entre el 20 - 50 % de la flora contaminante, aunque cabe mencionar que

Pseudomonas, *Enterobacterias*, *Micrococcus* y *Microbacterium spp* son los géneros predominantes

Durante el almacenamiento de la carne, la proporción de la flora cambia, tal es el caso de *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Microbacterium spp* (Avres, 1951, 1955, 1980)

El almacenamiento aerobio y a baja temperatura del tejido muscular, favorece el crecimiento de bacterias gram negativas, aerobias, entre las que se encuentran *Pseudomonas*, *Moraxella* y *Acinetobacter*, predominando las primeras y ocasionando mal olor debido al metabolismo de degradación de proteínas y aminoácidos (Dainty y col., 1983)

CLASIFICACION DE LA FLORA CONTAMINANTE DE LA CARNE

La tasa microbiana presente en la carne, es un parametro muy útil para calificar la calidad sanitaria de la carne. La microflora presente en la carne, puede clasificarse en cuatro grandes grupos

- * Microorganismos indeseables, son todos aquellos que tienen como característica general ser generadores de enfermedades (organismos patógenos)
- * Microorganismos indeseables, causantes de alteraciones no son patógenos pero amenazan con su metabolismo la capacidad de conservación del alimento

* Microorganismos tolerables, son aquellos que no representan un riesgo para la salud, ni para la conservación del músculo debido a que estos microorganismos solo desarrollan una actividad metabólica escasa, o no pueden multiplicarse dadas las condiciones internas y externas prevalentes en la carne

* Microorganismos benéficos, debido a su metabolismo, influyen favorablemente sobre el alimento, generalmente con esto se consigue asegurar la calidad sanitaria de la carne (Jurgen, 1987)

Dependiendo de la especie o género y de la cuenta total de microorganismos presentes en el tejido muscular, así como de las condiciones externas de almacenamiento de la carne, se podrá hacer una estimación del tiempo de vida útil del alimento, antes de que empiecen a aparecer las primeras manifestaciones de alteración (Fig. 3) Cuando se tiene una cuenta microbiana de $50-100 \cdot 10^6$, se hace evidente el deterioro de la carne por el desarrollo de olores fétidos y la formación de una capa viscosa sobre la superficie del tejido muscular (Ayres, 1955)

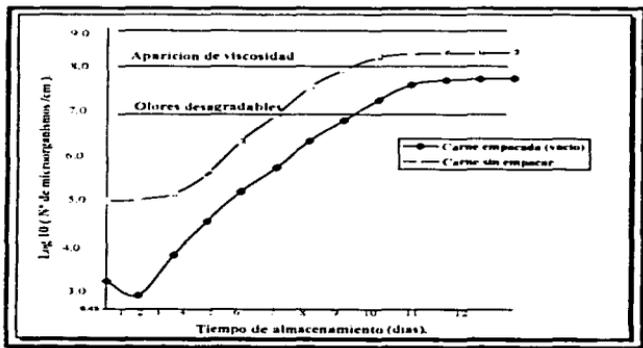
Si se ponen barreras que limiten o disminuyan la velocidad de crecimiento de los microorganismos deteriorantes, como por ejemplo una película permeable o impermeable (Fig. 3), la vida útil de la carne se incrementará considerablemente (Jurgen, 1987)

El aumento de la carga biológica en el tejido muscular, trae como consecuencia que la conservación de la carne sea más difícil, es decir la alteración de la carne, se presentará en

un menor tiempo. Dependiendo del tratamiento al cual se someta a la carne, es posible eliminar o destruir, añadir o modificar la población microbiana (Frazier, 1985) El factor térmico, juega un papel fundamental, ya que a medida que la temperatura disminuye, el amplio espectro de microorganismos contaminantes de la carne, se reduce considerablemente, con lo que se consigue reducir la flora exclusivamente a las especies psicrotrofas

Generalmente los microorganismos psicrotrófos son los responsables del deterioro de la carne refrigerada almacenada por un periodo de tiempo largo (Noskowa, 1972)

Fig. 3. Desarrollo de olores desagradables y aparición de viscosidad en carne fresca y carne empacada, almacenada a 5 °C (Ayres, 1960).



El tipo de microflora presente en la carne también depende de la cantidad de oxígeno disponible para el crecimiento microbiano, por ejemplo, la flora de una carne empacada al vacío será muy distinta de la que se encuentra presente en una carne sin empacar. En el primer tipo de carne, debido a las condiciones que prevalecen, se favorece el desarrollo de los microorganismos anaerobios estrictos y anaerobios facultativos, mientras que en la carne sin empacar podrán desarrollarse los organismos aerobios obligados y los facultativos (I. C. S. F., 1985)

Si se compara el número de géneros bacterianos aerobios con los anaerobios responsables del deterioro de la carne, la proporción de microorganismos aerobios es considerablemente mayor que la de anaerobios (Jay, 1992)

Los factores que influyen de manera decisiva para crear esta situación son el tiempo de duplicación bacteriano ya que este, es menor para las bacterias aerobias que para las anaerobias (Tabla 7), además de que la carne fresca al no tener una barrera protectora, estará más propensa al ataque microbiano, siendo estas razones suficientes para explicar porque la carne fresca sin empacar, tiene un tiempo de vida comercial menor (Fig 3) que el de la carne empacada al vacío (Gill y Newton, 1978)

Tabla 3. Géneros bacterianos encontrados con mayor frecuencia en carne fresca y en carne empacada (Jay, 1994)

GENERO	Carne fresca	Carne empacada (vacío)
<i>Acinetobacter</i>	XX	X
<i>Aeromonas</i>	XX	X
<i>Alcaligenes</i>	X	—
<i>Arthrobacter</i>	X	—
<i>Bacillus</i>	X	—
<i>Brachyothrix</i>	X	XX
<i>Carnobacterium</i>	X	XX
<i>Citrobacter</i>	X	—
<i>Clustidium</i>	X	XX
<i>Corneliobacterium</i>	X	X
<i>Enterobacter</i>	X	X
<i>Enterococcus</i>	XX	XX
<i>Escherichia</i>	X	—
<i>Flavobacterium</i>	X	—
<i>Haflia</i>	X	X
<i>Kurtzia</i>	X	X
<i>Lactococcus</i>	X	—
<i>Lactobacillus</i>	X	XX
<i>Leuconostoc</i>	X	X
<i>Listeria</i>	X	X
<i>Mycobacterium</i>	X	X
<i>Micromonospora</i>	X	X
<i>Moraxella</i>	XX	—
<i>Pantoea</i>	X	—
<i>Pedococcus</i>	X	X
<i>Proteus</i>	X	—
<i>Pseudomonas</i>	XX	X
<i>Psychrobacter</i>	XX	—
<i>Salmonella</i>	X	—
<i>Serratia</i>	X	X
<i>Shewanella</i>	X	—
<i>Staphylococcus</i>	X	X
<i>Yersinia</i>	X	X

Entre de los géneros bacterianos que se han encontrado en la carne fresca, comparados con los que se encuentran presentes en carne empacada al vacío, se puede apreciar que la mayor parte de la flora contaminante, está constituida por bacterias (Tabla 3), mientras que los hongos (Tabla 4) y las levaduras, se encuentran en menor proporción (Tabla 5). El predominio de uno u otro grupo microbiano sobre otros, está determinado, por el manejo y combinación de los factores externos, así como por las interacciones entre las diferentes especies (Gill y Newton, 1978, Jay, 1994)

Tabla 4. Géneros de hongos encontrados frecuentemente en carne fresca y refrigerada (Jay, 1994)

GÉNERO	Carne fresca y refrigerada
Alternaria	X
Aspergillus	X
Cladosporium	XX
Fusarium	X
Geotrichum	XX
Monascus	X
Monilia	X
Mucor	XX
Neurospora	X
Penicillium	X
Rhizopus	XX
Sporotrichum	XX
Thamnidium	XX

Tabla 5. Generos de levaduras frecuentemente encontrados en carne fresca y refrigerada (Jay, 1994)

GENERO	Carne fresca y refrigerada
Cándida	XX
Cryptococcus	X
Debaryomyces	X
Rhodotorula	X
Trichosporum	X

La proliferación de las bacterias, comparada con la de hongos y levaduras, se lleva a cabo en un menor tiempo, debido a que el tiempo de generación bacteriano es considerablemente menor que el de hongos y levaduras, razón por la cual en las primeras etapas de almacenamiento de la carne, las cuentas bacterianas siempre son mayores que de hongos y levaduras (Carballo, 1991)

2. 4 ALTERACIONES EN LA CARNE

Los tipos mas comunes de alteración de la carne se pueden clasificar teniendo en cuenta si se llevan a cabo en condiciones aerobias o anaerobias y si son ocasionadas por bacterias, hongos o levaduras (Frazier, 1985).

El grado de deterioro de la carne depende en gran medida del tiempo que se dejen difundir los productos originados por la degradación de los nutrientes presentes en el tejido muscular y la rapidez con la que tiene lugar ésta difusión. El abundante crecimiento de

bacterias en la superficie de la carne, puede ocasionar una alteración a bastante profundidad y en tal caso es posible que las bacterias facultativas crezcan difundiendo hacia el centro del tejido muscular (Frazier, 1985)

2.4.1 ALTERACIONES OCASIONADAS POR MICROORGANISMOS AEROBIOS.

Las alteraciones ocasionadas por el crecimiento de bacterias aerobias en la superficie de la carne son desarrollo de olores desagradables, aparición de mucilago superficial, aparición de pigmentos en la superficie, fosforescencia, modificación del pigmento de la carne y alteración de las grasas, mismas que se hacen evidentes cuando se alcanzan cuentas del orden de 10^6 ufc/cm² (Frazier, 1985)

El husmo u olores y sabores extraños que aparecen en la carne como consecuencia de la multiplicación de bacterias en la superficie, con frecuencia suelen manifestarse antes de que aparezcan otros indicios de alteración. El termino agriado se suele aplicar a casi todas las alteraciones que comunican a la carne un olor agrio que puede ser debido a la presencia de acidos volátiles, como son los acidos fórmico, acético, butírico y propiónico, o incluso el crecimiento de levaduras (Frazier, 1988)

La microflora aerobia degrada proteínas produciendo compuestos volátiles como aminas libres. En refrigeración y condiciones aerobias los principales organismos psicrótrofos de descomposición son los bacilos gram negativos incluyendo generos como *Flavobacterium*, *Moraxella* y *Pseudomonas* spp (Dainty y col., 1983)

La aparición de mucilago superficial puede deberse a la presencia de grandes masas de crecimiento microbiano (Fig. 3), así como al ablandamiento o desmoronamiento de las proteínas estructurales de la carne (Jay, 1992)

Los generos bacterianos responsables de la aparición de mucilago en la superficie de la carne son especies de los generos *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Streptococcus*, *Leucomostoc*, *Bacillus*, y *Micrococcus*. Solo algunas especies de *Lactobacillus* son capaces de producir mucilago

Como agentes causantes del enverdecimiento de la carne, se han señalado a los generos *Lactobacillus* (especies heterofermentativas) y *Leucomostoc*.

El desarrollo de ciertos pigmentos se debe al crecimiento de diferentes bacterias, por ejemplo, el moteado rojo puede ser producido por *Serratia marcescens* o por otras bacterias, *Pseudomonas synchyanea* produce un pigmento azul, las manchas amarillas son ocasionadas por la presencia de *Micrococcus* o *Flavobacterium*, mientras que una coloración azul verdosa es producida por *Chromobacterium lividum*

La fosforescencia es producida por especies del género *Photobacterium* mismos que crecen en la superficie de la carne

El enranciamiento de las grasas puede ser causado por especies lipolíticas de los géneros *Pseudomonas* y *Acromobacter* o por levaduras (Frazier, 1985)

2.4.2 ALTERACIONES OCASIONADAS POR MICROORGANISMOS ANAEROBIOS.

Tanto las bacterias anaerobias facultativas como las anaerobias estrictas son capaces de crecer en condiciones de baja tensión de oxígeno, en el interior de la carne

En condiciones anaerobias los tipos más comunes de alteración de la carne empacada son: agriado, putrefacción y húsno (Frazier, 1988)

Los géneros bacterianos que son responsables de las alteraciones que se presentan en carne empacada con atmósferas controladas, son: *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Brochothrix*, *Flavobacterium* y *Clostridium* (Frazier, 1988).

El agriado de la carne, es ocasionado por el crecimiento de *Lactobacilos*, *Enterobacterias* y *Brochothrix thermosphucta* principalmente, ya que al consumir la glucosa presente en el tejido muscular, producen cierto tipo de ácidos, mismos que le confieren a la carne un sabor agrio (Jay, 1992).

La putrefacción verdadera es la consecuencia de la descomposición anaeróbica de las proteínas, durante la cual, los microorganismos sintetizan compuestos malolientes como el sulfuro de hidrogeno, mercaptano, indol, escatol, amoniaco y aminas. Los generos *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Proteus*, son considerados como los responsables del desarrollo de olores putrefactos (Frazier, 1988)

2.5 MICROORGANISMOS DETERIORANTES DE LA CARNE FRESCA DE CERDO

PREDOMINIO ESPECIFICO

Una gran proporción de la flora contaminante de la carne fresca sin empaquetar, está constituida por microorganismos gram negativos, aunque también se han llegado a encontrar otros organismos entre los que se incluyen a miembros de los generos *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Aeromonas*, *Brochothrix* y *Enterobacterias* psicrotrofas (Jay, 1992, Noskova, 1972)

Dentro de esta amplia gama microbiana, solamente algunas especies, son las que se encuentran en cuentas mayores que el resto de la población (Frazier, 1985)

El manejo y control de los factores externos, ocasiona un cambio importante en el

metabolismo microbiano, al disminuir la velocidad de crecimiento de algunas especies responsables del deterioro de la carne, inhibir el crecimiento de algunas otras, reducir el número de alteraciones debido a la disminución de la población y en consecuencia lograr un incremento considerable de la vida de anaquel de la carne (Guerrero y Calderon, 1994)

Uno de los factores que influyen de manera importante para que una especie predomine sobre otras, es el tiempo de generación

El tiempo de generación microbiano, varía de una especie a otra dependiendo de varios factores como son, el genético, la concentración de los nutrientes, las condiciones del medio, la afinidad del microorganismo por un determinado sustrato, la cantidad de oxígeno disponible, la presencia de otras especies y la cuenta total de cada una (Gill y Newton, 1978).

De entre la heterogénea flora microbiana presente en la carne fresca, los microorganismos que crecen con mayor rapidez y que metabolizan en menor tiempo los nutrientes presentes en la carne, se encuentra *Pseudomonas*, el cual es un microorganismo aerobio estricto. Uno de los factores que más influyen en el crecimiento primario de dicho organismo es la cantidad de oxígeno disponible.

En la superficie de la carne, el oxígeno se encuentra en una mayor concentración comparada con el interior del tejido muscular, en base a esto en la superficie se tiene una

mayor disponibilidad de oxígeno, lo que trae como consecuencia que las cuentas más elevadas de *Pseudomonas* se tengan en la superficie de la carne comparadas con las que se presentan al interior del músculo (Gill y Newton, 1977)

Una de las razones por la cual *Pseudomonas* es en condiciones aerobias el principal agente que ocasiona la descomposición de la carne, es su corto tiempo de generación, que si se compara con el de otras especies psicrotróficas presentes en la carne (Tabla 7), se puede entender la razón por la cual generalmente se encuentra en cuentas más elevadas que el resto de la flora contaminante de la carne fresca sin empacar, por ejemplo, cuando en la carne fresca se encuentran *Brochothrix thermosphacta* y *Pseudomonas* aproximadamente en la misma proporción, *Pseudomonas* supera rápidamente en número a *Brochothrix thermosphacta* (Gill y Newton, 1978)

Dentro de la flora psicrotrófica que generalmente se encuentra presente en la carne, *Pseudomonas* es el género que tiene un tiempo de generación menor (Tabla 7), seguido por *Acinetobacter*, *Brochothrix thermosphacta* y por último *Enterobacter* (Gill y Newton, 1978)

Mc Lean y Sulzbacher en 1953, describieron a la especie *Microbacterium thermosphactum*, ahora conocida como *Brochothrix thermosphacta* (Sneath y Jones, 1976), la cual es comúnmente encontrada como parte importante de la flora contaminante de la carne curada. *Brochothrix thermosphacta*, es un microorganismo que se encuentra tanto en la carne fresca como en los productos carnicos, aunque cabe mencionar que el porcentaje en el que se presenta en cada uno de los tipos de carne es diferente (Jay, 1992; Price, 1987).

Tabla 7 Tiempo de generación de las bacterias presentes en la carne almacenada a 5 °C (Gill y Newton, 1978).

Género	Tiempo de generación (h)	
	Aerobiosis	Anaerobiosis
<i>Pseudomonas</i>	5.4	—
<i>Acinetobacter</i>	6.3-10.7	—
<i>Brochothrix</i>	7.3	20.1
<i>Enterobacter</i>	7.8	23.2
<i>Lactobacillus</i>	—	6.5

Con base en los estudios realizados por Gardner y col. 1966, Nicholson, 1980 y Gardner, 1981, se demostró que *Brochothrix thermosphacta* tiene una incidencia muy baja en los alimentos frescos sin empacar, alcanzando un porcentaje máximo de 5 %, el cual podría ser explicado tomando en consideración el mayor tiempo de generación para este microorganismo, comparado con el de otros géneros bacterianos, el cual también puede verse afectado por una menor afinidad por los sustratos que sostienen su metabolismo, comparada con la que presentan las bacterias ácido lácticas y *Enterobacterias* (Gill y Newton, 1978). Además de que el metabolismo anaerobio, en general es considerado como un proceso energéticamente menos rentable que el aerobio, lo que ocasiona que el tiempo de generación aumente considerablemente (Lehninger, 1981).

El tiempo de generación para *Brochothrix thermosphacta* en condiciones aerobias es de 7.3 horas mientras que en anaerobiosis es de 20 l horas, mismo que puede ser modificado, dependiendo del microorganismo con el que compita (Tabla 8) y la proporción en la que se encuentre cada uno (Gill y Newton, 1978)

En la carne fresca el crecimiento de las especies aerobias puede cesar cuando hay poca disponibilidad de oxígeno, en tales circunstancias *Pseudomonas* se encarga de disminuir la concentración de oxígeno hasta niveles que obliguen a los microorganismos facultativos a realizar un metabolismo fermentativo, el cual se lleva a cabo en mayor tiempo, lo que permitirá que *Pseudomonas* pueda consumir gran parte de los nutrientes e impedir el crecimiento de sus competidores (Jurgen, 1987, Jay, 1992)

Cuando *Brochothrix thermosphacta* se encuentra en competencia con *Pseudomonas*, ésta última en un tiempo muy corto puede llegar a alcanzar una cifra de 10^8 ufc/cm² lo que la mantendrá como especie dominante evitando con ello que *Brochothrix thermosphacta* se multiplique, dando como resultado una baja incidencia de éste microorganismo en la carne fresca (Gill y Newton, 1978)

Tabla 8. Crecimiento bacteriano en carne sin empacar almacenada a 10 °C en presencia de otras especies que se encuentran en mayor proporción (Gill y Newton, 1978)

Microorganismo presente en mayor proporción	Microorganismo presente en menor proporción	Tiempo de generación del microorganismo minoritario (h)	Maxima densidad celular del microorganismo minoritario (h)
<i>P fluorescens</i>	<i>Enterobacter</i>	10.4	6.2×10^7
<i>P fluorescens</i>	<i>B thermosphacta</i>	7.2	7.1×10^7
<i>Enterobacter</i>	<i>P fluorescens</i>	3.2	1.1×10^9
<i>Enterobacter</i>	<i>B thermosphacta</i>	9.1	2.7×10^7
<i>B thermosphacta</i>	<i>P fluorescens</i>	3.2	1.6×10^9
<i>B thermosphacta</i>	<i>Enterobacter</i>	6.0	7.6×10^8

Si en la carne están presentes *Enterobacter* y *Brochothrix thermosphacta* en la misma proporción inicial, *Enterobacter* a pesar de tener un tiempo de generación mayor (Tabla 7), se multiplica más rápido que *Brochothrix thermosphacta* debido a que *Enterobacter* tiene una mayor afinidad por la glucosa que *Brochothrix thermosphacta*, como consecuencia, *Enterobacter* llegará a ser la especie dominante ocasionando que el tiempo de generación de *Brochothrix thermosphacta*, pase de 7.3 a 9.1 h (Gill y Newton, 1978).

Cuando se tienen condiciones aerobias *Brochothrix thermosphacta* solamente utiliza la glucosa y en algunas ocasiones emplea el glutamato, pero si se tienen condiciones anaerobias *Brochothrix thermosphacta*, solo es capaz de usar la glucosa, mientras que *Pseudomonas* y *Enterobacter* son especies más versátiles que emplean otros sustratos (Tabla 9) además de la glucosa (Gill y Newton, 1978)

Cuando *Brochothrix thermosphacta* se hace crecer en un medio mínimo como el medio APT, en el cual la cantidad de glucosa es muy baja, se favorece la producción de ácido isobutírico e isovalérico, pero si al medio se le adiciona una cantidad importante de glucosa, los productos resultantes del metabolismo de este microorganismo son, acetoina, ácido acético, 2,3-butanodiol, 3-metil butanol y 3- metil propanol (Dainty, 1980 y 1983). La proporción de cada uno de éstos compuestos depende de la cantidad de glucosa presente en el medio de cultivo (Jay, 1992)

Se ha comprobado que la adición de un 2 % de glucosa a la carne cruda, reduce el pH y retrasa la aparición de olores desagradables y de mucilago sin afectar a la flora general causante de alteración. Una alternativa para reducir considerablemente la cantidad de compuestos volátiles que le confieren olores desagradables a la carne, es la adición de glucosa para estimular la producción de acetoina, y reducir la producción de otros compuestos, esto no solamente en la carne fresca, sino también en la carne empacada (Shelf, 1977)

Tabla 9. Empleo de los distintos compuestos solubles presentes en la carne por parte de la flora contaminante (Gill y Newton, 1978)

Género	Glucosa	Glucosa 6-fosfato	Aminoácidos	Lactato
AEROBIOSIS				
<i>B thermosphacta</i>	XX	—	XX ^a	—
<i>Pseudomonas</i>	XX	—	XX ^a	X
<i>Enterobacter</i>	XX	XX	X ^a	X
<i>Acinetobacter</i>	—	—	XX ^a	X
ANAEROBIOSIS				
<i>B thermosphacta</i>	XX	—	—	—
<i>Lactobacillus</i>	XX	—	XX ^a	—
<i>Enterobacter</i>	XX	XX	—	—

XX Máximo grado de crecimiento

a) Glutamato, aspartato, serina, prolina y alanina

b) Solamente glutamato

c) Solamente arginina

La acetoina producida por *Brochothrix thermosphacta* puede ser oxidada a diacetilo y acetato. El diacetilo ocasiona sabores asociados con los productos lácteos, lo que es una característica indeseable en carnes (Gill, 1986)

Tabla 10 . Compuestos volátiles de origen microbiano producidos en carne (Guerrero y Taylor, 1994)

Microorganismos	Condición de almacenamiento	Compuestos producidos
<i>Pseudomonas spp</i>	<u>AEROBIOSIS</u> Al agotarse la glucosa utilizan los aminoácidos	Mal olor debido a los sulfuros, ácidos y ésteres.
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Medio complejo Medio mínimo <u>ANAEROBIOSIS</u>	Extremo mal olor acetoina, ácido acético, isobutírico, isovalérico, aldehídos y alcoholes ácidos grasos de cadena ramificada Poco olor, ácido láctico y otros ácidos volátiles
<i>Enterobacteriaceae</i>	A 10 °C, cuando se agota la glucosa y utilizan aminoácidos	Olores desagradables ocasionados por la producción de aminas biogénicas, ácido sulfhídrico, sulfuros
Bacterias lácticas	Utilizan la glucosa y arginina principalmente	Ácidos grasos volátiles, algunas especies producen ácido sulfhídrico

Cuando *Brochothrix thermosphacta* se encuentra en la carne en cantidades de 10^8 ufc/cm², se presenta una secuencia de eventos que se inicia con olores a leche/grasa/queso, debidos a la acetoina, diacetilo y 3-metil butanol, posteriormente el olor es dulce /afrutado, ocasionado por la presencia de esterios de ácidos grasos de cadena corta producidos por *Pseudomonas*. Finalmente cuando *Pseudomonas* alcanza la cifra de 10^7 ufc/cm², se produce un olor a sulfuro junto con la formación de limo en la superficie (Guerrero y Calderon 1994).

La incidencia de *Brochothrix thermosphacta* en el lomo fresco de cerdo sin empacar, es de 2-3 % del total de la flora contaminante, mientras que en el lomo empacado (Tabla 11) bajo ciertas condiciones de almacenamiento dicho porcentaje se eleva a valores entre 17-18 % (Garner, Carson y Patton, 1967). El incremento en la proporción de *Brochothrix thermosphacta* como flora contaminante de la carne empacada se debe a que las condiciones de almacenamiento impiden el desarrollo de *Pseudomonas* y alargan considerablemente el tiempo de generación de *Enterobacterius*, con lo cual se deja el camino libre para la rápida proliferación de *Brochothrix thermosphacta* pero sin superar en número a *Lactobacillus* (Gardner y col., 1966).

Aunque la incidencia de *Brochothrix thermosphacta* es muy baja en la carne fresca de cerdo, es necesario reconocer la capacidad que tiene este microorganismo para ocasionar cambios que deterioran la calidad de la carne fresca almacenada en refrigeración (Tabla 10).

Tabla 11. Incidencia de *Brochothrix thermosphacta* en lomo de cerdo sometido a ciertas condiciones de almacenamiento (Garner, Carson y Patton, 1967)

Película permeable	Película impermeable	Sin empaque
14.9 % de CO ₂ 16 °C/4 días	24.4 % de CO ₂ 16 °C/4 días	16 °C/4 días
10.0 %	18.0 %	<u>3.0 %</u>
7.4 % de CO ₂ 2 °C/14 días	12.3 % de CO ₂ 2 °C /14 días	2 °C/14 días
11.0 %	17.0 %	<u>2.0 %</u>

2.6 FLORA CONTAMINANTE DE LA CARNE EMPACADA

El manejo de la carne utilizando empaques y atmósferas modificadas son prácticas que se llevan a cabo con el propósito de prolongar en la medida de lo posible la vida de anaquel de la carne (Jay, 1992). Para poder realizar esta operación de manejo de la carne, se emplean materiales de empaque con características especiales, así como una combinación de distintos gases, a saber, dióxido de carbono, nitrógeno y oxígeno en distintas proporciones (Jay, 1992).

El empaque al vacío es considerado como una variante de atmósfera modificada (Guerrero y Calderón, 1994), y ha quedado demostrado que la vida útil de la carne empacada al vacío, es inversamente proporcional a la permeabilidad de la película que recubre la carne (Newton y col., 1979)

La base del empleo de dióxido de carbono en las atmósferas controladas, es el efecto inhibitorio que dicho gas tiene sobre el crecimiento microbiano. Las bacterias más sensibles a las altas concentraciones de CO₂ son las gram negativas, entre las que se encuentra el género *Pseudomonas*, mientras que las bacterias acidolácticas y las anaerobias son las más resistentes (Jay, 1992)

El uso de un determinado material de empaque y la composición de la atmósfera, depende de las características que se deseen conservar, por ejemplo en el caso de la venta de cortes al menudeo, la conservación del color es uno de los atributos más importantes, por lo que se recurre al empleo de películas semipermeables al oxígeno debido a que este gas contribuye de forma importante para conservar el color rojo brillante, que el consumidor asocia con la frescura de la carne, mientras que para los cortes destinados para la venta al mayoreo, donde la característica más importante es una vida útil larga, se emplean empaques de baja o nula transmisión de oxígeno (Griffin y col., 1985)

A medida que la concentración de dióxido de carbono se incrementa en la atmósfera, es posible inhibir el crecimiento de la mayoría de los microorganismos responsables del

deterioro del tejido muscular, quedando activos solo aquellos que toleren las condiciones prevalentes, tal es el caso de *Lactobacillus*, *Enterobacter* y *Brochothrix* (Jay, 1992)

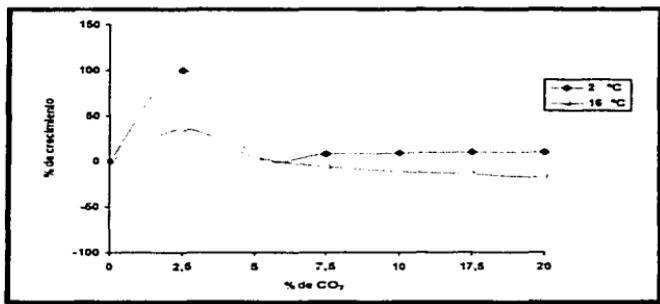
Por otra parte si se emplea una envoltura impermeable al oxígeno, como consecuencia del aumento de la concentración de CO₂ y de la disminución del potencial de oxido-reducción, resulta favorecido el crecimiento de las bacterias acidolácticas, *Enterobacterias* y *Brochothrix thermosphacta* (Seideman y col., 1976, Seman, 1989, Vanderzant y col., 1985) Uno de los efectos de la presencia de estos microorganismos en la carne empacada, es la disminución del pH, con lo cual crean un medio desfavorable para el crecimiento de la mayoría de las bacterias gram negativas (Jay, 1992)

En general el efecto inhibitor de la concentración de dióxido de carbono se incrementa conforme disminuye la temperatura, debido principalmente a la mayor solubilidad del gas a baja temperatura y la formación de ácido carbónico, lo que trae como consecuencia una disminución importante del pH (Jurgen, 1987, Jay, 1992)

Cabe señalar que no siempre el mayor grado de inhibición se alcanza a bajas temperaturas, por ejemplo en el caso de *Brochothrix thermosphacta*, cuando se tiene una temperatura de 2 °C y una concentración de dióxido de carbono de 2.5 %, en lugar de inhibir el crecimiento, este se incrementa hasta alcanzar un 100 % (Fig. 4), mientras que cuando la temperatura es de 16 °C y 2.5 % de CO₂, el crecimiento es cercano al 30 %
Cuando la

concentración de dióxido de carbono se incrementa a valores superiores del 5 %, empieza a hacerse evidente el efecto inhibitorio del anhídrido carbónico sobre el crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* (Gardner, 1967)

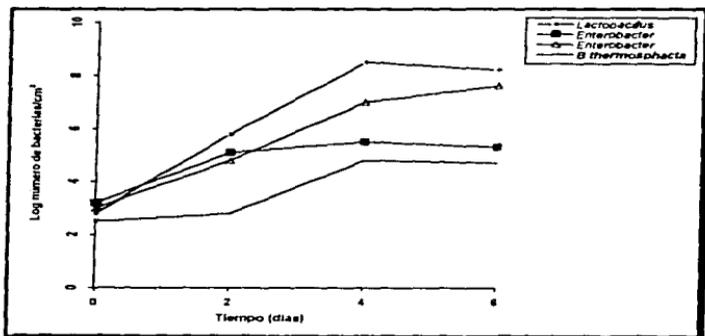
Figura 4. Efecto de la concentración del CO₂ en el crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* en carne de cerdo empacada y almacenada a 2 °C y 16 °C (Gardner y Carson, 1967)



Cuando en condiciones de anaerobiosis *Brochothrix thermosphacta* se encuentra en la carne compitiendo con *Enterobacter* por los nutrientes presentes en el tejido muscular, la especie que predomina sigue siendo *Enterobacter*, debido a su mayor afinidad por la glucosa comparado con la que presenta *Brochothrix thermosphacta*.

Si en el tejido muscular se encuentran compitiendo *Brochothrix thermosphacta* con *Lactobacillus*, es evidente el dominio de los *Lactobacillus* frente a *Brochothrix thermosphacta*, debido a la capacidad que tienen los *Lactobacillus* de sintetizar sustancias que inhiben el crecimiento de otras especies (bacteriocinas), además de que *Lactobacillus* tiene un tiempo de generación menor (Tabla 7) que *Brochothrix thermosphacta* (Guerrero y Calderón, 1994).

Fig. 5 Crecimiento anaerobio de *Lactobacillus* (a) con *Enterobacter* (b) y *Enterobacter* (c) con *Brochothrix thermosphacta* (d) en carne almacenada a 10 °C (Gill y Newton, 1978)



Roth y Clark en 1975 y Gill y Newton en 1978, determinaron que los *Lactobacillus* inhiben de modo importante el crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* (Fig 5), cuando se encuentran presentes en la carne envasada al vacío en cuentas aproximadamente iguales, aunque cabe mencionar que esta inhibición no tiene lugar en la carne que ha madurado en una atmósfera con un elevado porcentaje de oxígeno (Jay, 1992)

No obstante, cuando la flora inicial de las carnes envasadas al vacío contiene cantidades importantes de *Brochothrix thermosphacta*, este microorganismo puede llegar a crecer con mayor rapidez e incluso superar a las bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas y convertirse en la especie dominante con el consiguiente deterioro del tejido muscular que ocasiona (Egan y col., 1980)

2.7 CARACTERÍSTICAS DE *Brochothrix thermosphacta*

Brochothrix thermosphacta, (antes *Microbacterium thermosphactum*), su nombre se deriva del latín; Gr n brochos, onda; Gr n thrix, hilo. ther'mos phac.ta. M. L. fem. adj. therme Gr. n calor, sphactos Gr adj muerte, muerto por calor (**hilo ondulado que muere por calor**), fue aislado por primera vez a partir de un embutido fresco de carne de cerdo conservado a una temperatura entre 5-8 °C, y en carne fresca de cerdo en 1953 por McLean y Sulzbacher (Manual Bergey's, 1986). También se encontró en carne de pescado fresco,

ahumado y congelado, así como en chicharos y frijoles congelados, en leche, queso cottage y salsa de tomate preempacada (Gardner, 1981) Nichelson y col., en 1980, encontraron a este microorganismo en todas las etapas de procesamiento del pescado (entero, descabezado, eviscerado, salado y en carne picada) de seis diferentes especies, capturadas en el Golfo de México (Manual Bergey's Manual, 1986)

En 1919 Orla-Jensen propuso la creación del género *Microbacterium*. Originalmente dicho género estaba constituido por cuatro especies a saber, *Microbacterium lacticum*, *M flavum*, *M licuefaciens* y *M mesentericum* y no fue sino hasta 1953 que Mc Lean y Sulzbacher promovieron la inclusión de *M thermosphactum* en este género

Desde un principio dicho género bacteriano resultó muy controvertido debido a las diferencias existentes entre las especies que lo constituían de ahí que en la 5ª Edición del Manual Bergey's, este género fuera ubicado dentro de la familia *Bacteriaceae*, en la 6ª edición en la familia *Lactobacillaceae*, en la 7ª edición, dentro de la *Corynebacteriaceae* (Manual Bergey's, 1974)

En 1976, Sneath y Jones propusieron la creación de un nuevo género, *Brochothrix*, para incluir como única especie a *Brochothrix thermosphacta*, y es a partir de la novena edición, que esta especie posee una ubicación definitiva (Manual Bergey's, 1986)

Una de las razones para poner a *Brochothrix thermosphacta*, dentro de un género aparte, es el poco parecido que tiene con respecto a otros microorganismos pertenecientes a las familias antes mencionadas (Mortimer, 1981)

Cabe señalar que *Brochothrix thermosphacta* comparte algunas características, pero también presenta diferencias con especies tales como *M flavum* y *M lacticum*, *Kurthia zoffii*, *Lactobacillus* y *Listeria monocytogenes* (Davidson y col , 1968, Davis y col , 1969, Manual Bergey's, 1974, Mortimer, 1981, Feresu y Jones, 1988)

Davidson, Mobbs y Stubbs, en 1968 realizaron un estudio comparativo de las diferentes propiedades morfológicas y fisiológicas entre *M flavum*, *M lacticum* y *M thermosphactum* en donde se pusieron de manifiesto las diferencias entre *M thermosphactum* con respecto a *M flavum* y *M lacticum* (Tabla 12)

A pesar del enorme parecido entre estas tres especies, existen diferencias que obligaban a considerar seriamente el lugar ocupado por *Brochothrix thermosphacta* dentro del género *Microbacterium* (Manual Bergey's, 1974)

Fue en base a los resultados obtenidos por Collins-Thompson en 1972, que se tuvieron las herramientas necesarias para justificar la exclusión de *Brochothrix thermosphacta* y ubicarlo dentro de otro genero En el estudio realizado por estos investigadores, se determinó que el % G+C para *M flavum* (58 %) y para *M lacticum*

(63 %) son similares al que presenta el género *Corynebacterium* (48-59 %), mientras que *Brochothrix thermosphacta* (36 %) tiene un porcentaje que nada tiene que ver con dicho género bacteriano (Manual Bergey's, 1974)

Tabla 12 Características morfológicas y fisiológicas de las microbacterias (Davidson, Mobbs y Stubbs, 1968)

Características	<i>B thermosphacta</i> (<i>M thermosphactum</i>)	<i>M lacticum</i>	<i>M flavum</i>
Pleomorfismo celular	+	—	—
Metabolismo de la glucosa	Fermentativo	Fermentativo	Fermentativo
Rojo de metilo	+	+	+
Voges-Proskawer	+	—	—
Reducción de nitrato	—	—	—
Catalasa	+	+	+
Bencidina	+	+	+
Citocromos presentes	a, b ₁ , aa ₃	a, b, c	a, b, c
Crecimiento a.			
4 °C	+	—	—
20 °C	+	+	+
30 °C	+	+	+
37 °C	—	+	+

Para poder llevar a cabo la diferenciación entre *Brochothrix thermosphacta* y *Kurthia zopfii*, es necesario considerar las similitudes y divergencias propias de cada género (Tabla 13) Dentro de las diferencias más relevantes, se encuentra el metabolismo aerobio facultativo que lleva a cabo *Brochothrix thermosphacta* mientras que *Kurthia zopfii* es un aerobio estricto, también cabe señalar que *Brochothrix thermosphacta* es inmóvil mientras que *K zopfii* es móvil debido a la presencia de flagelos peritricos (Manual Bergey's, 1974)

Con respecto a las características más importantes que comparte *Brochothrix thermosphacta* con *K. zopfii*, se encuentra el pleomorfismo celular que se tiene en los cultivos jóvenes con respecto a los cultivos viejos, la incapacidad para crecer a elevadas temperaturas, aunque se ha reportado que algunas cepas de *K. zopfii* pueden llegar a crecer a 45 °C, incapacidad para hidrolizar la gelatina, así como la falta de la enzima nitrato reductasa (Manual Bergey's, 1974)

Tabla 13 Características morfológicas y fisiológicas de *Brochothrix thermosphacta* y *Kurthia zopfii* (Manual Bergey's, 1974)

Características	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>Kurthia zopfii</i>
Colonias rizoides	—	+
Metabolismo aerobio	Facultativo	Obligado
Catalasa	+	+
Oxidasa	—	—
Movilidad	—	+
Crecimiento en STAA	+	—
Prod. ácido a partir de carbohidratos	+	—
Reducción de nitratos	+	—
RM-VP	+	—

En 1953, McLean y Sulzbacher notaron un cierto parecido entre *Brochothrix thermosphacta* y los lactobacilos, por lo que el género *Microbacterium* fue colocado dentro de la familia *Lactobacteriaceae*, diferenciándose del género *Lactobacillus* principalmente por ser catalasa positivo (Bred. Murray y Hitchens, 1948).

Estudios taxonómicos realizados por Robinson, 1966b; Davidson y col., 1968, Davidson y col., 1969; Davis y Newton, 1969, Collins-Thompson, 1972; Jones, 1975, Wilkinson y Jones, 1977, Feresu y Jones, 1988, indican que los géneros más parecidos a *Brochothrix thermosphacta*, son *Listeria* y *Lactobacillus*, pero en ninguno de estos estudios está justificada la inclusión de *Brochothrix thermosphacta* como una especie que pudiera pertenecer a alguno de estos generos (Mortimer, Starr, 1981).

Tabla 14. Características que distinguen a *Brochothrix thermosphacta* de *Listeria monocytogenes* (Feresu y Jones, 1988).

Característica	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Pleomorfismo	+	—
Movilidad	—	+
Crec a 5 °C	++	+
Crec a 35 °C	—	+
Crec a 50 °C	—	+
Producción de ácido a partir de		
Galactosa	+	—
Inositol	+	—
Inulina	+	—
Manitol	+	—
Rafinosa	+	—
Sacarosa	+	—
Xilosa	+	—
β-hemólisis	—	+
Sensibilidad al Sulfato de estreptomycinina	—	+

En 1988 Feresu y Jones llevaron a cabo un estudio taxonómico para determinar las diferencias existentes entre *Brochothrix thermosphacta*, *Listeria monocytógenes*, *Erysipelothrix* y *Lactobacillus*. En la tabla 14, se encuentran algunas de las características que diferencian a *Brochothrix thermosphacta* de *Listeria monocytógenes*.

El parecido entre *Brochothrix thermosphacta* y las bacterias ácido lácticas, se limita a la capacidad para crecer en anaerobiosis y bajo atmosferas con un alto porcentaje de dióxido de carbono, además de la producción de ácido láctico a partir del metabolismo de la glucosa (Guerrero y Calderón, 1994)

2.7.1 TEMPERATURA DE CRECIMIENTO

La temperatura es uno de los factores externos que más influencia tiene sobre el crecimiento microbiano. En el caso de los microorganismos psicotrófos, el metabolismo celular puede ser afectado positiva o negativamente afectando de forma importante, el ritmo metabólico, el transporte de los nutrientes al interior de la célula, el tamaño celular. En el caso de ciertos microorganismos puede aumentar, una síntesis flagelar más eficiente y la disminución del tiempo de duplicación cuando el microorganismo es sometido a incubación con aereación (Jay, 1994)

En el caso del ritmo metabólico, los microorganismos psicrotrofos son más lentos, comparados con los mesófilos. Según los estudios realizados por Ingraham en 1962, al descender la temperatura el crecimiento de los microorganismos psicrotrofos disminuye y se vuelve más lento que el de los mesófilos.

En los estudios realizados por Wilkins y colaboradores en 1972 y 1973, se logró determinar un activo metabolismo en especies psicrotrofas el cual se debe a un eficiente sistema de transporte de nutrientes resistente al frío mismo que se encarga de proporcionar a la célula, elevadas concentraciones de sustratos intracelulares.

Los microorganismos psicrotrofos suelen tener en su membrana lípidos que proporcionan mayor fluidez. Es posible suponer que la mayor movilidad de la membrana de los microorganismos psicrotrofos facilite el transporte de nutrientes a través de la membrana a temperaturas bajas. Además, en estas condiciones, las permeasas de transporte de los microorganismos psicrotrofos, son más operativas que las de los mesófilos. Cualquiera que sea el mecanismo específico del aumento del transporte de nutrientes, se ha demostrado que los microorganismos psicrotrofos son más activos que los mesófilos en cuanto a la absorción de solutos a baja temperatura (Jay, 1994).

Según los estudios realizados por Olsen y Jeseke en 1963, cuando un microorganismo psicrotrofo es incubado a baja temperatura, el tiempo de generación del cultivo, disminuye considerablemente si se aereó durante el periodo de incubación.

En un estudio con microorganismos psicrótrofos anaerobios facultativos realizado en anaerobiosis, se puso de manifiesto que los microorganismos crecían lentamente y que eran capaces de sobrevivir por más tiempo, que morían rápidamente cuando eran sometidos a altas temperaturas y que en anaerobiosis producían cantidades máximas de células que eran de menor tamaño que las crecidas en aerobiosis (Upadhyay y Stokes, 1962)

Según Sinclair y Stokes, 1963, las cifras de recuento generalmente elevadas en el caso de los microorganismos psicrótrofos incubados a baja temperatura, son debidas en parte al aumento de la solubilidad del oxígeno y consecuentemente a su mayor disponibilidad (Jay, 1994)

2.7.2 NATURALEZA DE LA TERMOSENSIBILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS PSICRÓTOS

Desde hace años se ha sabido que los microorganismos psicrótrofos, generalmente son incapaces de crecer a temperaturas por encima de 30 °-35 °C. Los primeros en señalar las causas de esta limitación fueron Edwards y Rettger en 1937, quienes llegaron a la conclusión de que la temperatura máxima de crecimiento de las bacterias puede tener una determinada relación con la temperatura mínima de destrucción de las enzimas respiratorias.

Se ha demostrado que algunas enzimas respiratorias son inactivadas a las temperaturas máximas de crecimiento de algunos microorganismos psicrótrofos.

Por lo tanto, la sensibilidad térmica de determinados enzimas de los microorganismos psicrotírofos, es por lo menos, uno de los factores que limitan su crecimiento a baja temperatura (Jay, 1994)

Cuando se someten algunos microorganismos psicrotírofos a temperaturas superiores a su temperatura máxima de crecimiento, la muerte de las células va acompañada de la salida de varios constituyentes intracelulares (Hagen, 1964, Haight, 1966, Strange, 1964) Se ha demostrado que las sustancias que salen al exterior de la célula son proteínas, DNA, RNA, aminoácidos libres y fósforo de los lípidos

Si bien no se conocen del todo las causas concretas de la salida de los constituyentes de la célula, el parecer en este proceso interviene la ruptura de la membrana celular, siendo estos acontecimientos, la consecuencia de la inactivación de los enzimas celulares (Jay, 1994)

Cualquiera que sea el verdadero mecanismo de la muerte de las células de los microorganismos psicrotírofos a temperaturas de unos pocos grados por encima de su temperatura máxima de crecimiento, su destrucción a estas temperaturas relativamente bajas es típica de este grupo de microorganismos. Esto es especialmente cierto para aquellos microorganismos que tienen una temperatura óptima de crecimiento de 20 °C o ligeramente superior a esta

La referencia de varios investigadores sobre microorganismos psicrótrofos aislados y estudiados en las últimas dos décadas, revelan que estos microorganismos son capaces de crecer a 0 °C, con un crecimiento óptimo dentro de un intervalo de temperatura comprendido entre los 15 ° y 25 °C y una temperatura máxima de crecimiento entre 20 y 35 °C (Hagen, 1964; Haight, 1966; Larkin, 1966; Sinclair, 1964 y 1965, Straka, 1960).

Brochothrix thermosphacta, MICROORGANISMO PSICRÓTROFO

Brochothrix thermosphacta al ser un microorganismo psicrótrofo, juega un papel importante en el deterioro de la carne refrigerada así como de la carne empacada bajo atmósferas controladas a temperatura de refrigeración (Guerrero y Calderón, 1994).

Es capaz de crecer bien a una temperatura entre 0 a 5 °C, su crecimiento óptimo tiene lugar a temperaturas entre 20 a 22 °C pero aún a 0 y a -1 °C sigue creciendo, a 37 °C no hay desarrollo debido a la naturaleza de las proteínas que conforman a la célula, ya que a esta temperatura se altera la estructura proteica de la membrana celular y la actividad de ciertas enzimas, ocasionando una destrucción total de la bacteria, sin embargo, existen algunas cepas más resistentes que son capaces de sobrevivir a 55 °C durante 10 minutos e incluso a 63 °C, pero la mayoría de las cepas mueren pasados los 5 min (Noskova, 1972).

Su crecimiento óptimo tiene lugar entre 20 y 22 °C, a una temperatura entre 0° y 4 °C sigue creciendo y en menos de 7 días se pueden llegar a alcanzar cuentas elevadas (10^6 cel/cm²), por ello se considera como una de las especies responsables de la descomposición de la carne almacenada en refrigeración y principalmente de los productos empacados con atmósferas controladas

En 1967 Gardner y col., determinaron que el efecto inhibitorio del empleo de las atmósferas con un alto contenido de dióxido de carbono puede potencializarse cuando se tiene un control de la temperatura. Estos investigadores trabajaron con varias cepas de *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus* y *Kurthia zopfii* y lo que observaron en el caso específico de *Brochothrix thermosphacta* fue que las bajas concentraciones de dióxido de carbono, estimulan el crecimiento de esta especie, incluso mas que el de *Lactobacillus*, pero a medida que se incrementa la concentración del anhídrido, el grado de inhibición se hace evidente. Cabe resaltar que la inhibición del crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* es mayor cuando la temperatura es de 16 °C que a 2 °C (Figura 5.)

2.7.3 PLEOMORFISMO CELULAR

Brochothrix thermosphacta es un microorganismo cuyas células presentan diferencias morfológicas importantes, siendo ésta una de las características que lo distinguen de otros microorganismos, aunque dicho pleomorfismo no es exclusivo de *Brochothrix thermosphacta*, sino que también se puede observar en varias especies del género *Arthrobacter* y *Kurthia zopfii*. Las diferencias entre este género y especie con respecto a *Brochothrix thermosphacta*, es muy grande ya que las especies del género *Arthrobacter* al igual que *Kurthia zopfii* son aerobios estrictos, siendo incapaces de crecer en el medio selectivo (STAA) para el aislamiento de *Brochothrix thermosphacta* (Gardner, 1966).

El pleomorfismo que presenta *Brochothrix thermosphacta*, varía en función del medio de cultivo empleado, de la composición del mismo y de la edad del cultivo (Davidson y col., 1968).

Cuando se tiene un cultivo joven de *Brochothrix thermosphacta*, el microorganismo se presenta como bacilos largos, gram positivos y tienen una longitud de 1.0-2.0 μm y un diámetro de 0.6-0.75 μm , mientras que cuando el cultivo envejece, los bacilos se transforman en células cocoides, en tales circunstancias el diámetro de los cocos es de 0.3-0.5 μm (Manual Bergey's, 1986).

Dicho pleomorfismo se presenta en una misma colonia, por ejemplo, en la parte central, *Brochothrix thermosphacta*, tiene forma cocobacilar agrupándose en cadenas cortas y en racimos irregulares, mientras que en la periferia lo que se observa son bacilos largos acomodados en cadenas largas, lo que indica que en el centro de la colonia se encuentran las células viejas y en la periferia las jóvenes (Conn y Dimmick, 1948 y Stevenson, 1961).

En los cultivos viejos, de poco más de 24 h, los bacilos se convierten en células cocoides y tanto unos como otros, pueden llegar a perder la capacidad para retener la tinción de Gram (Davidson y col., 1968)

La composición del medio de cultivo, juega un papel importante en el desarrollo del ciclo cocobacilar, por ejemplo, cuando se emplea el medio de cultivo APT, la reversión de bacilos largos a bacilos cortos y posteriormente a cocobacilos, no es tan pronunciada como cuando se utiliza el medio BHI (Davidson y col, 1968)

2.7.4 METABOLISMO AEROBIO

Brochothrix thermosphacta, es un microorganismo aerobio facultativo y es responsable del deterioro de la carne y de otros alimentos, tanto frescos como empacados

En el caso específico de la carne, el deterioro ocasionado por este microorganismo es

menor cuando se tiene la carne fresca sin empacar, debido a que otras especies no le permiten alcanzar cuentas elevadas que den lugar a una rápida descomposición, mientras que en la carne empacada, debido a la falta de oxígeno, se inhibe el crecimiento de especies como *Pseudomonas*, con lo cual el porcentaje de *Brochothrix thermosphacta* en la carne empacada se incrementa considerablemente (Guerrero y Calderón, 1994)

Una de las diferencias importantes entre la carne empacada y sin empacar que se encuentra contaminada por *Brochothrix thermosphacta*, es el porcentaje que puede alcanzar este microorganismo en cada tipo de carne, de ahí la importancia de que en la carne fresca que vaya a ser destinada para la elaboración de productos cárnicos o que sea almacenada por largo tiempo, se procure tener una cuenta mínima posible de este microorganismo (Guerrero y Calderón, 1994). Aunque generalmente en la carne empacada las bacterias lácticas se encuentran en mayor cantidad que *Brochothrix thermosphacta*, el deterioro que este microorganismo puede ocasionar en el alimento, es de considerable importancia.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

3.1 TOMA DE MUESTRA

Para el desarrollo de este trabajo se manejaron tres muestras de pierna fresca de cerdo procedentes de distintos animales, dichas muestras fueron adquiridas en una carnicería, la cual se abastece de carne procedente del Rastro Municipal de Santa Clara, Ciudad Nezahualcoyotl de la Zona Metropolitana. La metodología seguida para el desarrollo de este trabajo de investigación fue la siguiente:

- Para la preparación de la muestra fue necesario trabajar bajo condiciones de esterilidad.
- Se tomó una porción de 100 g de carne de cada una de las diferentes muestras de pierna de cerdo.
- Los 100 g de carne, se transfirieron a un vaso de licuadora, se adicionaron 90 mL de agua peptonada al 0.1 % y se licuo aproximadamente a 800 rpm durante 2 minutos (dil. 1:10).
- Se hicieron diluciones hasta 10^{-4} .
- Se realizó la cuenta en placa por vertido, utilizando el medio selectivo para el aislamiento de *Brochothrix thermosphacta*, agar aulfato de estreptomicina-acetato de talio, actidiona (STAA) desarrollado por Gardner en 1966.

- Las cajas se etiquetaron e incubaron a una temperatura entre 20 a 25 °C durante 24 horas.
- Una vez concluido el periodo de incubacion, se seleccionó la dilucion mas adecuada para la toma de las colonias que presentaban la morfología típica de *Brochothrix thermosphacta*. Las colonias se transfirieron por duplicado a dos placas con medio STAA. Las placas inoculadas se sometieron a un segundo periodo de incubación.
- Una vez concluido el segundo periodo de incubacion, se procedió a realizar
 - La observación de la morfología de las colonias
 - Las pruebas bioquimicas generales
 - La observación de la morfología celular al microscopio
 - Las pruebas bioquimicas especificas

3.2 MORFOLOGÍA COLONIAL DE *Brochothrix thermosphacta*

Las colonias de *Brochothrix thermosphacta*, presentan ciertas particularidades, por lo que es necesario tomar en cuenta el tamaño, la forma y los bordes de la colonia para poder realizar una adecuada primera seleccion de las colonias del microorganismo en estudio

Las características coloniales de *Brochothrix thermosphacta*, se enlistan a continuación

• Colonias redondas, opacas, no pigmentadas, convexas con bordes completos en los cultivos jóvenes de 18 h, mientras que en los cultivos viejos (24 h o mas) la colonia adquiere una apariencia de huevo frito. El diámetro de las colonias es de 0.75-1.5 mm

3.3 PRUEBAS BIOQUÍMICAS GENERALES

Una vez hecha la selección presuntiva de las colonias que presentaban las características coloniales de *Brochothrix thermosphacta*, se realizaron las pruebas bioquímicas generales para este microorganismo, con el fin de descartar aquellas que no tuvieran el perfil de *Brochothrix thermosphacta*.

La serie de pruebas bioquímicas generales que se realizaron en el presente trabajo, fueron las que llevaron a cabo Feresu y Jones en 1988, para el estudio taxonómico de *Brochothrix thermosphacta* y otros microorganismos relacionados, así como las sugeridas por Collins y Keddie en la 9ª edición del Manual Bergey's, 1986. Dichas pruebas se presentan a continuación

- Oxidasa
- Catalasa

- RM-VP
- Movilidad
- Producción de Indol
- Producción de H₂S
- Oxidación -Fermentación
- Reducción de Nitratos
- Temperaturas de crecimiento
- Crecimiento con 6.5 y 10.0% de NaCl
- Determinación de la presencia de Citocromos
- Hidrólisis de la Caseína
- Hidrólisis de la Gelatina
- Crecimiento en el medio MRS

3.4 MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA

Como se menciona anteriormente, *Brochothrix thermosphacta*, es un microorganismo pleomorfo, su morfología varía en función del medio de cultivo empleado, de la composición del mismo y de la edad del cultivo.

Se cree que para adaptarse a condiciones adversas y poder sobrevivir, la célula realiza cambios en su estructura morfológica (Davidson y col., 1968).

Cuando se emplea el medio de cultivo APT, la reversion de bacilos largos a bacilos cortos y posteriormente a cocobacilos, no es tan pronunciada como cuando se utiliza el medio BHI. Por lo anterior, es necesario observar la morfología celular empleando para ello un microscopio óptico y tomando muestras de diferentes edades (18, 24, 48 y 120 h)

Para que los resultados fueran reproducibles se tomo en cuenta que en el centro de las colonias de *Brochothrix thermosphacta*, el microorganismo se presenta como cocobacilo agrupado en cadenas cortas y en racimos irregulares, mientras que en la periferia se presenta como bacilos largos acomodados en cadenas largas (Conn y Dimmick, 1948, Stevenson, 1961)

Para llevar a cabo la toma de muestras, siempre se tomo una asada de la periferia de la colonia, de tal manera que las células que se observaban al microscopio fueran las células mas jóvenes

3.5 MEDICIÓN CELULAR

Al realizar un estudio para la caracterización de un microorganismo, el tamaño de sus células es uno de los parámetros mas importantes que se debe determinar, mas aún si se trata de un microorganismo pleomórfico como es el caso de *Brochothrix thermosphacta*

Para realizar esta medición, se emplearon las preparaciones a partir de las cuales se observó el pleomorfismo celular de los cultivos de diferentes edades de cada una de las distintas cepas.

3.6 BIOQUÍMICAS ESPECÍFICAS

Para llevar a cabo la confirmación de que las colonias aisladas eran de *Brochothrix thermosphacta*, se realizaron varias pruebas bioquímicas específicas para este microorganismo.

La selección de las pruebas bioquímicas específicas que se hicieron se basó en el estudio taxonómico llevado a cabo por Feresu y Jones en 1988. Según los resultados de este estudio se encontró un gran parecido entre *Brochothrix thermosphacta* y *Listeria monocytogenes*, es por ello que se hizo una selección de las pruebas que diferencian a uno de otro. Estas pruebas se enlistan a continuación:

- Crecimiento en anaerobiosis
- Termorresistencia a 63 °C durante 5 min
- Hemólisis en Agar Sangre
- Producción de ácido a partir de ciertos carbohidratos

-Inositol

-Melibiosa

-Arabinosa

-Xilosa

• **Antibiograma**

-Ampicilina

-Cefaloridina

-Cloramfenicol

-Eritromicina

-Kanamicina

-Penicilina G

-Sulfato de estreptomina

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Y

DYSCUSYÓN DE RESULTADOS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para llevar a cabo el presente estudio, se tomaron tres muestras de pierna fresca de cerdo (de diferentes animales), con el propósito de aislar e identificar a *Brochothrix thermosphacta*, además de determinar la incidencia de este microorganismo en carne fresca, para lo cual se realizaron diluciones hasta 10^{-10} .

Después de haber sometido a incubación las placas de agar STAA inoculadas con cada una de las últimas diluciones (10^{-6} - 10^{-10}), se hizo la selección de las placas que tuvieran entre 30-500 colonias.

Posteriormente se hizo la transferencia de las colonias a placas de agar sulfato de estreptomicina-acetato de talio-actidiona (STAA), empleando para ello palillos de madera esteriles. Para poder reconocer a cada una de las colonias transferidas, se utilizó la siguiente nomenclatura: se asignó un número a cada una de las colonias al momento de llevar a cabo la transferencia a la placa con agar STAA y para saber a cual de las distintas muestras pertenecía, se utilizó la letra M seguida de un número el cual indica la muestra de la que procede la colonia enumerada.

Para el caso de la muestra 1 se eligió la placa correspondiente a la dilución 10^{-6} , en la cual se tenían 199 colonias, para la muestra 2 se seleccionó la placa de la dilución 10^{-6} , en la que se encontraban 103 colonias y en la muestra 3, la dilución más adecuada fue la 10^{-1} , en la que crecieron 87 colonias.

Finalmente, al realizar toda una serie de pruebas bioquímicas y observaciones morfológicas, se logró aislar e identificar a 9 cepas correspondientes a *Brochothrix thermosphacta* en la tabla 1, se encuentra el número de cepas aisladas de cada una de las tres diferentes muestras de pierna fresca de cerdo, así como la incidencia de este microorganismo en cada una de las muestras de carne

De la muestra uno se aislaron las colonias 8, 24, 66 y 73, de la muestra dos la 27, 30 y 40 y finalmente de la muestra tres las colonias 6 y 23. Todas estas colonias, tienen el perfil que caracteriza a *Brochothrix thermosphacta*.

Tabla 1 Incidencia de *Brochothrix thermosphacta* en distintas muestras de pierna fresca de cerdo

Muestra de carne	Dilución seleccionada	Nº de colonias en la dilución	Nº de colonias identificadas como <i>Brochothrix thermosphacta</i>	Incidencia
1	10 ⁶	199	4	2.1 %
2	10 ⁶	103	3	2.33 %
3	10 ¹	87	2	2.32 %

MORFOLOGÍA COLONIAL

Inicialmente, la mayoría de las colonias que crecieron en el medio STAA, presentaron una morfología colonial similar a la que caracteriza a *Brochothrix thermosphacta* mismas que se mencionan a continuación:

* Colonias redondas, no pigmentadas, bordes completos en los cultivos jóvenes (18 h), mientras que en los cultivos viejos (24 h o más), debido a la edad de la colonia, la estructura se modifica dando una apariencia de huevo frito (Manual Bergey's, 1986)

Las colonias de algunas de las cepas aisladas (8 M-1 y 23 M-23) no eran opacas durante la primera etapa de incubación, pero a medida que el cultivo envejecía, iban perdiendo humedad y al cabo de 5 días se tenían colonias opacas.

Las colonias de *Brochothrix thermosphacta*, tienen un diámetro entre 0.75 - 1.5 mm (Manual Bergey's, 1986). Experimentalmente, los diámetros de las colonias seleccionadas se aproximaron mucho a lo reportado en la literatura (Tabla 2)

Con respecto a la apariencia de huevo frito de las colonias, solamente 3 cepas (24 M-1, 8 M-1 y 6 M-3) tenían dicha apariencia.

Una de las características comunes a todas las cepas seleccionadas, era un olor similar al de los productos lácteos, en los cultivos con una edad de poco más de 18 horas.

Una vez hecha la primera selección de las colonias sospechosas, se procedió a resembrarlas, empleando para ello el medio de cultivo selectivo STAA para *Brochothrix*

thermosphacta, e incubado a 22 °C en anaerobiosis, para poder de ésta forma inhibir el crecimiento de aquellos microorganismos aerobios obligados que tuvieran una apariencia colonial similar a la de *Brochothrix thermosphacta*

El medio STAA fue desarrollado por Gardner en 1966 para el aislamiento selectivo de *Brochothrix thermosphacta*.

La selectividad de este medio esta determinada por el sulfato de estreptomycin, antibiótico de amplio espectro sobre bacterias gram negativas, la actidiona, que inhibe el crecimiento de hongos y el acetato de talio, compuesto en el que se encuentra presente un metal pesado, el cual tiene la capacidad de desnaturalizar las proteínas por la reacción que se lleva a cabo entre el metal y los enlaces disulfuro. Cabe mencionar que la cantidad de actidiona y de acetato de talio es 10 veces menor que la de sulfato de estreptomycin. En este medio, ocasionalmente pueden llegar a crecer algunas colonias de *Pseudomonas*, las cuales pueden ser diferenciadas facilmente de *Brochothrix thermosphacta* con la realización de la prueba de la oxidasa (Gardner, 1966).

PLEOMORFISMO CELULAR

El pleomorfismo que presenta *Brochothrix thermosphacta* es una característica muy importante para la diferenciación inicial del microorganismo, por lo que se recurrió a la

observación de la morfología celular vista al microscopio ya que son pocas las especies que presentan este ciclo bacilo-cocoide

En un principio, la morfología microscópica no fue el factor decisivo para la selección de las cepas que presentaban algún cambio morfológico a medida que el cultivo envejecía, y no fue sino hasta después de realizar varias pruebas bioquímicas que se tuvieron los elementos suficientes para descartar algunas de las colonias aisladas en la primera etapa.

En los cultivos jóvenes el microorganismo, al ser observado al microscopio, se presenta como bacilo largo y conforme envejece el cultivo, las células adquieren formas cocobacilares y cocoides (Conn y Dimmick, 1948; Stevenson, 1961), por ello para determinar si las diferentes cepas presentaban pleomorfismo, se realizaron observaciones al microscopio de la morfología celular de cada una de las colonias, tomando una porción de la periferia de la colonia. La toma de la muestra se hizo a diferentes tiempos, para tener células de diferentes edades. Debido a que el pleomorfismo celular fue similar para las nueve cepas solo se proporcionan las fotos de la cepa 66 M-1 (Fotografías 1, 2 y 3)

En la tabla 2 aparece la descripción detallada de las observaciones morfológicas tanto de las colonias como de las células vistas al microscopio.

Tabla 2. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas

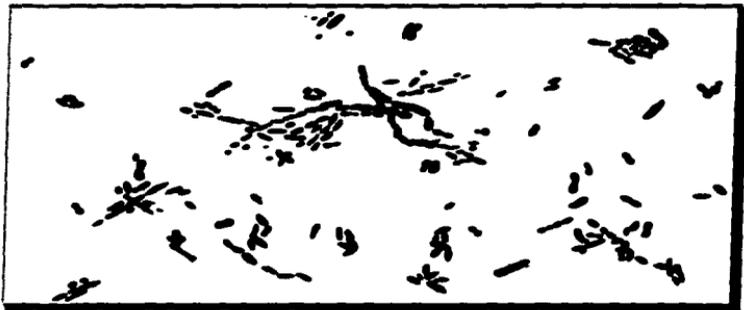
Muestra	Cepa	Características Macroscópicas	Características Microscópicas
	Ref ^a	Colonia redonda, opaca, bordes completos en cultivos jóvenes, apariencia de huevo frito en cultivos viejos, no pigmentada y un diámetro entre 0.75-1.5 mm	Bacilos Gram (+), en cultivos jóvenes se observan cadenas largas y filamentosas mientras que en los cultivos viejos se presentan como cocobacilos y cocos Longitud de los bacilos 0.75-1.3 µm Diámetro cocos 0.3-0.5 µm
1	8	Colonia redonda, opaca, no pigmentada, diámetro 1.4 mm Apariencia de huevo frito	Bacilos Gram (+), pleomorfismo característico Longitud de los bacilos 1.0 µm, diámetro de los cocos 0.5 µm
1	24	Colonia redonda, no pigmentada, bordes completos, diámetro de las colonias 1.3 mm Apariencia de huevo frito	Bacilos Gram (+), pleomorfismo característico Longitud de los bacilos 0.8 µm, diámetro de los cocos 0.4 µm
1	66	Colonias redondas con algunos bordes incompletos, opaca, no pigmentada, diámetro de la colonia 1.2 mm	Bacilos Gram (+), pleomorfismo característico Longitud de los bacilos 0.8 µm, diámetro de los cocos 0.5 µm
1	73	Colonias redondas, no pigmentadas, opaca, diámetro de las colonias 1.2 mm	Bacilos Gram (+), pleomorfismo característico Longitud de los bacilos 1.1 µm, diámetro de los cocos 0.6 µm
2	27	Colonias redondas, bordes completos, no pigmentadas, opacas, diámetro 1.4 mm	Bacilos Gram (+), pleomorfismo característico Longitud de los bacilos 1.0 µm, diámetro de los cocos 0.5 µm
2	30	Colonias redondas, opacas, bordes completos, no pigmentadas, diámetro 1.1 mm	Bacilos Gram (+), pleomorfismo característico Longitud de los bacilos 1.3 µm, diámetro de los cocos 0.6 µm
2	40	Colonias redondas, opacas, no pigmentadas, bordes completos, diámetro 1.0 mm	Bacilos Gram (+), pleomorfismo característico Longitud de los bacilos 1.2 µm, diámetro de los cocos 0.7 µm
3	6	Colonias redondas, opacas, no pigmentadas, bordes incompletos, diámetro 1.0 mm Apariencia de huevo frito	Bacilos Gram (+), pleomorfismo característico Longitud de los bacilos 0.9 µm, diámetro de los cocos 0.4 µm
3	23	Colonias redondas, no pigmentadas, bordes completos, diámetro 1.3 mm	Bacilos Gram (+), pleomorfismo característico Longitud de los bacilos 1.2 µm, diámetro de los cocos 0.6 µm

Ref^a = Referencia bibliográfica (Manual Bergey s. 1986)

Fotografía 1. Morfología celular de *Brochothrix thermosphacta* a las 18 horas de incubación (cepa -40 M-2)



Fotografía 2. Morfología celular de *Brochothrix thermosphacta* a las 48 horas de incubación (cepa 40 M-2)



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Fotografía 3 Morfología celular de *Brochothrix thermosphacta*
a las 140 horas de incubación (cepa 40 M-2)



MEDICIÓN CELULAR

La medición de las células es una de las determinaciones más importantes que se deben de realizar cuando se lleva a cabo un estudio microbiológico y ésta adquiere especial relevancia cuando el microorganismo en cuestión es pleomorfo (Ramírez-Gama y col., 1992)

La medición celular de cada una de las cepas seleccionadas se realizó empleando las preparaciones correspondientes a los cultivos, tanto jóvenes como viejos. En los cultivos de 18 h, el microorganismo se presenta como bacilo largo agrupado en cadenas cortas o largas y filamentosas, mientras que en los cultivos de 5 días, se tienen células cocoides (Tabla 2)

La etapa intermedia entre un cultivo joven y uno viejo, puede ser detectada fácilmente por la presencia de células cocobacilares, las cuales a medida que el cultivo envejece se van transformando en células cocoides. Cabe mencionar que en la literatura no se encuentra reportado el tamaño de las células cocobacilares para los cultivos de *Brochothrix thermosphacta*, esto seguramente se debe a que se trata de una etapa de transición.

Al llevar a cabo la medición de los bacilos y de los cocos, se consideró conveniente medir a los cocobacilos y tener un valor aproximado de las dimensiones de las células que se encuentran en dicho estado de transición (Tabla 3).

En el caso específico de la cepa 40 M-2 con una edad de 24-48 h, se encontró una proporción elevada de células cocoides, lo que sugiere que el cambio morfológico de bacilos largos a cocobacilos para esta cepa, se presenta poco antes de las 24 horas

Tabla 3. Tamaño de las células cocobacilares con una edad de 24-48 horas, correspondientes a cada una de las cepas seleccionadas.

Cepa	Longitud promedio (μm)	Diametro promedio (μm)
8 M-1	0.6-0.8	0.4-0.6
24 M-1	0.4-0.6	0.3-0.4
66 M-1	0.5-0.6	0.3-0.4
73 M-1	0.6-0.9	0.3-0.5
27 M-2	0.5-0.7	0.4-0.6
30 M-2	0.9-1.1	0.4-0.5
40 M-2	0.7-0.8	0.4-0.5
6 M-3	0.4-0.6	0.2-0.3
23 M-3	0.6-0.8	0.3-0.5

Nota: Para medir el diametro se considero la parte mas corta de la celula y para la longitud la parte mas larga

METABOLISMO AEROBIO

Brochothrix thermosphacta es un microorganismo aerobio facultativo, aunque es necesario mencionar que su desarrollo se ve favorecido cuando se tiene una atmósfera constituida en parte por oxígeno (Gill y Newton, 1978)

El tiempo de generación de *Brochothrix thermosphacta*, es un indicador de las condiciones que el microorganismo prefiere para poder multiplicarse y lograr un predominio sobre otras especies presentes en el alimento, por ejemplo cuando la atmósfera tiene una pequeña proporción de oxígeno, el tiempo de generación para *Brochothrix thermosphacta*, es considerablemente menor al que presenta cuando es sometido a una atmósfera compuesta exclusivamente por dióxido de carbono y nitrógeno

Aunque en la carne empacada bajo atmósferas controladas, la flora que predomina no es *Brochothrix thermosphacta* sino *Lactobacillus*, debido a que dicho género bacteriano tiene un tiempo de generación menor al que presenta *Brochothrix thermosphacta*, ocasionando con ello que la incidencia de *Brochothrix thermosphacta* sea siempre menor a la de *Lactobacillus* (Gill y Newton, 1978) Otro de los factores que influyen sobre la proliferación de *Brochothrix thermosphacta* en la carne empacada, es la presencia de *Enterobacterias* mismos que a pesar de requerir mayor tiempo para duplicarse, tienen una alta afinidad por la glucosa, sustrato que tanto *Enterobacterias* como *B thermosphacta*,

requieren para poder llevar a cabo su metabolismo, ocasionando que el tiempo de generación para *Brochothrix thermosphacta* se incremente de manera importante (Gill y Newton, 1978)

En base a lo anterior y tomando en cuenta que *Brochothrix thermosphacta* es un microorganismo aerobio facultativo, en la etapa inicial de aislamiento, las placas de agar STAA inoculadas, se sometieron a un proceso de incubación anaerobia, para poder descartar desde un principio a las colonias aerobias estrictas y reducir considerablemente el número de colonias a identificar

La selección de las pruebas bioquímicas generales (Tabla 4), se hizo con base en los trabajos de investigación realizados por Gill y Newton, 1978, Feresu y Jones, 1988 y la información publicada en el Manual Bergey s, 1974 y 1986

DETECCIÓN DE CITOCROMOS

Una de las características que distingue a los microorganismos aerobios de los anaerobios es que los primeros poseen citocromos. Los citocromos son hemoproteínas transferidoras de electrones que forman parte de la cadena respiratoria (Lehninger, 1981).

Existe una gran variedad de citocromos, los cuales se diferencian entre sí por su estructura, función y localización a lo largo de la cadena respiratoria y se encuentran

Tabla 4. Resultados de las pruebas bioquímicas generales para *Brochothrix thermosphacta*.

Muestra		1	1	1	1	2	2	2	3	3
Cepa	Ref.º	8	24	60	73	27	30	40	6	23

Crec en STAA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Catalasa	+	+++	+	+++	+++	+	+	+	+	+
Rojo de metilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+++	+	+++	+	+	+	+
Movilidad	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Produccion H ₂ S	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Produccion de Indol	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Fermentacion	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidacion	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Reduce nitratos	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Crec a 4 °C	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Crec a 20 °C	++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+++	+++
Crec a 22 °C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Crec a 37 °C	---	---	++	---	---	++	---	---	---	++
Hidrolisis de										
*Gelatina	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Crec con NaCl										
6.5 %	++	+++	++	++	+	++	+	+++	+	+
10.0 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Ref.º = Referencia bibliografica (Manual Bergey s, 1986)

+++ = maximo crecimiento, ++ = crecimiento abundante, + = buen crecimiento, ++ = muy poco crecimiento, --- = sin crecimiento

posicionados de tal manera que actúan como una serie consecutiva de transportadores electrónicos (Stanier, 1981) La detección de los citocromos bacterianos, se lleva a cabo mediante la realización de ciertas pruebas y con el empleo de reactivos específicos, mismos que tienen la capacidad de inhibir la actividad de algunos citocromos, lo que puede ocasionar la muerte del microorganismo si este es un aerobio obligado, y la desviación del metabolismo en el caso de los facultativos (Stanier, 1981)

Durante el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria, así como en diversas reacciones de hidroxilación y de oxigenación, se pueden formar productos tóxicos en la reducción parcial del oxígeno probablemente como intermediarios transitorios sobre los centros activos de tales enzimas. Los más importantes son el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, compuestos altamente reactivos capaces de lesionar irreversiblemente diversas biomoléculas (Lehninger, 1981) Las células aerobias contienen generalmente el enzima superóxido dismutasa, que convierte al superóxido en peróxido de hidrógeno y en oxígeno molecular (Fridovich, 1974) El peróxido de hidrógeno formado por la superóxido dismutasa se descompone por la acción de la catalasa, dando como productos agua y oxígeno molecular. Con base en lo anterior, si un microorganismo es catalasa positivo, entonces posee citocromos en la cadena respiratoria

Para la detección de citocromos en la cadena respiratoria de las cepas en estudio se hicieron las pruebas de la catalasa, la bencidina ácida, crecimiento en caldo KCN y crecimiento en presencia de azida de sodio

Con la prueba de la catalasa, es posible hacer una primera aproximación para saber si el microorganismo es aerobio o anaerobio, es por ello que generalmente se realiza dicha prueba al principio de un estudio que tenga como propósito la identificación de un determinado microorganismo para de esta manera poder realizar una selección e identificación inicial de las colonias anaerobias obligadas y las facultativas de las aerobias estrictas

En el Manual Bergey s, de 1986, se menciona que *Brochothrix thermosphucta* es catalasa positivo. Experimentalmente, se observó que algunas de las colonias que posteriormente habrían de ser seleccionadas como posible prospecto de ser *Brochothrix thermosphucta*, dieron una reacción fuertemente catalasa positiva, tal es el caso de las cepas 8, 66 y 73 de la muestra uno (Tabla 4)

La prueba de la bencidina no es específica debido a que solo es posible detectar en forma muy general la presencia de compuestos hierro porfirinicos en la cadena respiratoria del microorganismo en estudio. Para realizar esta prueba, se tomaron en cuenta las modificaciones hechas por Deibel y Evans en 1959, quienes propusieron algunas

modificaciones referentes al reactivo empleado, el medio de cultivo usado y el manejo y control de la temperatura de incubación, debido a que cada uno de estos factores influyen en el resultado final. Los investigadores antes citados, determinaron que la bencidina ácida es más sensible que el tradicional reactivo básico. Con respecto al medio de cultivo, este debe tener un bajo contenido de sales de hierro (medio APT). Es necesario llevar un estricto control de la temperatura de incubación, ya que los resultados pueden variar si la temperatura es de 20 °C o 30 °C. Del adecuado control de los factores mencionados, depende la confiabilidad de la prueba.

Cuando la prueba resulta positiva se asume que el microorganismo posee compuestos hierro porfirínicos.

En el caso de las cepas aisladas, algunas resultaron bencidina negativa, aunque cabe señalar que no por esto fueron descartadas ya que era necesario realizar toda una serie de pruebas de mayor especificidad como el crecimiento en medio con KCN y azida de sodio.

La identificación del citocromo aa₃, se puede lograr mediante el empleo de la azida de sodio o también con el uso de cianuro (KCN o KSCN).

Según el estudio taxonómico realizado por Feresu y Jones en 1988, para llevar a cabo estas dos pruebas, es aconsejable el manejo de diferentes concentraciones del reactivo (para determinar la concentración mínima inhibitoria) que habrá de reaccionar con el

citocromo en caso de encontrarse presente en la cadena respiratoria. Las concentraciones de azida de sodio y de cianuro de potasio que se manejaron fueron las siguientes 0.01 %, 0.02 %, 0.05 % y 2.5 %, 3.75 % y 5 % respectivamente

En la prueba con la azida de sodio, la mayoría de las cepas con las que se trabajó, crecieron abundantemente cuando la concentración del reactivo era de 0.01 %, el crecimiento disminuía un poco si se incrementaba la concentración a 0.02 %, mientras que con un 0.05 %, el crecimiento era considerablemente menor (Tabla 6)

En algunos casos el crecimiento era mínimo pero en general las nueve cepas aisladas resistieron las tres diferentes concentraciones de azida de sodio, excepto las cepas 30 M-2 y 6 M-3 que fueron las cepas que no crecieron cuando se tenía la concentración de 0.05 %

El crecimiento en el medio KCN tuvo un comportamiento similar al de la prueba con azida de sodio ya que con una concentración de 2.5 % el crecimiento era mayor que a concentraciones superiores. Es necesario mencionar que las cepas 66 M-1, 73 M-1 y 40 M-2 no resistieron el 5 % de KCN

Cuando se iniciaron los estudios sobre *Brochothrix thermosphacta*, se contaba con poca información y se le asociaba con las especies *Microbacterium lacticum* y *Microbacterium flavum* con los cuales comparte algunas características, entre las que se encuentra la presencia de citocromo aa₃ en la cadena respiratoria de *Brochothrix thermosphacta* (Davidson y col., 1968)

Para poder afirmar con toda seguridad que en la cadena respiratoria de las cepas aisladas e identificadas como *Brochothrix thermosphacta* se encuentra el citocromo aa₁, es necesario realizar un estudio mas completo acerca del sistema respiratorio de dichas cepas, ya que algunos microorganismos pueden presentar ramificaciones en la cadena respiratoria al utilizar citocromo oxidasa diferentes al citocromo aa₁, lo que ocasiona que el microorganismo sea capaz de sobrevivir en un medio adicionado con las sustancias antes indicadas

CRECIMIENTO CON CLORURO DE SODIO

El cloruro de sodio o sal común, ha sido empleado como conservador de los alimentos desde la antigüedad. Los primeros usos de la sal en los alimentos tuvo como finalidad la conservación de la carne (Jay, 1992)

Cuando un medio es adicionado de algun soluto, éste se hidrata ocasionando una disminución importante en la cantidad de agua disponible (a_w), situación que afecta considerablemente el metabolismo bacteriano. Cuando un microorganismo crece en un medio con una baja actividad de agua debido a la adición de un soluto, debe de realizar mas trabajo para extraer agua de la solución, dando como resultado un menor rendimiento en el crecimiento o una velocidad de crecimiento mas baja (Brock, 1978)

Aunque cabe señalar que existen algunos microorganismos que al encontrarse en un medio con un a_w muy bajo, ocasionado por la adición de una gran cantidad de soluto, pueden experimentar plasmolisis, fenómeno que da como resultado la inhibición del crecimiento y en algunos casos la muerte del microorganismo (Brock, 1978)

Una de las pruebas bioquímicas generales más comunes que se realizan para la identificación de un microorganismo es la de incubarlo en un medio de cultivo adicionado con un cierto porcentaje de cloruro de sodio. Según lo reportado en la literatura *Brochothrix thermosphacta*, es capaz de crecer con 6.5 % y 10 % de cloruro de sodio

Al someter a cada una de las cepas a incubación en un medio con las concentraciones mencionadas anteriormente, se observó que todas crecieron bastante bien cuando se tenía 6.5 % de sal, aunque en el caso de las cepas 73 M-1 y 23 M-3, el crecimiento fue menor, mientras que para una concentración de 10 % de NaCl, hubo una notoria disminución del crecimiento, pero en todos los tubos se percibió turbidez

CRECIMIENTO EN EL MEDIO SIM

El medio de cultivo SIM, es muy empleado dentro de la serie de pruebas bioquímicas generales utilizadas para la identificación preliminar de los microorganismos. Con el uso de este medio, es posible determinar la capacidad de algunas especies bacterianas para liberar

azufre a partir de los aminoácidos, en forma de sulfuro de hidrógeno, así como la producción de indol ocasionado por la degradación metabólica del triptofano y la movilidad del microorganismo debida a la presencia de flagelos y/o cilios.

En la literatura se encuentra reportado que *Brochothrix thermosphacta* es inmóvil, además de ser incapaz de producir sulfuro de hidrógeno e indol.

Al ser inoculadas cada una de las cepas en estudio se determinó que ninguna presenta movilidad además de ser incapaces de producir indol y sulfuro de hidrógeno (Tabla 4).

FERMENTACIÓN DE LA GLUCOSA

La fermentación es el proceso metabólico en el que los carbohidratos y compuestos afines son oxidados con liberación de energía en ausencia de cualquier aceptor de electrones de procedencia externa. Bajo estas condiciones solo se produce la oxidación parcial del compuesto orgánico y únicamente es liberada una pequeña parte de la energía, permaneciendo el resto en los productos resultantes (Brock, 1978). De hecho la fermentación es considerada como un proceso de baja eficiencia energética ya que solo una pequeña proporción de la energía contenida en el sustrato, es aprovechada por el microorganismo.

Con base en los estudios realizados por Dainty, 1980, Guerrero y Taylor, 1994 y Shelef, 1977, es evidente que *Brochothrix thermosphacta* es un microorganismo que lleva a cabo un proceso fermentativo ya que bajo ciertas condiciones de incubación es capaz de producir compuestos que le confieren a la carne olores desagradables ocasionados por productos tales como acetona, ácido acético, ácido isobutírico, ácido isovalérico, aldehídos y alcoholes entre otros

Para determinar si un microorganismo oxida o fermenta la glucosa, se emplea el medio de Hugh y Leifson, por ello las cepas en estudio fueron inoculadas en el medio O-F y fueron sometidas a un periodo de incubación. Una vez concluido dicho periodo, se pudo establecer que las nueve cepas fermentan la glucosa. Cabe señalar que en los tubos abiertos (sin cubrir con parafina), se percibía un olor similar al de los productos lácteos

TEMPERATURA DE CRECIMIENTO

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que influyen en el crecimiento y supervivencia de los organismos, la cual puede afectarles de dos maneras opuestas. Cuando aumenta la temperatura, las reacciones químicas y enzimáticas de la célula se llevan a cabo a una mayor velocidad y en consecuencia el crecimiento se acelera. Por otra parte, las proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares son sensibles a

temperaturas elevadas y pueden quedar inactivados irreversiblemente. En general se ha observado que conforme se aumenta la temperatura en un margen dado, el crecimiento y las funciones metabólicas se incrementan hasta un cierto punto en donde se producen reacciones de inactivación. Mas allá de este punto las funciones celulares descienden bruscamente a cero.

Para cada microorganismo existe una temperatura mínima por debajo de la cual no se produce crecimiento, una temperatura óptima en la que el crecimiento es más rápido y una temperatura máxima por encima de la cual no es posible el crecimiento.

En general se ha observado que la temperatura óptima se encuentra más cerca del máximo que del mínimo. Estas tres temperaturas, conocidas como temperaturas cardinales, son características para cada tipo de microorganismo (Brock, 1978).

Para llevar a cabo la identificación de cualquier microorganismo es necesario conocer las temperaturas cardinales, esto con el propósito de establecer las condiciones en las cuales el microorganismo es capaz de desarrollarse.

En base al perfil térmico, los microorganismos se pueden clasificar en tres grandes grupos que son: los criófilos o psicrófilos, los mesófilos y los termófilos. Dentro de la clasificación de los psicrófilos existe una subdivisión en la que se encuentran los microorganismos psicrófilo obligados y los facultativos, además de los psicrotrofos.

Los microorganismos psicrófilos son aquellos que pueden crecer a temperatura de refrigeración o a temperaturas inferiores, haciéndose visibles las colonias o la aparición de turbiedad en un tiempo de 7 a 10 días (Banwart, 1989, Jay, 1992)

Brochothrix thermosphacta está clasificado como un microorganismo psicrófilo ya que puede crecer abundantemente a una temperatura de refrigeración y aun a temperaturas inferiores. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra en los 22 °C, siendo incapaz de sobrevivir a 37 °C, esto, debido a que se presenta la inactivación de algunas enzimas respiratorias y la desnaturalización de proteínas de la membrana celular (Edwards y Rettger, 1937, Jay, 1992, Noskova, 1972)

El hecho de que *Brochothrix thermosphacta* sea un microorganismo psicrófilo, explica su incapacidad para tolerar temperaturas por encima de los 30 °C es decir 37 ° y 63 °C, de hecho los microorganismos psicrófilos se caracterizan por morir cuando son sometidos a temperaturas de unos cuantos grados por encima de su temperatura óptima de crecimiento (Jay, 1992), aunque cabe señalar que existen algunas cepas de *Brochothrix thermosphacta* que pueden llegar a resistir una temperatura de 63 °C durante 5 minutos, mientras que ninguna puede tolerar la misma temperatura por 15 minutos (Noskova, 1972)

Para poder conocer las temperaturas cardinales de las cepas seleccionadas, estas fueron sometidas a diferentes tratamientos térmicos (Tabla 5), con el propósito de estimar el

perfil térmico de cada cepa y compararlo con el reportado en la literatura para *Brochothrix thermosphacta*.

Tabla 4. Condiciones de incubación para determinar la temperatura de crecimiento (Feresu y Jones, 1988).

Temperatura de incubación	Tiempo de incubación (días)
4 °C	21
20 °C	14
22 °C	7
37 °C	7
63 °C	15 min

En la tabla 5 se encuentran enlistadas las condiciones de incubación (temperatura y tiempo) manejadas por Feresu y Jones para determinar el perfil térmico de 15 cepas de *Brochothrix thermosphacta*.

Con respecto a las cepas aisladas de las diferentes muestras de pierna de cerdo, para la realización del presente estudio, cabe mencionar que éstas crecieron en un periodo de tiempo menor al reportado por los investigadores antes citados, por ejemplo, la temperatura en la que se observó crecimiento en menos tiempo, fue a los 22 °C ya que a partir de las 18 horas se podía percibir turbidez en los tubos inoculados. En general el crecimiento para cada una de las nueve cepas fue similar aunque en el caso de la cepa 30 M-2 este fue menor

En los tubos incubados a 20 °C, el crecimiento se hizo evidente después de las 24 a las 26 horas posteriores a la inoculación, aunque cabe señalar que en el caso de las cepas 27 M-2 y 40 M-2 el crecimiento fue menor que el observado para el resto de las cepas en estudio.

Para los tubos inoculados que fueron sometidos a refrigeración, el crecimiento se hizo evidente a partir del tercer día y no fue sino hasta el quinto día que se tenía un crecimiento celular abundante, mismo que se pudo apreciar en el fondo de cada uno de los tubos.

El abundante crecimiento de cada una de las cepas aisladas, puede ser explicado en base al efecto que tiene la temperatura sobre el incremento en la solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo, ya que al disolverse en mayor cantidad, los microorganismos pueden disponer más fácilmente del mismo (Jay, 1992).

En el caso específico de *Brochothrix thermosphacta*, se sabe que cuando el microorganismo se encuentra en un medio rico en oxígeno, su tiempo de generación se reduce considerablemente (Gill y Newton, 1978).

Después de los siete días de incubación en los tubos sometidos a una temperatura de 37 °C no se observó crecimiento alguno, excepto para las cepas 4 M-1, 27 M-2 y 23 M-3 para las cuales se alcanzó a percibir un ligero enturbiamiento.

Tabla 6. Resultados de las pruebas bioquímicas específicas para *Brachothrix thermosphacta*.

Muestra		1	1	1	1	2	2	2	3	3
Cepa	Ref°	8	24	66	73	27	30	40	6	23
Crec con KCN										
2.5 % (w/v)	+++	+++	+++	++	--	+++	--	++	+++	+++
3.75 % (w/v)	++	++	++	+	-	++	+	+	++	++
5.0 % (w/v)	+	+	+	—	—	+	+	—	+	+
Crec con azida de sodio										
0.01 % (w/v)	+++	++	+++	++	--	+++	++	+++	+++	++
0.02 % (w/v)	++	++	++	+	+	+++	+	++	++	+
0.05 % (w/v)	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+
Bencidina acida	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
Crec en MRS	—	—	—	—	—	++	—	—	—	—
Crec en anaerobiosis	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Termoresistencia										
63 °C /15 min	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
pH óptimo crec	7.2	8.0	8.0	8.0	7.2	7.2	8.0	8.0	7.2	7.2
Crec pH = 5 + NO ₂	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
β-hemolisis en										
Agar -Sangre	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabla 6 Resultados de las pruebas bioquímicas específicas para *Brochothrix thermosphacta* (continuación)

Muestra		1	1	1	2	2	2	3	3	
Cepa	Ref. ^a	8	24	60	73	27	30	40	6	23

Producción de ácido a partir de										
*Almidón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*Arabinosa	+	++	++	++	++	+	++	+	++	++
*Galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
*Inositol	+	++	++	++	++	++	++	+	-	++
*Lactosa	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
*Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
*Melibiosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
*Rafinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	++	-
*Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
*Xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Antibiograma										
*Ampicilina (25µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
*Cefaloridina (25µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
*Cloramfenicol (50µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
*Eritromicina (10µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
*Estreptomycinina(25µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
*Gentamicina (10µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
*Kanamicina (30µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
*Penicilina G (5 u i)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Ref.^a = Referencia bibliográfica (Manual Bergey s. 1986)

+++ = máximo crecimiento, ++ = crecimiento abundante, + = buen crecimiento,

-- = muy poco crecimiento, — = sin crecimiento, S = sensible, R = resistente

Para el caso de los tubos inoculados que se incubaron a 63 °C durante 15 minutos, mismos que posteriormente se sometieron a incubación a 22 °C durante 24 horas, no hubo crecimiento para ninguna de las nueve cepas seleccionadas

EFECTO INHIBITORIO DEL pH + NO₂

El nitrato y nitrito de sodio son empleados en las fórmulas para el curado de carnes ya que estabilizan el color de la carne, inhiben el crecimiento de algunos microorganismos causantes de alteraciones y de intoxicaciones alimentarias y contribuyen a mejorar el sabor (Jay, 1992) De los dos iones, el nitrito es el que tiene mayor importancia desde el punto de vista microbiológico ya que el nitrito es muy reactivo

La transformación del nitrato en nitrito, es un proceso redox el cual es llevado a cabo por las bacterias que poseen el enzima nitrato reductasa

Brochothrix thermosphacta, es un microorganismo sensible a la presencia de nitrito en el medio y no es capaz de realizar la transformación del nitrato en nitrito, esto debido a un mecanismo de autodefensa ya que de hacerlo inhibiría su propio crecimiento (Jay, 1992)

En los productos carnicos, que contienen altas concentraciones de nitrito, el desarrollo de *Brochothrix thermosphacta* se ve limitado, mientras que cuando la concentración es baja su metabolismo no se afecta (Jay, 1992)

El máximo grado de inhibición del crecimiento de *Brochothrix thermosphacta*, se logra cuando además de una elevada concentración de la sal, el pH del medio es ácido y el microorganismo se incuba a baja temperatura. Cuando se tiene un medio ácido adicionado de nitritos, este compuesto se ioniza dando como producto ácido nitroso, el cual inhibe el crecimiento de un gran número de bacterias, entre ellas *Brochothrix thermosphacta* (Gary y Pearson, 1984, Manual Bergey's, 1986).

El pH es uno de los factores externos que mayor importancia tienen sobre el control del crecimiento microbiano, por ello es fundamental conocer el pH óptimo de crecimiento, así como el pH mínimo inhibitorio de cualquier microorganismo.

A las cepas seleccionadas se les determinaron estos parámetros para poder compararlos con los reportados en la literatura para *Brochothrix thermosphacta*.

Para conocer el intervalo de valores de pH a los cuales las cepas crecen, se trazó una curva de crecimiento (Fig. 1), empleando para ello un medio líquido (BHI), al cual se le hicieron ajustes en el intervalo de pH de 3 a 9.

Una vez determinado el pH óptimo y el pH inhibitorio del crecimiento, se procedió a combinar dicho factor con la adición de nitrito de sodio (0.1%) para poder conocer cuál de los dos elementos incide en mayor grado sobre el crecimiento de cada una de las cepas (Fig. 2) para lo cual se mantuvieron las condiciones que se enlistan en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones para determinar el grado de inhibición debido a la combinación de pH y presencia de nitrato de sodio

pH	NO ₃ ⁻ (0.1%)
a) 7.0	no adicionado
b) 7.0	adicionado
c) 5.0	no adicionado
d) 5.0	adicionado

Para la segunda parte de esta prueba, inhibición en presencia de nitrato de sodio, se decidió manejar las mismas condiciones para todas las cepas, por lo que el pH del medio se ajustó a un valor de 7.2, esto a pesar de que algunas cepas tenían un pH óptimo de crecimiento en 8.0.

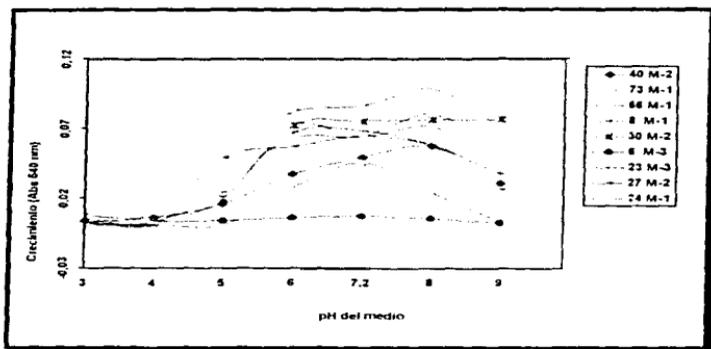
El ajuste a 7.2 se hizo para poder comparar el efecto que tiene el pH y la adición de nitrato de sodio al medio de cultivo, sobre el crecimiento de cada una de las cepas seleccionadas.

El pH óptimo de crecimiento reportado para *Brochothrix thermosphacta* es de 7.2. De las nueve cepas aisladas, solamente 73 M-1, 27 M-2, 6 M-3 y 23 M-3 coinciden con lo reportado en la literatura al tener su pH óptimo en 7.2, mientras que las cepas 8 M-1, 24 M-1, 66 M-1, 30 M-2 y 40 M-2 crecen mejor a un pH de 8.0 (Gráfica 1).

Con base en los resultados obtenidos en la primera parte de esta prueba, se procedió a combinar los dos factores inhibidores del crecimiento descritos en la literatura para *Brochothrix thermosphacta*.

Al manejar diferentes condiciones de pH y presencia o ausencia de nitrito de sodio, el comportamiento de las nueve cepas fue similar entre ellas y coincide con el reportado en la literatura para *Brochothrix thermosphacta*, por ejemplo, el máximo crecimiento se obtuvo cuando el medio de cultivo tenía un pH de 7.2, mientras que con el mismo pH y la adición de 1% de NaNO_2 al medio, se presentó un crecimiento ligeramente menor. Por otro lado, la máxima inhibición del crecimiento se alcanzó al manejar un pH de 5 y 1% de NaNO_2 .

Gráfica 1 Determinación del pH óptimo para el crecimiento de cada una de las cepas seleccionadas



Cabe mencionar que bajo estas condiciones (pH=5 y NaNO_2), en general el crecimiento de las cepas fue tan solo de un 10 % aproximadamente, comparado con el obtenido a pH de 7.2 y NaNO_2 , aunque en el caso de la cepa 24 M-1, no hubo diferencia de crecimiento al tener un medio con un pH de 5 y otro adicionado además con NaNO_2 .

En la grafica 2, se puede apreciar que las cepas aisladas presentan un alto grado de inhibición cuando se tienen valores de pH ácido, además de nitrito de sodio, lo que se manifiesta con un crecimiento muy pobre de cada una de las cepas.

Cuando se tienen condiciones que favorecen el crecimiento del microorganismo (pH 7), el efecto inhibitorio de ciertos agentes (nitrito de sodio), se ve reducido de tal manera que el crecimiento microbiano no es afectado en gran medida, pero conforme las condiciones se vuelven más adversas (pH ácido), la presencia de un segundo factor impacta en mayor grado al microorganismo dando como resultado la incapacidad para multiplicarse (Gráfica 2)

CRECIMIENTO EN MEDIO MRS

En 1953, McLean y Sulzbacher notaron un cierto parecido entre *Brochothrix thermosphacta* y los *Lactobacillus*, razón por la cual el género *Atrobacterium* fue ubicado en la familia *Lactobacteriaceae*, diferenciándose del género *Lactobacillus* principalmente

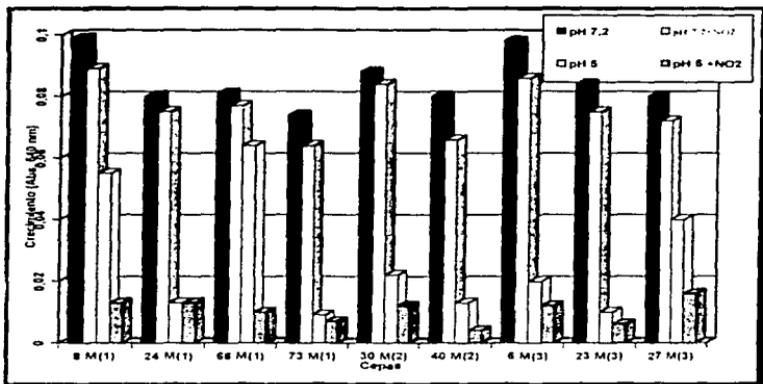
por ser catalasa positivo además de su incapacidad para crecer en el medio MRS (Bred, Murray y Hitchens, 1948)

De Man, Rogosa y Sharp en 1960, desarrollaron un medio de cultivo selectivo (MRS) para el aislamiento de bacterias lácticas. Entre los compuestos que hacen selectivo al medio se encuentra el acetato de sodio, sustancia que inhibe el crecimiento de especies tales como *Brochothrix thermosphacta*. Cabe mencionar que en la formulación del medio STAA, desarrollado por Gardner y col. en 1966, se encuentra el acetato de talio. Una de las razones por la cual *Brochothrix thermosphacta* no es capaz de crecer en el medio MRS, es la cantidad de acetato presente en el medio MRS, la cual es 99 veces mayor que la que tiene el medio STAA.

En la 9ª edición del Manual Bergey's se menciona que *Brochothrix thermosphacta* ocasionalmente puede llegar a crecer en el medio de cultivo MRS, aunque dicho crecimiento es mínimo, por tal razón se empleó este medio de cultivo para determinar si las cepas seleccionadas eran capaces de crecer en él, o si su crecimiento era inhibido por la elevada concentración de acetato de sodio que se incluye en su formulación.

Al ser inoculadas las cepas aisladas en el medio MRS, en general no se detectó desarrollo bacteriano a excepción de las cepas 27 M-2 y 23 M-3, mismas que presentaron un ligero enturbiamiento del medio de cultivo.

Grafica 2. Efecto inhibitorio del pH combinado con el nitrito de sodio sobre el crecimiento de las cepas seleccionadas



CRECIMIENTO EN EL MEDIO AGAR SANGRE

La lisis de los eritrocitos presentes en la sangre, puede ser ocasionada por la actividad enzimática de las hemolisinas, enzimas que son sintetizadas por algunos microorganismos. Existen tres diferentes tipos de hemolisinas, las alfa, las beta y las gamma

La hemólisis α es considerada como un tipo de hemólisis incompleta, ya que los glóbulos rojos que rodean al microorganismo son parcialmente dañados pero no lisados como es el caso de las reacciones β -hemolíticas, en las cuales se puede observar la decoloración total del medio

Brochothrix thermosphacta no es capaz de producir hemolisinas de ninguno de los tres diferentes tipos, pero el crecimiento de algunas cepas sospechosas de ser *Brochothrix thermosphacta* contribuye a su identificación. Por ello se decidió inocular varias placas del medio agar sangre con cada una de las cepas seleccionadas.

De las nueve cepas en estudio, ninguna presentó alguno de los tres tipos diferentes de hemólisis. El crecimiento de cada una de las cepas en el medio agar sangre, se aprovechó para observar los cambios en la morfología celular. Uno de los aspectos importantes que es necesario resaltar es que en las placas de agar sangre, las estructuras filamentosas presentes en los cultivos jóvenes son más alargadas que las que se obtienen cuando el microorganismo se cultiva en un medio como el STAA.

DIFERENCIAS ENTRE *Brochothrix thermosphacta*

y *Listeria monocytogenes*

Debido a un cierto parecido existente entre *Brochothrix thermosphacta* y *Listeria monocytogenes*, Feresu y Jones en 1988 llevaron a cabo un estudio taxonomico para determinar las diferencias existentes entre dichas especies. Fue precisamente en base a este estudio que se hizo la seleccion de las pruebas bioquimicas selectivas, esto con el proposito de identificar las cepas aisladas y poder tener mas elementos para afirmar que se trata de cepas de *Brochothrix thermosphacta*.

Por ejemplo, entre las diferencias mas importantes que distinguen a *Brochothrix thermosphacta* de *Listeria monocytogenes*, se encuentra, el pleomorfismo celular, la inmovilidad, la capacidad para crecer a 4 °C, pero no a 37 °C ni a 63 °C, la produccion de acido a partir de ciertos carbohidratos y la resistencia al sulfato de estreptomocina.

Utilizando como referencia el estudio taxonomico desarrollado en 1988 por Feresu y Jones, y tomando en cuenta la proporcion de cepas de *Brochothrix thermosphacta* y de *Listeria monocytogenes* que producen acido a partir de diferentes carbohidratos, se hizo la seleccion de 10 compuestos hidrocarbonados para determinar si las cepas aisladas eran capaces de producir acido a partir de dichos compuestos y compararlos con lo reportado en la literatura para *Brochothrix thermosphacta* y asi poder confirmar la identidad de las nueve cepas seleccionadas.

En la tabla 8 se encuentran enlistados los carbohidratos a partir de los cuales, *Brochothrix thermosphacta* y *Listeria monocytogenes* producen ácido. La selección de estos carbohidratos se hizo en base a la mayor proporción de cepas de *Brochothrix thermosphacta* que acidifican el medio al metabolizar dichos compuestos, comparado con un menor número de cepas de *Listeria monocytogenes* que pueden asimilar tales compuestos con la consiguiente disminución del pH, esto con base en el estudio realizado por Feresu y Jones, 1988.

Tabla 8. Número de cepas de *Brochothrix thermosphacta* y *Listeria monocytogenes* productoras de acidez a partir de diferentes fuentes de carbono (Feresu y Jones, 1988)

Carbohidrato	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
* Inositol	100	0
* Arabinosa	60	1
* Melibiosa	73	0
* Sacarosa	100	2
* Rafinosa	93	2
* Manitol	100	3
* Almidón	37	4
* Galactosa	100	11
* Xilosa	93	15
* Lactosa	100	86

En general se puede decir que la mayoría de las cepas produjeron ácido a partir de cada uno de los diez carbohidratos seleccionados, aunque hay que mencionar que hubo algunas cepas que con ciertos compuestos hidrocarbonados, no lograron modificar el pH del medio, tal es el caso de las cepas 23 M-3 y 6 M-3 con la xilosa, la 27 M-2 con la melibiosa y la 40 M-2 con la lactosa

Por otro lado también hubo algunas cepas como la 66 M-1 y la 6 M-3 que produjeron una cantidad importante de ácido a partir de la rafinosa, de tal manera que el viré del indicador fue más intenso que el del resto de las cepas para el mismo carbohidrato

El hecho de que algunas de estas nueve cepas no hayan producido ácido de alguno de estos carbohidratos no significa que puedan ser descartadas ya que en todo estudio de identificación bacteriana siempre existe una proporción de cepas que no dan el resultado esperado.

ANTIBIOGRAMA

Finalmente, para concluir este estudio de identificación bacteriana, se realizó un antibiograma para determinar la sensibilidad o resistencia de cada una de las cepas a distintos antibióticos (tabla 5). La selección de cada uno de los antibióticos así como la concentración, fueron tomados del estudio de Feresu y Jones, 1988

En general *Brochothrix thermosphacta* es sensible a todos los antibióticos enlistados, (Tabla 6) excepto al Sulfato de estreptomycin, el cual se incluyó dentro del antibiograma para corroborar que ninguna de las cepas fuera sensible a dicho compuesto, confirmando de esta manera la identidad de las cepas como *Brochothrix thermosphacta*.

La sensibilidad que presentaron las nueve cepas a los siete antibióticos probados, corresponde totalmente al perfil que caracteriza a *Brochothrix thermosphacta*.

Con respecto al diámetro del halo de inhibición para cada uno de los antibióticos a los cuales fueron sometidas las cepas seleccionadas, fluctuó entre los 2.0 y 2.8 cm.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

• *Brochothrix thermosphacta* se encuentra presente en la pierna fresca de cerdo, en un bajo porcentaje, lo que coincide con lo reportado en la literatura

• El pleomorfismo es una de las características que contribuye de manera importante para la identificación preliminar de *Brochothrix thermosphacta*

• El olor a productos lácteos es característico de los cultivos de *Brochothrix thermosphacta*

• El empleo del medio selectivo STAA bajo condiciones de anaerobiosis e incubado a una temperatura de 22 °C, es adecuado para el aislamiento de *Brochothrix thermosphacta*

• La reducción en los recuentos de *Brochothrix thermosphacta* se pueden lograr controlando los factores que inhiben su crecimiento

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

Para la expedita identificación de *Brochothrix thermosphacta*, es recomendable implantar técnicas rápidas como son:

- *Detección de ácidos grasos en membrana citoplásmica.
- *Identificación de citocromos en cadena respiratoria
- *Determinación del porcentaje de guanina-citocina en el material genético (% G+C).

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Atlas M. Ronald. 1993. Handbook of microbiological media. Boca Raton: CRC Press, Inc. P. 486, 621.
- 2.- Ayres C., Mundt y William E. Sandine. 1980. Microbiology of foods. W. H. Freeman and Company. Sn Fco. P. 407-417.
- 3.- Banwart, George J. 1989. Basic food microbiology. 2 Ed. Van Nostrand Reinhold. New York. P. 230-245, 254-263.
- 4.- Barlow, J. and A. G. Kitchell. 1965. " A note on the spoilage of prepacked lamb chops by *Microbacterium termosphaetum* ". Journal of Applied Bacteriology. 29 (1). 185-188.
- 5.- Barnes, Ella...et al. 1979 Spoilage organisms of refrigerated poultry meat. Compiler, Russell and Fuller. In: Cold Tolerant Microbes in Spoilage and the Environment. Academic Press. London. P.101-116.
- 6.- Bradshaw, Jack. 1976. Microbiología de laboratorio. El manual moderno, México. P. 46-51.
- 7.- Brown M. H. ... et al. 1982 Meat microbiology. N. Y. Applied Science Publishers L.T.D. P. 1-103, 225-264, 423-461.

- 8.- Budavari, Susan. 1989. The merck index an encyclopedia of chemical drugs and biologicals. 11 Ed. N.J: Merck & Co., Inc. P. 3034, 1080.
- 9.- Carballo, B. y G. López de la Torre. 1991. Manual de bioquímica y tecnología de la carne. Vicente Ediciones. Madrid, España. P. 52-55, 84-105.
- 10.- Morrison, Rogosa and R. M. Keddle. 1974 The genus *Microbacterium*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 8* Ed. Williams and Wilkins. Baltimore 1974, P. 628, 629.
- 11.- Keddle and M. Rogosa. 1974. The genus *Kurthia*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 8* Ed. Williams and Wilkins. Baltimore. P. 631, 632.
- 12.- Collins, D.M., Ronald M. Keddle. 1986 The genus *Brochotrix* In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9 Ed. Baltimore: Williams and Wilkins. P. 1249-1253, 1320- 1322.
- 13.- Collins-Thompson, D.L. et al. 1972 "Taxonomic considerations of *Microbacterium lacticum*, *Microbacterium flavum* and *Microbacterium termosphaetum*". *International Journal of Systematic Bacteriology*. 22 (2), 65-72.
- 14.- Davidson, C. M. and E. F. Hartree. 1968. "Cytochrome as a guide to classifying bacteria: Taxonomy of *Microbacterium termosphaetum*." *Nature* 220. P. 502-504.

- 15.- Davidson, Mobbs and J. .M. Stubbs. 1968. "Some morfological and physiological properties of *Microbacterium termosphaetum*." Journal of Applied Bacteriology, 31, P.551-559.
- 16.- Davis, G. H. G...et. al. 1969. " Numerical taxonomy of *Listeria*, *Streptococci* and possibly related bacteria." Journal of General Microbiology, 57 P. 333-348.
- 17.- Deibel, R.H. and James B. Evans. 1960. " Modified benzidine test for the detection of citochrome containing respiratory systems in microorganisms." Journal of Bacteriology, 79, P.356-360.
- 18.- Demain, A. L and D. Hendlin. 1959. " Iron transport compounds as growth stimulators for *Microbacterium sp.*" Journal of General Microbiology, 21, P.72-79.
- 19.- De Man, Rogosa and Sharp. 1960 "The medium for the cultivation of *Lactobacilli*." Journal of Applied Bacteriology, 23, P. 130-135.
- 20.- Doetsch, Raymond and Michael J. Pelezar. 1948. " The Microbacteria. morphological and physiological characteristics." Journal of Bacteriology, 56, P. 37-49.
- 21.- Feresu, Sara and Dorothy Jones. 1988 "Taxonomic studies on *Brochotrix*, *Erysipelotrix*, *Listeria* and Atypical Lactobacilli." Journal of General Microbiology, 134, P. 1165-1183.

- 22.- Forrest, John and E. Aberle. 1975. Fundamentos de ciencia de la carne.
Acribia. Zaragoza, España. P. 223-227.
- 23.- Forrest, John and Elton Aberle. 1979. Fundamentos de ciencia de la carne.
Acribia. Zaragoza, España. P. 189-212.
- 24.- Frazier, W., and D. C. Westhoff. 1985. Microbiología de los alimentos.
3 Ed. Acribia. Zaragoza, España. P. 89-103, 213-238, 289- 296.
- 25.- Frazier, W., and D. C. Westhoff. 1993. Microbiología de los alimentos
3 Ed. Acribia. Zaragoza, España. P. 289-323.
- 26.- Gardner, G. A. 1966. "A selective medium for the enumeration of
Microbacterium thermosphactum in meat and meat products."
Journal of Applied Bacteriology. 29 (3), P.455-460.
- 27.- Gardner, Carson and J. Patton. 1967. "Bacteriology of prepacked pork with
reference to the gas composition within the pack." Journal of Applied
Bacteriology. 30 (2), P. 321-333.
- 28.- Gardner, G. A. and A. W. Carson. 1967. "Relationship between carbon dioxide
production and growth of pure strains of bacteria on porcine muscle."
Journal of Applied Bacteriology. 30 (3), P. 500-510.

- 29.- Gill, C. O. and K.G. Newton. 1978. "Microbial ecology": In proceedings in life sciences. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. N.Y. P. 443-447.
- 30.- Guerrero, Isabel y Paulina Lara. 1995. "Efectos químicos y microbiológicos de la aplicación de atmósferas modificadas en la conservación de la carne fresca." Síntesis de Investigación. Ciencia, 46, 350-369.
- 31.- Hanson, Zinsser, Stanhope Bayne-Jones. 1972. Zinsser microbiology. 15 Ed. Appleton-Century-Crofts. N.Y. P.48-62.
- 32.- I.C.M.S.F. 1974. Microorganismos de los alimentos. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: principios y aplicaciones específicas. V.2. Acribia. Zaragoza, España. P. 1-30, 138-142.
- 33.- I.C.M.S.F. 1980. Ecología microbiana de los alimentos. V 2. Acribia. Zaragoza, España. P. 333-407.
- 34.- I.C.M.S.F. 1985. Ecología microbiana de los alimentos. V 2. Acribia. Zaragoza, España. P. 330-341.
- 35.- Jay M., James. 1992. Modern food microbiology. 3 Ed. Van Nostrand Reinhold. New York P. 45-63, 235-247, 307-310 y 373-393.
- 36.- Jürgen Sinell, Hans. 1987. Tecnología e higiene de la carne. Acribia. Zaragoza, España. P. 170-191.

- 37.- Kenner, J. 1968. "Benzidine rearrangement." Nature. 219. 153.
- 38.- Koneman, Elmer...et.al. 1989. Diagnóstico microbiológico. México: Editorial Médica Panamericana. P. 9-235.
- 39.- Lehninger, L., Albertus. 1981. Bioquímica. 2Ed. Barcelona: Ediciones Omega, P. 427-518.
- 40.- Lenga E. Robert. 1988. The Sigma-Aldrich library of chemical safety data. 2 Ed. Sigma-Aldrich Corporation. Milwaukee P. 356.
- 41.- Marshall Sittig. 1991. Handbook of toxic and hazardous chemical and carcinogens. 2 De. Noyes Publications. New Jersey P. 1545-1547.
- 42.- Mc. Faddin, Jean. 1991. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Medica Panamericana. México: 301 p.
- 43.- Mc. Lean, Ruth and William, Sulzbacher. 1953. "*Microbacterium termosphauctum*. Spec. Nov; a nonheat resistant bacterium from fresh pork sausage." Journal of Bacteriology: 63, P. 428-433.
- 44.- Mc Meekin, T. A. 1975. "Spoilage association of chicken breast muscle." Applied Microbiology. 29 (1), P. 44-47.
- 45.- Morrison, Robert y Robert N. Boyd. 1987. Química Orgánica. 5 Ed. Allyn and Bacon Inc. Massachusets. P. 951-964.

- 46.- Mortimer, D. Starr...et. al. 1981. The Prokaryotes; A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. N.Y P. 1812-1878.
- 47.- Nickerson, John y Anthony Sinskey. 1978. Microbiología de los alimentos y sus procesos de elaboración. Acribia. Zaragoza, España. P. 131, 132.
- 48.- Noskova, G. L. 1972. Microbiología de las carnes conservadas por el frío. Editorial para la Industria de los Alimentos. Moscú: 111 p.
- 49 - Parrilla, Saldate y Mireya, Nicolí. 1989. "Manual de técnicas para análisis microbiológico de productos cárnicos." Secretaría de Salud. México. 32p.
- 50.- Ponce Alquicira, Edith. 1989. Efecto de la actividad acuosa en la preservación de carne fresca de cerdo. Tesis. Facultad de Química. UNAM. México.
- 51.- Price, F. and Bernard Schweigert. 1987. The science of meat and meat products. Connecticut. Food Nutrition Press Inc. P. 228-231
- 52.- Ramírez-Gamra y col. 1992. Manual de prácticas de microbiología general. Facultad de Química. UNAM. México. 294 p.
- 53.- Shaw, N. and D Stead. 1970. "A study of the lipid composition of *Microbacterium termosphactum* as a guide to its taxonomy." Journal of Applied Bacteriology. 33, P. 470-473.

- 54.- Prandl, Oskar. et. al. 1994. Tecnología e higiene de la carne. Acribia. Zaragoza, España. P. 170-191.
- 55.- Sánchez Marroquín Alfredo. 1961. Principios de microbiología industrial. Editorial Química. México. P. 74-83.
- 56.- Singleton, Paul and Diana Sainsbury. 1994. Dictionary of microbiology and molecular biology. 2. Ed. A Wiley - Interscience Publication. N.Y P. 527, 528, 534.
- 57.- Sneath P. and Dorothy Jones. 1976. "*Brochotrix*, a new genus tentatively placed in the family *Lactobacillaceae*." International Journal of Systematic Bacteriology. 26 (2), P. 102-104.
- 58.- Stanier, Doudoroff y Edward Adelberg. 1981. Microbiología. Aguilar. Madrid, España. P. 196- 210.

CAPÍTULO VIII

ANEXO

ANEXO

CRECIMIENTO EN EL MEDIO SELECTIVO STAA

En 1966 Gardner desarrollo un medio selectivo para el aislamiento y enumeración de *Microbacterium thermosphactum*, microorganismo que había sido aislado a partir de salchicha de cerdo, carne fresca picada, carne irradiada, así como carne empacada y productos cárnicos. La selectividad del medio está determinada por el Sulfato de estreptomicina, la Actidiona y el Acetato de Talio, sustancias que inhiben el crecimiento de la mayoría de los microorganismos que se encuentran en la carne como *Lactobacillus*, *Listeria*, *Erysipelotrix*, *Streptococcus* y *Bacillus*. Ocasionalmente puede llegar a crecer *Pseudomonas*, pero esta puede ser descartada con la realización de la prueba de la oxidasa.

La composición del medio en g/L es la siguiente

Peptona	20.0
Extracto de Levadura	2.0
Glicerol	15.0
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄ ·4H ₂ O	1.0
Agar-agar	15.0
pH final del medio	7.2

PREPARACIÓN

El medio se esteriliza a 121 °C (15 lb de presión), durante 15 min.

Una vez estéril, se le adicionan las siguientes soluciones, mismas que deben esterilizarse por filtración con membrana. La concentración final debe de ser la indicada

Sulfato de estreptomycin	500 μ g/mL
Cicloheximida	500 μ g/mL
Acetato de talio	50 μ g/mL

TÉCNICA

Se inocula el medio con las cepas jóvenes y se incuba a 22 °C de 24 a 48 horas.

INTERPRETACION

La mayoría de las colonias que crecen en este medio son de *Brochotrix termosphaeta* pero también pueden crecer algunas cepas de *Pseudomonas*.

Las colonias de *B. termosphaeta* a las 24 horas, son opacas, no pigmentadas, convexas y con un diámetro entre 0.75- 1.0 mm. En cultivos viejos, debido a la edad de la colonia la estructura se modifica dando la apariencia de un huevo frito (Manual Bergey's, 1986).

PRUEBA DE LA OXIDASA

Los citocromos son hemoproteínas que contienen hierro, y transfieren electrones (hidrógeno) al oxígeno, utilizándolo como último aceptor electrónico en la cadena respiratoria aerobia, dando como producto final agua y ocasionalmente peróxido. El sistema citocromo se encuentra en los organismos aerobios o anaerobios facultativos, de modo que la prueba de la oxidasa es muy importante para identificar a aquellos organismos que poseen el sistema citocromo en la cadena respiratoria (Koneman, 1989)

MEDIO DE CULTIVO

Para la realización de esta prueba se emplea el medio para métodos estandar, mismo que tiene la siguiente composición en g/L

Peptona de caseína	5.0
Extracto de levadura	2.5
Dextrosa	1.0
Agar-agar	15.0
pH final	7.2±0.1

PREPARACIÓN

Suspender 23.5 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, mezclar perfectamente durante 10 min. Calentar hasta ebullición durante 1 min y esterilizar a 121 °C (15 lb de presión) durante 15 min.

Después de esterilizado el medio de cultivo, verterlo en cajas petri y dejar que solidifique, sembrar las colonias en estudio e incubar a 25 °C durante 18 h

REACTIVO

Diclorhidrato de *p*-fenilendiamina 8mM

El reactivo se prepara al momento de su empleo y se almacena en un frasco ámbar.

TÉCNICA

Una vez concluido el periodo de incubación, se colocan sobre las colonias de cultivos jóvenes, una rueda de papel Whatman Nº 1 y posteriormente se humedece totalmente con la solución indicadora.

INTERPRETACION

El reactivo de diclorhidrato de *p*-fenilendiamina es incoloro en estado reducido, pero en presencia de citocromo oxidasa y oxígeno atmosférico se oxida dando lugar a la formación de azul de indofenol

Aquellas colonias que al cabo de un minuto toman una coloración azul intenso se consideran oxidasa positivo

Con esta prueba es posible descartar a las colonias de *Pseudomonas* que crecieron en el medio STAA

PRUEBA DE LA CATALASA

El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo o aeróbico de los hidratos de carbono. Si se deja acumular, el peróxido de hidrógeno es letal para las células bacterianas.

La catalasa es la enzima que transforma al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno como lo demuestra la siguiente reacción (Koneman, 1989)



Es recomendable el uso de un medio que tenga un bajo contenido de hierro en su composición, para tal efecto se puede emplear el de levadura (TYG). Si se emplea otro medio y se incuba a una temperatura diferente de 30 °C, el resultado puede ser un falso positivo (Davidson y col., 1959).

MEDIO DE CULTIVO

Para la realización de esta prueba se empleó el medio para métodos estandar, mismo que tiene la siguiente composición en g/l.

Peptona de caseína	5.0
Extracto de levadura	2.5
Dextrosa	1.0
Agar-agar	15.0
pH final	7.2±0.1

PREPARACION

Suspender 23.5 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, mezclar perfectamente durante 10 min, calentar hasta ebullición durante 1 min y esterilizar a 121 °C (15 lb de presión) durante 15 min.

Después de esterilizado el medio de cultivo, se vierte en cajas petri y se deja que solidifique, sembrar las colonias en estudio e incubar a 25 °C durante 18 h.

REACTIVO

Peróxido de hidrogeno al 3 %

TÉCNICA

Para llevar a cabo esta prueba es necesario emplear un cultivo joven (18-24 h)

Con un palillo de madera esterilizado, se toma parte de la colonia sospechosa y se transfiere a un portaobjetos, posteriormente se añaden dos gotas del reactivo

INTERPRETACION

La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia, es indicativa de una reacción positiva

Debido a que algunas bacterias pueden poseer enzimas distintas de la catalasa, capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno, la formación de pocas burbujas a los 30 segundos, no se considera una prueba positiva

PRUEBA DE ROJO DE METILO - VOGES PROSKAWER

La prueba del rojo de metilo, sirve para distinguir a los microorganismos que producen y mantienen una alta concentración de ácidos, de aquellos que producen inicialmente una menor cantidad y que además son capaces de transformar a estos mismos ácidos volviendo el medio neutro o alcalino

La prueba de Voges Proskauer es útil para identificar a aquellos microorganismos que producen acetil-metil-carbinol y lo oxidan a diacetilo, el cual al combinarse con arginina, creatina o creatinina da una coloración rosa (Koneman, 1989)

MEDIO DE CULTIVO

El medio empleado para esta prueba fue el caldo rojo de metilo-Voges Proskauer que tiene la siguiente composición en g/L

Mezcla de peptonas	7.0
Dextrosa	5.0
Fosfato de potasio	5.0
pH final del medio	6.9 ± 0.1

PREPARACIÓN

Disolver 17 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Distribuir y esterilizar a 121 °C a no más de 15 lb de presión durante 15 min.

REACTIVOS

• Indicador rojo de metilo

Rojo de metilo 0.1 g

Etanol 300.0 mL

Llevar a un volumen final de 500 ml con agua destilada.

• Reactivo de Voges-Proskauer

Reactivo A

Hidróxido de potasio 40.0 g

Agua destilada 100.0 mL

Reactivo B

Alfa naftol 5.0 g

Etanol absoluto 100.0 mL

TECNICA

Se inocula el caldo Rojo de metilo-Voges Proskauer, con un cultivo joven del microorganismo en estudio. Se incuba a 22 °C durante 48 a 72 h, una vez finalizado el periodo de incubación se adiciona el reactivo correspondiente.

INTERPRETACIÓN

ROJO DE METILO

El desarrollo de un color rojo estable en la superficie del medio indica que la producción del ácido es suficiente como para bajar el pH a 4.4, esto nos indica una prueba positiva. Dado que otros organismos pueden producir cantidades menores de ácido a partir del sustrato, es posible el desarrollo de un color naranja intermedio entre el amarillo y el rojo, lo cual se considera como prueba positiva.

VOGES PROSKAWER

Una prueba positiva esta indicada por el desarrollo de un color rojo a los 15 minutos de haber añadido los reactivos, revelando la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoina. La prueba no debe leerse después de una hora ya que los cultivos Voges-Proskawer negativos pueden producir un color cobrizo, con la consecuente posibilidad de una interpretación falsa positiva.

REDUCCION DE NITRATOS

La capacidad de un organismo para reducir los nitratos a nitritos, es una característica importante utilizada para la identificación y diferenciación de especies de muchos grupos de microorganismos. Todas las enterobacterias, excepto algunas especies, reducen los nitratos.

La reducción del nitrato en nitrito tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo obtiene su oxígeno del nitrato y otros productos de reducción. La ecuación química es:



La presencia de nitritos en el medio se detecta añadiendo α -naftilamina y ácido sulfanílico, con la formación de un colorante rojo de diazonio, *p*-sulfobenceno-azo- α -naftilamina (Koneman, 1989).

MEDIO DE CULTIVO

Para realizar esta prueba se emplea el caldo nitrato, mismo que presenta la siguiente formulación en g/L.

Extracto de carne	3.0
Peptona	5.0
Nitrato de Potasio	1.0

REACTIVOS

Reactivo A:

α -naftilamina	5.0 g
Ácido acético(5 N),30 ‰	1.0 L

Reactivo B

Ácido sulfanílico	8.0 g
Ácido acético	1.0 L

TÉCNICA

Se inocula el medio de nitrato con un cultivo joven del organismo en estudio y se incuba a 22 ° C durante 18 a 24 horas. Finalizada la incubación se añade al medio 1 mL de reactivo A y luego 1 mL del reactivo B.

INTERPRETACIÓN

El desarrollo de un color rojo a los 30 segundos, indica la presencia de nitritos y representa una reacción positiva para la reducción de nitratos. La ausencia de color puede indicar que los nitratos no han sido reducidos (una verdadera reacción negativa) o que han sido reducidos a productos distintos de los nitritos.

Los reactivos empleados para llevar a cabo el revelado de esta prueba, solamente pueden detectar la presencia de nitritos, es por ello que resulta necesario realizar una segunda prueba para confirmar el resultado, para lo cual se emplea al polvo de cinc. Cuando se adiciona el cinc en polvo a un medio que contiene nitratos, se observa la aparición de una coloración rojo intenso debido a que el metal reduce los nitratos a nitritos y con dicha coloración se confirma la reacción negativa verdadera (Mac Faddin, 1991)

PRODUCCIÓN DE H₂S

La capacidad de ciertas especies bacterianas para liberar azufre de aminoácidos y otros compuestos que lo contienen, en la forma de gas, H₂S, constituye una característica importante para su identificación

La proteólisis de las proteínas da como resultado la liberación de aminoácidos, algunas especies bacterianas heterótrofas son capaces de liberar azufre enzimáticamente de los diferentes aminoácidos, bajo la forma de sulfuro de hidrógeno. Este gas es incoloro pero al reaccionar con algunas sustancias indicadoras como el citrato férrico de amonio, produce un precipitado negro insoluble con lo cual se logra su identificación (Koneman, 1989)

MEDIO DE CULTIVO

Uno de los medios empleados para la realización de esta prueba es el medio **SIM** semi-sólido, el cual tiene la siguiente formulación en g/L.

Peptona de Caseína	20.0
Peptona de Carne	6.1
Sulfato de hierro y amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar-agar	3.5
pH final del medio	7.3±0.2

PREPARACION

Suspender 30 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Calentar a ebullición durante un minuto, distribuir en tubos y esterilizar 121 °C (15 lb presión) durante 15 min.

TÉCNICA

Se inocula el medio semisólido por picadura con un cultivo joven de 18 horas y se incuban los tubos a una temperatura de 22 °C durante 18-24 horas

INTERPRETACION

Una vez concluido el periodo de incubacion, los tubos que presenten ennegrecimiento a lo largo de la linea de inoculacion o en todo el medio, podran ser considerados como positivos. Si por el contrario los tubos no presentan cambio alguno entonces el resultado de esa prueba es negativo.

PRODUCCIÓN DE INDOL

El indol es uno de los productos de degradacion metabolica del aminoacido triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con produccion de indol, acido piruvico y amoniaco.

La produccion de indol es una caracteristica importante para la identificacion de muchas especies de microorganismos. Dicha prueba, esta basada en la formacion de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehido del p-dimetilaminobenzaldehido. Para llevar a cabo esta prueba es necesario emplear un medio rico en triptófano.

MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo empleado para esta prueba es el SIM

(ver medio para la prueba produccion de H₂S)

REACTIVO

Reactivo de Kovac:

Alcohol amílico o isoamílico puro	150.0 mL.
<i>p</i> -dimetilaminobenzaldehído	10.0 g
Ácido clorhídrico concentrado	50.0 mL.

TÉCNICA

Se inocula el medio semisolido por picadura con un cultivo joven (18-24 h), se incuban los tubos inoculados a una temperatura de 22 °C durante 18-24 h. Al finalizar este periodo, se añaden 5 gotas del reactivo de Kovac por la pared interior del tubo.

INTERPRETACION

El desarrollo de un vivo color fucsia en la interfase del reactivo y el medio, segundos después de añadir el reactivo, indica la presencia de indol y por lo tanto una prueba positiva.

Es muy recomendable para la realización de esta prueba contar con un control positivo, para este caso es adecuado un tubo inoculado con *E. coli*.

MOVILIDAD

La movilidad bacteriana es otra característica de gran utilidad para la identificación final de una especie

La movilidad en las bacterias se debe a la presencia de flagelos, cuyo número y ubicación varía en las diferentes especies

Los medios para detectar movilidad contienen concentraciones de agar de 0.4 % o menos. A mayores concentraciones, el gel es demasiado firme como para permitir la libre diseminación de los organismos (Koneman, 1989)

MÉDIO DE CULTIVO

El medio empleado para esta prueba es el SIM
(ver medio para la prueba producción de H₂S)

TECNICA

Se inocula el medio semisolido por picadura, con un cultivo joven de 18-24 h, se incuban los tubos inoculados a una temperatura de 22 °C durante 18-24 h

INTERPRETACIÓN

La prueba de movilidad se interpreta realizando un examen macroscópico del medio para observar una zona de desarrollo difuso que parte de la línea de inoculación. Los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio, provocando turbiedad, si esto es lo que se observa, entonces la prueba es considerada como positiva. Pero si el crecimiento solo se acentúa a través de la línea de siembra y el medio circundante se mantiene claro, entonces la prueba se considera negativa.

PRUEBA DE LA OXIDACIÓN FERMENTACIÓN

Los microorganismos sacarolíticos degradan la glucosa en forma fermentativa u oxidativa. Los subproductos de la fermentación son ácidos mixtos relativamente fuertes, siendo fáciles de detectar. En cambio los ácidos formados por degradación oxidativa de la glucosa son sumamente débiles y para su detección se requiere un medio de oxidof fermentación más sensible, como el de Hugh y Leifson (medio OF).

Una de las características de este medio es una baja proporción de proteína con respecto a los carbohidratos, esto con el propósito de reducir la formación de aminas alcalinas, mismas que pueden neutralizar las pequeñas cantidades de ácidos débiles derivados

del metabolismo oxidativo. La concentración relativamente mayor de hidratos de carbono sirve para aumentar potencialmente la producción de ácido. La consistencia de este medio es semisólida para permitir que los ácidos formados en la superficie difundan por todo el medio, facilitando la visualización del viraje del indicador de pH (Koneman, 1989).

MEDIO DE CULTIVO

El medio empleado fue el OF, el cual tiene la siguiente composición en g/L

Peptona	2.0
Glucosa	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Azul de bromotimol	0.03
Fosfato dipotásico	0.30
Agar-agar	2.5
pH final del medio	7.1

TÉCNICA

Se utilizan dos tubos para la prueba de oxidación-fermentación, por microorganismo. Cada tubo se inocula por picadura con un cultivo joven de 18 horas, hasta llegar casi al fondo del tubo. Uno de los tubos se cubre con una capa de 1.0 cm de parafina, mientras que el otro se deja abierto. Se incuban ambos tubos a 22 °C durante 48 horas.

INTERPRETACION

La producción de ácido se detecta en el medio por la aparición de un color amarillo. En el caso de los organismos con metabolismo oxidativo, la producción de color se puede notar primero cerca de la superficie del medio

Tabla de interpretación de resultados de la prueba de Oxidación-Fermentación (Mac Faddin, 1991).

	Tubo abierto	Tubo sellado	Metabolismo
1 Oxidación	Amarillo (A)	Verde (SC)	Oxidativo
2 Fermentación anaerobia	Amarillo (A)	Amarillo (A)	Fermentativo
3 Fermentación aerobia	Amarillo (AG)	Amarillo (AG)	Fermentativo
4 Ni fermentación ni oxidación	Azul o verde (SC)	Verde (SC)	No sacarolítico
5 Fermentación y oxidación	Azul o verde (SC)	Amarillo (A o AG)	Fermentativo/oxidativo

A= ácido; AG= ácido y gas; SC= sin cambio

Nota: Es recomendable preparar dos tubos control.

- * *E. coli* es fermentador de glucosa.
- * *P. aeruginosa* es oxidador de la glucosa

TEMPERATURA DE CRECIMIENTO

La temperatura es uno de los factores que mas influencia tienen sobre el crecimiento de cualquier microorganismo. Cuando se desea aislar o identificar a una cierta especie, es fundamental conocer el intervalo de temperatura de crecimiento.

Todo microorganismo tiene una temperatura minima, optima y maxima de crecimiento.

Los microorganismos psicrótrofos son aquellos que son capaces de crecer a temperaturas comprendidas entre 0 ° y 7 °C y producir colonias visibles en un tiempo de 7 a 10 días (Jay, 1992). Desde hace varios años, es bien sabido que los microorganismos psicrótrofos generalmente son incapaces de crecer a temperaturas por encima de los 30 ° a los 35 °C.

En base a los estudios realizados por Edward y Rettger en 1937, se ha demostrado que a la temperatura maxima de crecimiento de la mayoría de los microorganismos psicrótrofos, algunos enzimas respiratorios son inactivados, siendo este uno de los factores limitantes que solo les permite crecer a bajas temperaturas.

El deterioro de los alimentos almacenados a bajas temperaturas se debe a la presencia de microorganismos psicrótrofos. *Brochothrix thermosphacta* pertenece a este grupo de organismos y es uno de los responsables de las alteraciones que se presentan en la carne refrigerada.

Brochothrix thermosphacta es un microorganismo termosensible que no es capaz de sobrevivir después de ser sometido a un calentamiento de 63 °C/15 min (Manual Bergey's, 1986, Noskova, 1972)

Para llevar a cabo la determinación de los parámetros térmicos de cada una de las cepas se manejaron las siguientes temperaturas, 4 ° 20 °, 22 ° 37 ° y 63 °C, con diferentes intervalos de tiempo de incubación

MEDIO DE CULTIVO

Para llevar a cabo la determinación del intervalo de temperatura de crecimiento se empleó el medio de cultivo, caldo infusión de cerebro corazón (BHI), el cual tiene la siguiente composición en g/L

Infusión de cerebro de ternera	200.0
Infusión de corazón de res	250.0
Peptona de gelatina	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disódico	2.5
Dextrosa	2.0
pH final del medio	7.4±0.2

PREPARACION

Se disuelven 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Se distribuyen en tubos de ensaye y se esterilizan a 121 °C (15 Lb de presión) durante 15 minutos

TÉCNICA

Temperatura de crecimiento

Con base en la información reportada en la literatura, se seleccionaron tres temperaturas distintas a las cuales *Brochothrix thermosphacta* puede desarrollarse y una más que se ha sido reportada como la temperatura a la cual el microorganismo es incapaz de crecer, debido a la inactivación de ciertos enzimas y a la desnaturalización de algunas proteínas

Para llevar a cabo la determinación de los parámetros termicos de cada una de las cepas se manejaron las siguientes temperaturas: 4 °/21 días; 20 °/14 días; 22 °/7 días y 37 °C/7 días. El inóculo empleado debe de ser de un cultivo joven de 18 horas.

INTERPRETACIÓN

Una vez concluido el periodo de incubación a las distintas temperaturas, los tubos deben de ser examinados para poder determinar a que temperatura se presenta el mayor crecimiento. La turbidez del medio de cultivo es suficiente para considerar crecimiento microbiano

CRECIMIENTO A 63 °C/5 min.

Para llevar a cabo la prueba de termorresistencia se necesita un baño de agua a temperatura constante. Los tubos antes de ser inoculados deben de ser precalentados, de tal manera que su temperatura sea de 63 °C al momento de la inoculación

Una vez hecha esta, se introducen en el baño durante 5 minutos. Posteriormente los tubos se incuban a una temperatura entre 20 y 25 °C, durante 24 a 48 horas

INTERPRETACION

Debido a que *Brochothrix thermosphacta* es un microorganismo termosensible e incapaz de sobrevivir después de ser sometido a incubación a 63 °C durante 15 minutos, los tubos inoculados con cada una de las distintas cepas que presenten desarrollo, deben de ser descartados

Nota: Es recomendable contar con un blanco al momento de hacer la lectura.

LIQUEFACCIÓN DE LA GELATINA

La gelatina es una proteína compleja, derivada del colágeno animal, que inicialmente se utilizó como agente solidificador de los medios de cultivo. La gelatina posee escaso valor nutritivo y en la actualidad se emplea en medios de cultivo casi exclusivamente para detectar la presencia de enzimas proteolíticas.

Las gelatinasas son enzimas proteolíticas capaces de desdoblar la gelatina y otras proteínas a péptidos y aminoácidos. Las bacterias que segregan gelatinasas se pueden detectar por la digestión o licuefacción de la gelatina presente en el medio de cultivo.

En general, las proteínas son compuestos demasiado grandes como para que puedan entrar en una célula bacteriana, por lo tanto para que una célula pueda utilizar las proteínas, primero debe de catabolizarla en componentes más pequeños. Las enzimas extracelulares de tipo proteolítico, gelatinasas, son secretadas por ciertas bacterias para desdoblar a las proteínas y esta capacidad ayuda a la identificación bacteriana (Mac Faddin, 1991)

MEDIO DE CULTIVO

Para la realización de la prueba de la licuefacción de la gelatina se emplea el medio de gelatina nutritiva, el cual tiene la siguiente composición en g/L.

Extracto de carne	3.0
Peptona	5.0
Gelatina	120.0
pH final del medio	7.0±0.2

PREPARACION

Se agrega agua destilada a la cantidad de gelatina indicada y deja reposar durante 20 min. Posteriormente se calienta hasta ebullición para la disolución total de la gelatina. Se adiciona el extracto de carne y la peptona, se vuelve a calentar hasta ebullición para disolver todos los componentes. Se vacía el medio en tubos de ensaye y se esteriliza a 121 °C (15 Lb de presión) durante 15 min.

TÉCNICA

Los tubos deben de conservarse en refrigeración hasta el momento de ser utilizados. Sembrar por punción un inóculo abundante de un cultivo de 18 horas del organismo en estudio atravesando el medio hasta una profundidad de 2 a 2.5 cm. Se debe de emplear un tubo control sin inocular. Incubar los tubos a una temperatura de 25 °C., durante 14 días.

INTERPRETACIÓN

Controlar los tubos diariamente durante dos semanas. Cada 24 horas, colocar ambos tubos (desconocido y control) en el refrigerador durante aproximadamente dos horas. Inclinarlos para ver si hay licuefacción de la gelatina. Comparar ambos tubos.

Los siguientes organismos sirven de control

Positivo *Pseudomonas aeruginosa*

Negativo *Escherichia coli*.

MEDICIÓN CELULAR

La medición celular es una determinación muy útil cuando se realiza una caracterización microbiana. Dicha medición se puede realizar empleando para ello un microscopio óptico además de un ocular micrométrico y un objetivo micrométrico.

El ocular micrométrico posee una escala arbitraria con divisiones lo suficientemente pequeñas como para medir microorganismos de diferentes tamaños.

El objetivo micrométrico es un portaobjetos en el cual se encuentra grabada una escala finamente dividida en centésimas de milímetro es decir, cada división mide 10 μm .

La medición de un microorganismo, se lleva a cabo mediante el empleo de un microscopio.

CALIBRACIÓN DEL MICROSCOPIO

Para realizar la calibración del microscopio se siguen los siguientes pasos:

- 1) - Se sustituye el ocular del microscopio por el ocular micrométrico.
- 2) - Se coloca el objetivo micrométrico en la platina
- 3) - Con el objetivo de 10 X, se enfoca la escala del objetivo micrométrico y se centra en el campo. Se repite la operación con los objetivos de 40 X y 100 X. Esta operación es necesaria para localizar con facilidad la escala ya que si se trata de enfocarla directamente con el objetivo de inmersión puede resultar difícil y tardado
- 4) - Una vez que se tiene la imagen enfocada, se hacen coincidir las primeras líneas de las dos escalas, revisando en cual de las divisiones del lado derecho de las escalas se presenta nuevamente una coincidencia exacta
- 5) - Se cuenta el número de divisiones del ocular y del objetivo que quedan comprendidas entre las divisiones que coinciden
- 6) - Se calcula el tamaño de cada división del ocular micrométrico en μm , considerando que cada división del objetivo micrométrico equivale a 10 μm
- 7) - Esta operación se repite con los objetivos de 40 X y 100 X
- 8) - Se retira el objetivo, se limpia y se guarda

9).- Se coloca la preparación del microorganismo en estudio, en la platina del microscopio y se procede a realizar la medición haciendo girar el ocular micrométrico y moviendo la preparación para acomodar las células dentro de la escala. Se miden varios microorganismos para obtener una longitud y diámetro promedio.

10) - La dimensión del microorganismo se determina en micras aplicando la equivalencia en micras de cada división del ocular.

HEMÓLISIS EN AGAR SANGRE

La principal función de las exoenzimas es la de procurar alimento utilizable para las células. Sin embargo, estas también pueden servir como mecanismo de agresión. Algunas de estas exoenzimas son moléculas proteicas que permiten a la maquinaria enzimática establecerse y hacer posible el crecimiento de cierto tipo de microorganismo en los tejidos humanos. La sangre debido a su composición es un medio muy rico que permite la proliferación de un gran número de bacterias.

Cierto número de bacterias son capaces de producir toxinas que causan la disolución de los eritrocitos, las hemolisinas son un ejemplo de estas enzimas. Existen diferentes tipos de hemolisinas, alfa, beta y gamma.

La hemólisis alfa, es un tipo de hemólisis incompleta, en la cual los glóbulos rojos que rodean a las colonias son parcialmente dañados pero no lisados como en las reacciones beta hemolíticas en las cuales se observa decoloración total del medio

En la hemólisis alfa hay un característico enverdecimiento del medio debido a la liberación de un derivado del tipo de la metahemoglobina, que es oxidado a compuestos del tipo de la biliverdina

Para determinar el aspecto de las colonias individuales y el tipo de hemólisis que produce un microorganismo, se emplea un medio con un bajo contenido de azúcares reductores debido a que éstos reprimen la expresión de la β -hemólisis (Bradshaw, 1976, Koneman, 1989)

MEDIO DE CULTIVO

Para la realización de esta prueba se emplea el medio Base de Agar Sangre adicionado de 5 % de sangre desfibrinada de bovino. El medio deshidratado tiene la siguiente composición en g/L.

Infusión de músculo cardíaco	375.0
Peptona de carne	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar-agar	15.0
pH final del medio	7.2±0.2

PREPARACIÓN

Suspender 40.0 g/L del medio deshidratado. Remojar durante 10 min, hervir por 1 min. y esterilizar a 121 °C (15 Lb de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar el medio esteril a 45 °C y añadir 5 % de sangre destribinada y esteril en condiciones de esterilidad.

Homogeneizar el medio haciendo girar suavemente el matraz para evitar la incorporación de burbujas al medio. Distribuir en cajas petri esteriles.

TÉCNICA

Se inocula cada caja con un cultivo joven (18 h) empleando un asa para su distribución y se incuban las placas a una temperatura de 22 °C durante un periodo de 24- 48 h.

Se inoculan e incuban por separado un control para la alfa y otro para la beta hemólisis. *S.pneumoniae* es alfa hemolitico y *S.aureus* es beta hemolitico.

INTERPRETACION

Una vez concluido el periodo de incubacion comparar con los controles y determinar el tipo de hemólisis que el microorganismo en estudio presenta.

En las reacciones beta hemoliticas se observa la decoloración total del medio y en la hemólisis alfa, hay un caracteristico enverdecimiento del medio.

CRECIMIENTO EN MEDIO MRS

El medio MRS, fue desarrollado por De Man, Rogosa y Sharp, para el cultivo de bacterias lácticas. Este tipo de bacterias son muy exigentes para su crecimiento es por eso que para poder desarrollarse se requiere de un medio complejo.

Uno de los ingredientes que constituyen a este medio, es el acetato de sodio, mismo que inhibe el crecimiento de algunas especies como es el caso de *Brochothrix thermosphacta*, por ello este medio se emplea para caracterizar a dicho microorganismo (Atlas, 1993).

MEDIO DE CULTIVO

La formulación del caldo MRS expresada en g/L es la siguiente:

Glucosa	18.5
Digerido pancreático de gelatina	10.0
Extracto de carne	8.0
Acetato de sodio	3.0
Fosfato ácido de potasio	2.0
Citrato de amonio	2.0

Polisorbato 80	1.0
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.2
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	0.05
pH final del medio	6.2±0.2

PREPARACION

Pesar 50.0 g/L. Disolver el medio en polvo previamente empleando una pequeña porción de agua destilada y posteriormente aforar a 1 litro. Disolver perfectamente y distribuir en tubos de ensayo, esterilizar a 121 °C (15 Lb de presión) durante 15 minutos.

TECNICA

Cada uno de los tubos se inocula con un cultivo joven del microorganismo en estudio y se incuban a 25 °C durante 48-72 h

Es recomendable el cultivo de una cepa de referencia de alguna bacteria láctica

INTERPRETACION

Una vez concluido el periodo de incubación, observar los tubos para determinar si hubo crecimiento o no, y compararlos con el tubo de referencia *Brochothrix thermosphacta* no crece en este medio o si lo llega a hacer el crecimiento es muy pobre

DETECCIÓN DE CITOCROMOS

Los citocromos son componentes ferroportínicos de la cadena de transporte de electrones, y se encuentra solamente en la celulas aeróbicas (Lehninger, 1981)

Se han identificado cuatro clases de citocromos bacterianos sobre la base de sus espectros de absorcion caractersticos. Las condiciones de cultivo de una bacteria, afectan las cantidades total y relativa de los componentes citocromo en el microorganismo, estas modificaciones reflejan el intento del microorganismo para compensar la deficiencia de oxigeno que pudiera tener mediante el incremento de la sintesis de mayores concentraciones de oxidasas alternativas que tengan mayor afinidad por el oxigeno (Zinsser, 1994)

En base al uso de ciertas sustancias, es posible identificar algunos citocromos presentes en la cadena respiratoria.

MEDIO DE CULTIVO

El medio empleado para detectar la presencia de citocromos en la cadena respiratoria de las cepas seleccionadas fue el caldo infusión de cerebro corazón (BHI), al cual se le adiciona el cianuro de potasio y/o azida de sodio esterilizados por filtro de membrana.

La composicion del caldo BHI en g/L. es la siguiente

Infusion de cerebro de ternera	200.0
Infusion de corazon de res	250.0
Peptona de gelatina	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disodico	2.5
Dextrosa	2.0
pH final del medio	7.4±0.2

Las concentraciones utilizadas de cada una de las sales fueron las siguientes:

Azida de sodio	0.01 %
	0.02 %
	0.05 %
Cianuro de Potasio	2.5 %
	3.75 %
	5.0 %

PREPARACION

Se disuelven 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada y se distribuyen en diferentes matracas Erlenmeyer, se esterilizan a 121 °C (15 Lb de presión)

durante 15 min. A cada matraz de le adiciona la solución esteril de cada una de las sales a distinta concentración

TECNICA

Para cada cepa se probaron tres diferentes concentraciones de azida de sodio y tres para el cianuro de potasio. Se inocula cada uno de los tubos con un cultivo joven de cada cepa, y se incuban a 22 °C durante 24 a 48 horas.

INTERPRETACION

Cuando en el medio de cultivo inoculado e incubado, se observa enturbiamiento del mismo, se asume que el microorganismo es resistente tanto a la azida de sodio como al cianuro de potasio y dentro de su cadena respiratoria no se encuentra el citocromo aa₁.

Aunque el hecho de que su crecimiento no haya sido afectado, no es garantía de la ausencia del citocromo aa₁, ya que su crecimiento puede deberse a la presencia de una ruta alterna en la cadena respiratoria, lo que le permite al microorganismo tener otra alternativa en el caso de que en el medio se encuentre alguna sustancia que bloquee la cadena respiratoria principal.

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO A PARTIR DE CIERTOS CARBOHIDRATOS

La capacidad de los microorganismos para utilizar los hidratos de carbono, distintos de la glucosa, lactosa y sacarosa, provee características adicionales útiles para la identificación de las bacterias. Los patrones de fermentación diferencial observados con algunos carbohidratos, ayudan a diferenciar las distintas especies de cada grupo (Koneman, 1989).

En base a los estudios realizados por Feresu y Jones en 1988, quedó demostrado que existe una gran similitud entre los géneros *Listeria monocytogenes* y *Brochothrix thermosphacta*, pero también existen ciertas diferencias entre las que esta la asimilación de ciertos carbohidratos

Brochothrix thermosphacta es capaz de producir ácido a partir de inositol, melibiosa, arabinosa y xilosa. *Listeria monocytogenes*, también puede producir ácido a partir de xilosa y en algunos casos de arabinosa, pero no de inositol ni de melibiosa y solamente una pequeña proporción de cepas puede acidificar el medio a partir de melibiosa, sacarosa, rafinosa y manitol (Feresu y Jones, 1988)

MEDIO DE CULTIVO

Para la realización de esta prueba se emplea un medio basal, la formulación del medio en g/L es la siguiente

Peptona de caseína	10.0
Extracto de levadura	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Púrpura de bromocresol	0.03
Agar-agar	15.0
pH final del medio	7.2±0.1

Los carbohidratos previamente esterilizados por filtración a través de membrana se adicionan al medio, de tal manera que la concentración final de los hidratos de carbono sea de 0.5 %.

PREPARACIÓN

Pesar la cantidad de cada reactivo según el volumen a preparar.

Disolver el medio deshidratado y calentar a ebullición durante un minuto, distribuir en

diferentes matraces Erlenmeyer según el número de carbohidratos a ensayar. Esterilizar el medio a 121 °C (15 lb de presión) durante 15 min.

Adicionar al medio estéril los carbohidratos esterilizados por filtro de membrana en condiciones de esterilidad y distribuir el medio en cajas petri estériles.

TECNICA

Se inoculan la serie de cajas que contienen los diferentes carbohidratos con un cultivo joven de 18 horas del microorganismo en estudio. Se incuban a 25 °C., y se observa la producción de ácido después de 1 a 10 días.

INTERPRETACION

A partir de los carbohidratos manejados, *Brochothrix thermosphacta* es capaz de producir ácido, por lo tanto, si se presenta el virre del indicador ácido-base queda demostrada la producción de ácido. Con esta prueba es posible diferenciar a *Brochothrix thermosphacta* de *Listeria monocytogenes*.

ANTIBIOGRAMA

Un antibiótico es una sustancia sintetizada químicamente o producida por un microorganismo, que a bajas concentraciones inhibe el desarrollo de otros microorganismos

La actividad inhibitoria de los antibióticos está dirigida hacia un número de sitios vulnerables de la célula. Estos agentes interfieren, en la síntesis de la pared celular, en la función de la membrana, en la síntesis proteica y/o en las reacciones enzimáticas clave (Zinsser, 1994)

Para determinar si un antibiótico tiene efecto sobre el desarrollo de la especie en estudio, se deben de realizar pruebas de sensibilidad para determinar si hay inhibición o no y el grado de esta

MEDIO DE CULTIVO

Para realizar el antibiograma se emplea el medio de cultivo estándar para antibióticos

Nº 1 de Grove y Randall, el cual tiene la siguiente composición en g/L.

Peptona de gelatina	6 0
Peptona de caseína	4 0
Extracto de levadura	3 0
Extracto de carne	1 5
Glucosa	1 0
Agar-agar	15 0
pH final del medio	7.2 ±0.1

PREPARACION

Suspender 30.5 g del medio deshidratado por cada litro de agua destilada. Dejar remojar aproximadamente 15 min. Calentar con agitación hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a 121 °C (15 Lb de presión), durante 15 min. Una vez esterilizado el medio se vacía en las cajas Petri cuidando que el espesor sea de 4 mm (aprox.) para garantizar la adecuada difusión del antibiótico.

TECNICA

Las placas se inoculan con 1 mL de un cultivo joven de 18 horas y abundante (aprox. 10⁸), el cual se distribuye perfectamente sobre el agar con la ayuda de una varilla de vidrio estéril. Posteriormente se colocan los discos de papel estériles y se impregnan con el antibiótico en estudio. Las placas se incuban a una temperatura entre 22-25 °C durante 24 horas.

INTERPRETACION

Una vez concluido el periodo de incubación, se debe medir el diámetro del halo de inhibición para cada uno de los antibióticos en estudio.

El diámetro del halo de inhibición alrededor del disco impregnado con el antibiótico, es directamente proporcional al grado de inhibición del crecimiento bacteriano. En el caso de que no se observe ningún halo, se considera que el microorganismo es resistente a éste.

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO A PARTIR DE CIERTOS CARBOHIDRATOS

Los diferentes tipos de microorganismos, necesitan medios de cultivo de distintas composiciones para hacer posible su crecimiento. En el caso de los microorganismos heterótrofos, un sustrato orgánico sirve como fuente de carbono esencial y de energía. En general los hidratos de carbono son las moléculas a partir de las cuales el organismo puede obtener de manera económica, energía necesaria para todos sus procesos vitales (Atlas, 1990).

Si bien la mayoría de las bacterias que utilizan hidratos de carbono son anaerobias facultativas, la utilización de estas moléculas puede no siempre ocurrir en condiciones estrictamente anaerobias, como lo testimonia la formación de productos ácidos por parte de las colonias bacterianas que desarrollan en la superficie del agar (Koneman, 1989).

Según lo reportado por Feresu y Jones en 1988, *Brochothrix thermosphucta* tiene un gran parecido con *Listeria monocytogenes* pero una de las pocas diferencias que distinguen a una especie de la otra, es la producción de ácido a partir de ciertos carbohidratos.

MEDIO DE CULTIVO

Para la realización de sta prueba se empleo el medio recomendado por Feresu y Jones, mismo que presenta la siguiente composición en g/L.

Peptona de caseina	10.0
Extracto de levadura	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Púrpura de bromocresol	0.03
Agar-agar	15.0
pH final del medio	7.2±0.1

PREPARACIÓN

Después de pesar las cantidades de cada una de las sustancias enlistadas, se disolvieron en agua destilada y el medio se esterilizó a 121°C (15 Lb de presión) durante 15 min. Posteriormente, se adicionaron los carbohidratos, mismos que se esterilizaron previamente por filtro de membrana y por último, se realizó la distribución en tubos de ensaye.

TÉCNICA

Los tubos se inoculan con 10 µL de un cultivo joven de cada una de las diferentes cepas y se incuban a 22 °C durante 18-24 horas

INTERPRETACIÓN

Una vez finalizado el periodo de incubación, se debe de realiza comparar un tubo control con los tubos inoculados. La acidificación del medio se hace evidente por el vire del indicador, de tal manera que el medio inoculado con un microorganismo productor de ácido a partir del carbohidrato utilizado tendrá una coloración entre violeta y azul claro.