

## Módulo 4

### Microorganismos de alteración o deterioro.

Un alimento se considera descompuesto cuando es considerado por los consumidores como inaceptable, debido a sus características sensoriales. Estas generalmente incluyen la apariencia, el sabor, el olor y la textura del alimento; son subjetivas y dependen de consideraciones culturales o de cambios en la agudeza de cada consumidor para percibir cambios.

Las alteraciones de los alimentos dependen de sus propias características, de su microbiota presente y del ambiente que rodea al alimento. Dependiendo de estas condiciones se desarrollarán diferentes microorganismos, algunos de los cuales pueden causar alteración o deterioro. Tales microorganismos pueden estar presentes en la materia prima o tener acceso al alimento en alguna etapa del proceso de transformación; es difícil evitar su presencia y una vez contaminado el alimento, si se mantiene por periodos largos bajo condiciones adecuadas para la multiplicación microbiana, finalmente será inaceptable para el consumidor.

Para crecer, los microorganismos requieren de disponibilidad de nutrientes adecuados, condiciones gaseosas apropiadas, temperatura y pH, suficiente agua libre y ausencia de sustancias inhibitorias. Si alguno de estos factores no se encuentra en el rango necesario, no habrá crecimiento. Existen muchos tipos de microorganismos con diferentes requerimientos, de tal forma que un alimento puede ser propicio para que desarrolle cierto microorganismo pero no para otros. Por lo general la microbiota de los alimentos es compleja y la predominancia de un grupo de microorganismos dependerá de mayor o menor adaptación al medio, en comparación los demás.

La vida de anaquel de un producto depende de:

- la concentración inicial de microorganismos de descomposición y
- las condiciones de almacenamiento.

Para evitar pérdidas del producto e incrementar su vida útil será necesario:

- evitar la contaminación de la materia prima y del producto y
- usar métodos convenientes de conservación.

Los microorganismos de alteración o deterioro pueden ocasionar pérdidas económicas cuantiosas.

Al menos en teoría se puede decir que, se puede prevenir el deterioro de los alimentos mediante la ausencia de alguno de los factores de crecimiento microbiano, sin embargo, en la práctica con que exista una pequeña cantidad de microorganismos será suficiente para que se presente la alteración.

Se debe asumir que todo microorganismo de alteración potencial se encuentra en cualquier parte y que si los alimentos son capaces de soportar el crecimiento microbiano y se mantienen por periodos largos bajo condiciones que permitan la contaminación y el desarrollo, entonces se presentará la alteración. Obviamente existe microbiota asociada a la materia prima como su hábitat natural, levaduras sobre las frutas, estafilococos en la piel de los mamíferos, *Pseudomonas* y *Alteromonas* en la piel de los pescados, corinebacterias en leche de vaca, etc. A pesar de esto, existen diversas circunstancias que propician el aumento de la contaminación y que provocan que se alteren los alimentos con mayor rapidez. La contaminación de los alimentos por los microorganismos se puede dar a través del aire, suelo, agua, heces, manipulación, utensilios, etc.

Una vez que se presenta la contaminación de los alimentos y si existen condiciones de propicias para que se dé el crecimiento de los microorganismos, éstos pueden causar que el alimento se vuelva inaceptable debido a un sin número de razones microbiológicas. Los microorganismos pueden,

- producir compuestos con mal olor, por ejemplo aminas y sulfuros en carne o trimetilamina en pescados,
- alterar la apariencia de los alimentos por cambios de color o decoloración,
- modificar la consistencia haciendo los alimentos visiblemente viscosos o con desarrollo micelial,
- provocar cambios en la textura, tales como reblandecimiento de las verduras debido a enzimas pectinolíticas, o leche hilante por contaminación con microorganismos esporulados.

alterar el sabor, generalmente añadiendo sabores debido a la liberación de ciertas sustancias metabólicas, o algunas veces, a través de la remoción de ciertos componentes del alimento que utilizan en su metabolismo como azúcares que se transforman en ácidos.

Los procedimientos utilizados para el control de microorganismos de alteración o deterioro, se dirigen principalmente, a modificar la microbiota inicial a través de la

destrucción de uno o todos los grupos microbianos presentes del alimento, o a reducir o detener el crecimiento microbiano durante el almacenamiento, mediante el control de las condiciones que permiten el desarrollo. . A menos que los microorganismos en su totalidad sean inactivados, tales procedimientos, generalmente permitirán el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos de alteración o deterioro. Por ejemplo, con la utilización de tanques de almacenamiento refrigerados en las granjas y el transporte de la leche en pipas refrigeradas a las compañías procesadoras de productos lácteos, las bacterias ácido lácticas han dejado de ser un problema; siendo ahora la alteración provocada por microorganismos psicrótrofos proteolíticos o lipolíticos el de mayor incidencia. Las enzimas de estos microorganismos pueden incluso resistir los tratamientos térmicos UHT o los procesos de fabricación del queso y continuar actuando sobre el alimento.

La carne cruda empacada en atmósfera de dióxido de carbono se altera más rápidamente debido a la presencia de *Brochothrix* más que por *Pseudomonas* y otras bacterias Gram-negativas. La carne o pescado seco, si el secado no es adecuado para matar toda la carga microbiana, se echará a perder por hongos o levaduras, mientras que el producto sin deshidratar sería alterado por las bacterias.

El punto esencial es que la alteración de los alimentos por microorganismos es un problema importante y puede tomar muchas formas. Los procedimientos que involucran higiene así como procesos de conservación para controlar microorganismos toxicoinfecciosos son, en la mayoría de los casos, igualmente aplicables para el control de los microorganismos de alteración o deterioro.

A continuación algunas definiciones y características de microorganismos considerados como causantes de alteración.

*Microorganismos psicrótrófos*, son los que pueden formar colonias visibles (o enturbiamiento) a temperaturas de refrigeración. En términos generales, *psicrótrofo* significa desarrollo a bajas temperaturas, por lo que, en un sentido amplio, son *psicrótrófos* todos los microorganismos que pueden crecer y multiplicarse en frío.

De forma más concreta, se puede decir que son *psicrótrófos* los microorganismos que *exigen o toleran* temperaturas bajas para su crecimiento, comprendido entre 4 y 20°C. Para ser más precisos, serían *psicrótrófos* los microorganismos que, aunque se multiplican a temperaturas propias de refrigeración (0 a 6°C), su temperatura óptima de crecimiento se estima entre 10°C a 20°C; son *psicrófilos* los que exigen temperaturas bajas y tienen su óptimo crecimiento a 0°C o sus proximidades.

Es necesario mencionar, a *Pseudomonas*, ampliamente reconocido como género predominantemente de alteración. Estos organismos son capaces de provocar alteración debido a dos importantes características. Primero, debido a que son psicrótrófos, y por lo tanto se pueden multiplicar a temperaturas de refrigeración. Y segundo, debido a que atacan diversas sustancias en los tejidos (por ejemplo, de pescados, mariscos, carnes)

para producir compuestos asociados con malos olores y sabores. Dentro de estos compuestos se encuentran: metil mercaptanos, dimetil disulfuros, dimetil trisulfuros, 3-metil-1-butanal, trimetilamina, y etil ésteres de acetato, butirato y hexanoato. Este género se encuentra formando parte de la microbiota natural en productos tropicales y subtropicales, en concentraciones insignificantes del total de la población bacteriana. Sin embargo, debido a que (1) posee un tiempo de generación más corto que otros microorganismos, (2) son microorganismos antagonistas o que presentan reacciones sinérgicas, (3) poseen habilidad para atacar moléculas proteicas largas, y (4) superan la actividad bioquímica de otros géneros, y aunado a que se incurre en prácticas inadecuadas de higiene durante la manipulación y/o almacenamiento de los alimentos, son las razones por las cuales este género se convierte en predominantemente de alteración.

Las *bacterias termodúricas* pueden sobrevivir a temperaturas considerablemente más altas que su temperatura máxima de crecimiento. Tales microorganismos sobreviven calentamientos sobre una matriz, que es el alimento, en rangos de temperatura que van de 60 °C a 80 °C. En la industria láctea, el término se refiere a aquellos microorganismos capaces de sobrevivir procesos de pasteurización pero no crecen a temperaturas de pasteurización. La fuente primaria de contaminación, es la inadecuada limpieza y sanitización de equipos y utensilios. Debido a que consistentemente las cuentas altas de *termodúricos* están asociadas con prácticas de producción poco higiénicas, las cuentas de *termodúricos* se utilizan como indicador de sanitización deficiente del equipo y para detectar fuentes de organismos responsables de cómputos altos en productos lácteos pasteurizados.

El término *bacterias termofílicas* se refiere a microorganismos que crecen en alimentos mantenidos a temperaturas elevadas (55 °C o mayores). En la industria láctea, las bacterias *termofílicas* generalmente son especies del género *Bacillus*, las cuales llegan a la leche a través de diversas fuentes en la granja, o a través de equipo mal sanitizado en las plantas procesadoras. Estos microorganismos rápidamente aumentan en número cuando la leche o los productos lácteos se mantienen a temperaturas altas durante períodos largos.

Los *microorganismos proteolíticos* constituyen un grupo muy heterogéneo, en el cual podemos encontrar especies de los géneros, *Clostridium*, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Mucor* entre otros. La hidrólisis de la proteína por los microorganismos en los alimentos puede producir una variedad de alteraciones tanto en el olor como en el sabor y textura. Las enzimas proteolíticas, sobre todo las de bacterias psicrótróficas de la leche, generalmente permanecen activas tras ser sometidos a tratamientos térmicos, reduciendo la calidad de los productos tratados térmicamente. Por otra parte, la actividad proteolítica microbiana puede ser deseable en ciertos alimentos, debido a su contribución en el desarrollo de

sabores, cuerpo y textura, como por ejemplo en procesos de maduración de quesos. En algunos alimentos, el nivel de microorganismos proteolíticos puede ser de gran valor debido a que es posible predecir el periodo de almacenamiento en refrigeración u obtener información de los métodos de procesamiento.

Los *microorganismos lipolíticos* o productores de lipasas contribuyen a provocar alteraciones en el sabor y el olor. Algunos ácidos grasos libres, liberados por la acción de las enzimas lipolíticas pueden impartir sabores y olores a rancio aún en concentraciones muy bajas. Los ácidos grasos menos volátiles son más susceptibles a la oxidación y luego a procesos de hidrólisis, dando por resultado alteraciones de sabor oxidativo. Muchas bacterias psicrófilas, así como hongos y algunas levaduras son *lipolíticas*. Las lipasas bacterianas termo estables son de particular interés, debido a que alteran productos almacenados durante períodos largos, tales como queso y mantequilla.

A los microorganismos que hidrolizan el almidón y que puedan causar alteración en los alimentos se les designa, *microorganismos amilolíticos*.

Los microorganismos pueden crecer sobre un gran rango de concentraciones de solutos. Sólo unas cuantas especies son capaces de crecer en condiciones de presiones osmóticas altas, características de jarabes o salmueras, es decir en condiciones de reducida actividad acuosa. Existe inconsistencia en los términos existentes en la literatura, sin embargo, los microorganismos que requieren concentraciones mínimas de sal u otros cationes y aniones se les conoce como *halofílicos*, mientras que los microorganismos que pueden crecer en concentraciones altas de solutos orgánicos, particularmente azúcares, se les conoce como *osmofílicos*. Los términos *osmo-* y *xerotolerante* se han utilizado en lugar de *osmofílico*, debido a que estos microorganismos no tienen un requerimiento absoluto en relación a la actividad acuosa o alta presión osmótica, sino que toleran ambientes más secos, de mejor manera que las especies no osmotolerantes. El nivel de sal requerido por los microorganismos varía grandemente, ya que depende de la concentración y tipo de sal y del alimento de que se trate. La clasificación más práctica de *microorganismos halofílicos* está basada en el nivel de sal requerido:

*ligeramente halófilos*, crecimiento óptimo en medios que contienen 0,5% a 3% de sal;

*moderadamente halófilos* crecimiento óptimo en medios que contienen del 3% al 15% de sal, y

*extremadamente halófilos* en medios que contienen del 15% al 30% de sal.

Adicionalmente, muchos *microorganismos halotolerantes* crecen sin adición de sal, así como en concentraciones de sal superiores al 12%. Las levaduras son los *microorganismos osmofílicos* que más comúnmente se encuentran en ambientes no iónicos de alta osmolaridad, como los alimentos que contienen alta concentración de azúcar.

Las sustancias pécticas son componentes importantes de la pared celular de las plantas superiores; son polímeros del ácido D-galacturónico con enlaces glicosídicos alfa-1,4. Las moléculas de pectina contienen ocasionalmente unidades de rhamnosa con enlaces 1,2 en la cadena principal. Además, presentan cadenas tanto en el ácido galactourónico y residuos de rhamnosa que contienen unidades de galactosa y arabinosa. Los grupos carboxilo de los residuos del ácido galactourónico generalmente son metil-esterificados, teniendo efecto sobre las propiedades físicas de la pectina, tales como la gelación. En el caso de que los grupos hidroxilo del ácido galactourónico sean acetilados, esta modificación inhibe la gelación de la pectina. El término, *microorganismo pectinolíticos* se refiere a aquellos que degradan la pectina y *microorganismos pectolíticos* a los que degradan el ácido péctico o pectatos.

La mayoría de microorganismos degradadores de la pectina están asociados con productos del campo y con el suelo. Más del 10% de los microorganismos del suelo han demostrado ser pectinolíticos. Incluyen, pero no está limitado a, bacterias de los géneros *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y diversas levaduras, hongos, protozoarios y nemátodos. Muchos de ellos son fitopatógenos. Recientemente la bacteria considerada solamente como ácido-láctica, *Leuconostoc mesenteroides* ha demostrado además, tener actividad pectolítica. El método básico utilizado para detectar *microorganismos pectinolíticos* o *pectolíticos* se basa en hacerlos crecer sobre un medio sólido que contenga el substrato pectina o pectato, respectivamente. La producción de las enzimas microbianas se detecta ya sea por observación de depresiones en el gel alrededor de la colonia, debido a la degradación del substrato, o a través de inundar la placa con una solución precipitante, que provoca una zona clara donde el substrato ha sido degradado, mientras que las colonias no degradadoras estarán rodeadas de gel opaco por el precipitado del substrato de pectina o pectato no degradado.

Existe una gran variedad de *bacterias productoras de ácido* en la naturaleza, suelo, materia prima y ciertos alimentos procesados. Uno de los grupos más importantes son las *bacterias ácido lácticas*. Los miembros de este grupo son cocos o bacilos Gram-positivo, no esporulados, que se dividen en un plano y son catalasa negativa, con excepción de algunos pediococos. Microorganismos generalmente no móviles y fermentadores obligados que liberan ácido láctico y algunas veces, además, ácidos volátiles y CO<sub>2</sub>. Están subdivididos en los géneros *Streptococcus* (cambio propuesto de nomenclatura a *Lactococcus*), *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*. Las especies homofermentativas producen ácido láctico a partir de los azúcares, mientras que los tipos heterofermentativos producen además de ácido láctico, ácido acético, etanol, CO<sub>2</sub>, y otros componentes traza. Las bacterias ácido lácticas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son bien conocidas en la industria láctea, cárnica y de los vegetales.

El análisis de bacterias *ácido lácticas* en la industria láctea es útil por varias razones. Incluye la determinación de causas de alteración ácida en productos tales como leche fluida y queso *cottage*; evaluación de cultivos lácticos iniciadores; y control de la calidad de quesos madurados, leches fermentadas y productos no fermentados adicionados de cultivos. Las *bacterias ácido lácticas* que se encuentran en los productos lácteos son un grupo muy diverso entre los que se encuentran principalmente *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, y especies de *Lactobacillus* homofermentativas y heterofermentativas.

Las especies de *Propionibacterium* y *Acetobacter* son también *bacterias productoras de ácido*. Algunas especies de *Propionibacterium* son importantes en el desarrollo de ciertas características de sabor, y producción de los ojos en queso tipo Suizo. Miembros del género *Acetobacter* son bien conocidos por su utilización en la producción de vinagre. Además, la mayoría de las bacterias entéricas son capaces de producir tras la fermentación, o ácidos mixtos o butilenglicol.

Se designa genéricamente como *microorganismos acidúricos*, al grupo de microorganismos viables que provocan alteración en jugos de frutas, principalmente jugos de frutas no sometidos a tratamiento térmico, y la técnica que comúnmente se utiliza para este propósito, es la cuenta en placa en agar suero de naranja, incubado durante 48 h a 30 °C. En realidad, esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos que deterioran los alimentos, sino que únicamente proporciona una estimación de la cifra realmente presente y refleja la vida de anaquel esperada del jugo.

Los microorganismos *esporulados mesofílicos aerobios* pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Sporolactobacillus*, son de importancia en la alteración de los alimentos. Los esporulados mesofílicos aerobios clasificados en el género *Bacillus* son bacilos aerobios o anaerobios facultativos cuyas esporas pueden o no deformar el esporangio y en su mayoría son catalasa positiva. La presencia de esporas mesofílicas de las especies de *Bacillus* permiten su sobrevivencia en los alimentos, siendo más resistentes que las células vegetativas a bacteriófagos, factores líticos tales como bacteriocinas, antibióticos producidos por otros organismos, radiaciones letales, temperaturas extremas y germicidas.. Por lo tanto, no es de sorprenderse, que estén presentes en muchos alimentos e ingredientes, tales como: almidones, frutas secas, verduras, granos de cereal, leche en polvo y especias.

Los *esporulados mesofílicos aerobios*, en alimentos de baja acidez (pH>4,6) procesados térmicamente, por lo general provocan una alteración de tipo "acidez plana" y los envases aparentemente se ven normales. El pan hilante, también es un ejemplo de alteración en productos de panadería provocada por *microorganismos esporulados mesofílicos aerobios*, debido a la sobrevivencia de las endosporas en los centros de las piezas, donde la actividad acuosa es alrededor de 0,95.

Todos los miembros *esporulados mesofílicos anaerobios* pertenecen al género *Clostridium*, y los de mayor interés están dentro de dos principales grupos:

*C. sporogenes* y otros anaerobios putrefactivos termo resistentes relacionados, y especies proteolíticas y no proteolíticas de *C. botulinum*.

(b) *C. perfringens* y una variedad de clostridios similares, tales como anaerobios butíricos, que son relativamente poco resistentes al calor.

Muchas especies formadoras de *esporas, mesofílicas anaerobias* constituyen un grupo de mucho interés en la alteración de alimentos de baja acidez sellados herméticamente, debido a su alta termorresistencia, su habilidad para crecer en ausencia de oxígeno y en temperatura de almacenamiento normal de los productos enlatados y otros alimentos procesados, incluyendo la refrigeración de carnes curadas. .

La alteración tipo acidez plana termofílica que se presenta en productos enlatados de baja acidez es causada por el crecimiento de esporulados facultativos aerobios termofílicos. La especie *Bacillus stearothermophilus* es la responsable de este tipo de alteración. Estos microorganismos fermentan los carbohidratos con producción de ácidos grasos de cadena corta que “agrian” el producto. No producen suficiente cantidad de gas, como para modificar la apariencia plana de los envases (o no producen nada de gas).

Los esporulados termofílicos anaerobios que no producen ácido sulfhídrico son los responsables de alterar los productos enlatados de alta acidez. Estas especies esporuladas pertenecen al género *Clostridium*, siendo *Clostridium thermosaccharolyticum* su principal representante. Este microorganismo es un anaerobio obligado, fuertemente sacarolítico, productor de ácido y abundante gas a partir de glucosa, lactosa, sacarosa, salicina y almidón.

Dentro de los esporulados termofílicos anaerobios productores de ácido sulfhídrico se encuentra *Desulfotomaculum nigrificans* que provoca alteración en productos enlatados que no presentan evidencia de abombamiento; sin embargo al abrirlos hay un evidente olor a ácido sulfhídrico y un ennegrecimiento debido a la reacción entre el ácido y el fierro del envase.

Recientemente (Jay et al., 2005; Doyle et al., 2007) se han reportado los géneros dentro de las bacterias esporuladas que causan problemas en alimentos.

Algunas bacterias clasificadas previamente como *Bacillus* fueron transferidas a géneros nuevos como: *Alicyclobacillus* (bacteria acidúrica que descompone jugos de frutas), *Paenibacillus* (se ha encontrado en leche cruda y leche UHT) y *Geobacillus*, como *Geobacillus stearothermophilus*, conocido antes como *Bacillus stearothermophilus*.

Otras bacterias esporuladas que se han detectado en alimentos son:



*Amphibacillus*. *Amphibacillus xylanus* (especie descrita por Niimura et al., 1991) es una bacteria esporulada que digiere el xilano.

*Sporolactobacillus vineae*, bacteria esporulada aislada de un viñedo. Y los esporulados termofílicos anaerobios sacarolíticos, como *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* and *Thermoanaerobacterium y Thermoanaerobium Thermoanaerobacter* (Lee et al., 2008).

### Referencias:

Downs F.P. & Ito K. (Eds.) (2001). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4<sup>th</sup> ed. APHA. Washington.

Marshall, R. T. (1992) **Standard methods for the examination of Dairy Products**. American Public Health Association. Copyright, Washington, D. C.

Harrigan, W. F. & Park, R. W. A. ((1991). **Making safe food: A management guide for microbiological quality**. Academic Press. U.K.

Roberts, D & Greenwood, M. (2003). **Practical Food Microbiology**. 3<sup>rd</sup> ed. U.K.

### Referencias adicionales sobre esporulados

Jay J.M., Loessner M.J., Goleen D.A. (2005) *Modern Food Microbiology* 7th ed. Springer Science and Business Media, USA.

Setlow P., Johnsson, E.A. (2007) Spores and their significance. En: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. *Food Microbiology, Fundamentals and frontiers*. pp.35-67

Niimura, Y., Fujitoshi, KOH, E., YANAGIDA, F., Suzuki, K.I., Komagata, K., Kozaki, M. (1991) *Amphibacillus xylanus* gen. nov., sp. nov., a Facultatively Anaerobic Sporeforming Xylan-Digesting Bacterium Which Lacks Cytochrome, Quinone, and Catalase. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1991; 41: 190.

Young-Hyo Chang, Min Young Jung, In-Soon Park and Hee-Mock Oh ( 2008) *Sporolactobacillus vineae* sp. nov., a spore-forming lactic acid bacterium isolated from vineyard soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58: 2316 - 2320.

Yong-Eok Lee, Mahendra K. Jain, Chanyong Lee, and J. Gregory Zeikus (1993) Taxonomic Distinction of Saccharolytic Thermophilic Anaerobes: Description of *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* gen. nov., sp. nov., and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* gen. nov., sp. nov.; Reclassification of *Thermoanaerobium brockii*, *Clostridium thermosulfurogenes*, and *Clostridium thermohydrosulfuricum* E100-69 as *Thermoanaerobacter brockii* comb. nov., *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* comb. nov., and *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* comb. nov., Respectively;

and Transfer of *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E to *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 41 - 51.

### **Objetivos:**

- Determinar microorganismos que provocan alteración o deterioro en los alimentos.
- Aplicar métodos de estimación de la cifra presente, o de detección, para establecer el número o la presencia de grupos de alteración en alimentos.
- Correlacionar la estimación de la cifra obtenida con la calidad del producto, para concluir acerca de la aceptación o rechazo del mismo.
- Correlacionar la estimación de la cifra obtenida con la calidad del producto para concluir acerca de la vida de anaquel.

### **Ejercicio:**

1. Con base en bibliografía especializada qué grupo o grupos de microorganismos de alteración o deterioro se sugiere analizar para el alimento que se le designo?
2. Cuáles son las fuentes de contaminación de los grupos de microorganismos de alteración o deterioro sugeridos a analizar en el alimento asignado?
3. Cuáles son los límites o especificaciones microbiológicas permitidas para cada grupo microbiano para establecer que el alimento se encuentra dentro de parámetros de calidad?
4. Qué cambios indeseables a corto o mediano plazo son de esperar en el alimento, en caso de que algún grupo o grupos de alteración o deterioro excedan los límites o especificaciones máximos permitidos?
5. En dónde se contaminó (posible ruta de contaminación) y qué condiciones favorecieron la multiplicación del grupo o grupos de microorganismos de alteración o deterioro que excedieron los límites máximos permitidos del producto analizado?
6. Qué medidas de control propone, en caso de que la estimación de la cifra de un grupo o grupos de alteración o deterioro excedan los límites o especificaciones máximos permitidos?
7. Qué destino tendría el alimento analizado y por qué?

Además, cuando aplique:

8. ¿en cuál industria de alimentos son importantes las levaduras osmofílicas?
9. ¿en cuál, las que fermentan lactosa?
10. ¿Qué especies de hongos se encuentran comúnmente en la leche y en los productos lácteos?
11. ¿Cuáles especies de hongos son importantes industrialmente?

## Bacterias acidofilas.

### OBJETIVOS

- Este método describe el método para estimar la cifra de bacterias acidófilas mediante la técnica de cuenta en placa a  $35 \pm 2$  °C.
- Este método es aplicable a cualquier alimento en forma líquida o sólida así como, para frotis, en el cual los microorganismos están viables y presentes.

### GENERALIDADES

Existe una gran variedad de *bacterias productoras de ácido* en la naturaleza, suelo, materia prima y ciertos alimentos procesados. Uno de los grupos más importantes son las *bacterias ácido lácticas*. Los miembros de este grupo son cocos o bacilos Gram-positivo, no esporulados, que se dividen en un plano con excepción de los pediococos y catalasa negativa, con excepción de algunos pediococos. Microorganismos generalmente no móviles y fermentadores obligados que liberan ácido láctico y algunas veces, además, ácidos volátiles y CO<sub>2</sub>. Están subdivididos en los géneros *Streptococcus* (cambio propuesto de nomenclatura a *Lactococcus*), *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*. Las especies homofermentativas producen ácido láctico a partir de los azúcares, mientras que los tipos heterofermentativos producen además de ácido láctico, ácido acético, etanol, CO<sub>2</sub>, y otros componentes traza. Las bacterias ácido lácticas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son bien conocidas en la industria láctea, cárnica y de los vegetales.

### FUNDAMENTO

El presente método de prueba consiste en, inocular diluciones seriadas de la muestra en:

1. Agar MRS acidificado, seguido de incubación a  $35 \pm 2$ °C/5 días,
2. Contabilizar el número de colonias y confirmar mediante pruebas adecuadas,
3. Calcular el número de bacterias acidófilas por gramo o mililitro de muestra a partir del número de colonias obtenidas por placa escogiendo la dilución que nos proporcione un resultado significativo.

## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

- 1 matraz Erlenmeyer de 500,0 mL de capacidad, conteniendo 225,0 mL de agua peptonada.<sup>a</sup>
- 4 tubos de ensayo de 16 x 150 mm con tapón de rosca, conteniendo 9,0 de agua peptonada.<sup>a</sup>
- 1 matraz Erlenmeyer de 250,0 mL de capacidad, conteniendo 150,0 mL de agar MRS.<sup>a</sup>
- 8 tubos de ensayo sin labio, de 16 x 150 mm con 5,0 mL de agar MRS.<sup>a</sup>

## SOLUCIONES, REACTIVOS E INDICADORES

- Colorante azul de lactofenol<sup>e</sup>.

## MATERIAL Y EQUIPO

- Licuadora o stomacher<sup>a</sup>
- Pipetas estériles graduadas de 1,0, 5.0 y 10,0 mL<sup>a</sup>
- Balanza con capacidad de 2000,0 g y sensibilidad de 0,1 g<sup>a</sup>
- Baño de agua 45 ± 2°C<sup>a</sup>
- 8 Cajas de Petri<sup>a</sup>
- Incubadora de 35 °C con termostato calibrado que evite variaciones mayores a ± 0,2 °C<sup>a</sup>
- Utensilios, estériles para el manejo de la muestra<sup>a</sup>.
- Cuenta colonias<sup>b</sup>
- Microscopio, cubre y portaobjetos<sup>b</sup>

## NOTAS

<sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.

<sup>b</sup> Material necesario a las 120 h. de iniciada la práctica.

## PROCEDIMIENTO

1. Preparar placas entre las diluciones 1 y 6 (ej. 10<sup>-1</sup> 10<sup>-2</sup> 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-6</sup>).
2. Pesar 25,0 g (no mL) del alimento.
3. Añadir 225,0 mL de diluyente de peptona y licuar durante 2 min. Para líquidos no viscosos, agitar la muestra y sembrar 1,0 mL directamente o hacer diluciones (1,1 mL de la muestra en 9,9 de diluyente de peptona o 1:9). Para frotis, añadir el frotis a 9,0 mL de diluyente al 1% y agitar.

## NOTA

No permitir que el tiempo entre la homogeneización de la muestra y la siembra exceda los 20 min.

4. Preparar diluciones decimales con 9,9 mL de diluyente de peptona y 1,1 mL del homogeneizado o diluciones previas. Utilizar pipetas para depositar volúmenes menores al 10% del volumen total. Trabajar a temperatura ambiente (15-25 °C). Agitar cada dilución 25 veces en un arco de 30 cm durante 7 sec.
5. Pipetear por duplicado, 1,0 mL de homogenizado y de cada dilución seleccionada en cajas petri.
6. Verter 12,0 -15,0 mL de medio MRS fundido y enfriado ( $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) en cada caja de Petri. Mezclar cuidadosamente cada placa y dejar solidificar en una superficie horizontal
7. Verter una sobrecapa delgada de 5,0 – 8,0 mL de agar MRS y dejar solidificar. La sobrecapa se utiliza para producir una atmósfera de oxígeno reducido.
8. Incubar las placas en posición invertida a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 5 días.
9. Examen microscópico
10. Colocar una gota de azul de lactofenol en un portaobjetos limpio. Tocar una colonia con el asa recta y transferirla a la gota de colorante. Cubrir con cubreobjetos y observar a 400 x (objetivo de 40 x y ocular de 10 x).
11. Las células aparecen azules. Las levaduras se tiñen de azul al igual que las bacterias.

## CALCULOS Y EXPRESION DE RESULTADOS

Si se efectúa una incubación por más o menos días se deberá anotar en la bitácora de resultados y en el informe de resultados.

Después del período de incubación contar las colonias utilizando cuenta colonias. No incluir las colonias que obviamente son levaduras u hongos. Colonias algodonosas o con esporas son de hongos. Las colonias grandes pueden ser de levaduras, comprobar estas colonias mediante examen microscópico, utilizando procedimiento de tinción.

Contar como colonias de acidófilos sólo colonias típicas. No contar partículas de alimentos

Anotar la estimación de la cifra de colonias y la dilución de la placa, las placas con demasiadas colonias se anotan como “muy numerosas para contarse”. Las placas sin colonias se anotan como: “menor que”

Colonias extendidas.- Son colonias o cúmulo de colonias. Se presentan en placas húmedas cuando el agar y la muestra no se mezclan adecuadamente. Contar cada cadena o círculo de colonias como si fuera una sola colonia.

Si la colonia extendida cubre más del 25 % de la superficie del agar, anotar el resultado como “extendido”. Si más del 5% de las placas presentan este problema, investigar y eliminar la causa. La temperatura alta del medio es la causa más frecuente.

Para obtener la estimación de la cifra, multiplicar el número total de colonias en cada placa y multiplicar por el recíproco de la dilución utilizada. Redondear el resultado a dos cifras significativas. Reportar como bacterias acidófilas /gramo ó mililitro.

La siguiente guía se puede utilizar para seleccionar las placas y calcular la estimación de la cifra.

- Seleccionar las placas de 25 -250. Este rango provoca la mejor estimación de la cifra.
- Si existen dos diluciones decimales consecutivas dentro del rango seleccionado, computarizar la cuenta por gramo por cada dilución y reportar la media aritmética como la cuenta por gramo, a menos que la estimación de la cifra mayor sea más del doble del menor .En este caso, reportar la cuenta menor.
- Si las placas tienen menos de 25 colonias, utilizar la menor dilución ( $10^{-1}$  es una dilución menor que  $10^{-2}$ )
- Si no hay colonias en ninguna placa reportar la cuenta como “menor que” una vez la dilución más pequeña.
- Si todas las placas tienen más de 250 colonias utilizar la placa con menos colonias y reportar el valor como estimado.
- Si se utilizó una placa con colonias extendidas, reportar el valor como extendido.
- Reportar el resultado redondeando a dos cifras significativas.

## **BIBLIOGRAFIA**

(2001). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 4<sup>th</sup> ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.). APHA, Washington, D.C.

## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

### Agua peptonada

Peptona	1,0 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua destilada	1,0 L

Disolver los componentes de la formulación en un litro de agua y ajustar la solución a pH de 7.0, con solución de hidróxido de sodio 1N; distribuir en matraces o tubos, de acuerdo a los requerimientos de la técnica y esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Después de la esterilización, los volúmenes y el pH de la solución deben ser iguales a los iniciales. pH final de  $7 \pm 0.2$ .

### Agar MRS acidificado

Peptona 1	10,0 g
Extracto de malta	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Dextrosa	20,0 g
Tween 80 (sorbitán mono-oleato)	1,0 mL
Fosfato dipótasio ( $\text{K}_2 \text{HPO}_4$ )	2,0 g
Acetato de sodio trihidratado ( $\text{CH}_3 \text{CO}_2\text{Na}$ ) <sub>3</sub> . 3 H <sub>2</sub> O	2,0 g
Citrato de amonio [ $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7(\text{NH}_4)_2$ ]	2,0 g
Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,2 g
Sulfato de manganeso heptahidratado ( $\text{Mn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,05 g
Agar bacteriológico	18,0 g

### Reactivos para ajustar el pH

Acido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), 100% glacial.

Disolver los componentes en un baño de agua. Enfriar a  $50^{\circ}\text{C}$  y añadir ácido acético para ajustar el pH, comprobar por medio de potenciómetro, de tal forma que después de esterilizado llegue a 5,4 a temperatura ambiente. Distribuir en porciones de 500,0 mL. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

Justo antes de utilizarse, añadir fructosa en una concentración final de 1,0% (1,0 mL de una solución esterilizada por filtración al 10,0 % por cada 100,0 mL de medio) y efectuar corrección de pH a 5,4 si fuese necesario.

No se debe fundir el medio que se ha acidificado con anterioridad.



## **NOTA**

La fructosa se añade solo si se quisiera promover el desarrollo de *L. plantarum* y el ácido se añade para incrementar selectividad del medio. Realizar ajuste de pH con HCl imparte menor selectividad que con ácido acético

### Principio de acción

La peptona es fuente de carbono y nitrógeno. El extracto de levadura es fuente de elementos traza, vitaminas y amino ácidos. La dextrosa es fuente de carbohidratos que proporciona carbono. El acetato de sodio y citrato de amonio, inhiben los estreptococos, hongos y otros microorganismos. El sulfato de magnesio y sulfato de manganeso son fuente de iones inorgánicos. El tween 80 actúa como surfactante.

## Bacterias acidúricas en placa

### OBJETIVOS

- Aplicar el método para realizar la estimación de la cantidad de microorganismos viables acidúricos presentes en jugos de frutas, bebidas no alcohólicas de frutas, concentrados de jugos de frutas y jugos de verduras.

### GENERALIDADES

Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos acidúricos viables en jugos de frutas, principalmente jugos de frutas no sometidos a tratamiento térmico, la técnica que comúnmente se utiliza es la cuenta en placa. En realidad, esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos acidúricos que deterioran los alimentos mencionados, sino que únicamente proporciona una estimación de la cifra realmente presente y refleja la posible vida de anaquel esperada del jugo.

### FUNDAMENTO

El presente método de prueba consiste en, inocular diluciones seriadas de la muestra en:

1. Agar suero de naranja, seguido de incubación a  $30 \pm 2^\circ\text{C}/5$  días,
2. Contabilizar el número de colonias y confirmar mediante pruebas adecuadas,
3. Calcular el número de bacterias acidúricas por gramo o mililitro de muestra a partir del número de colonias obtenidas por placa escogiendo la dilución que nos proporcione un resultado significativo.

### MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

- 1 matraz de 250,0 mL con 90,0 mL de buffer de fosfatos<sup>a</sup>.
- 3 tubos de ensaye de 16 x 150 mm con tapa de rosca., con 9,0 mL de solución reguladora de fosfatos<sup>a</sup>.
- 8 tubos de 22 x 175 con 12,0 mL de Agar suero de naranja, pH:  $5.5 \pm 0.1^a$ .

### MATERIAL Y EQUIPO

- 1 bolsa para Stomacher o vaso de licuadora estéril<sup>a</sup>.
- Stomacher o motor para licuadora<sup>a</sup>.
- Mechero Bunsen<sup>a</sup>.
- 1 pipeta estéril con algodón de 1,0 y 10,0 mL<sup>a</sup>.

- Propipeta<sup>a</sup>.
- 8 cajas de Petri estériles<sup>a</sup>.
- Incubadora con termostato a 30 °C con termostato calibrado que evite variaciones mayores a  $\pm 0,2$  °C<sup>a</sup>.
- Balanza granataria<sup>a</sup>.
- Cucharas estériles u otros instrumentos apropiados para transferir muestras de alimentos<sup>a</sup>.

## NOTAS

- <sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.  
<sup>b</sup> Material necesario a las 48 h. de iniciada la práctica.

## PROCEDIMIENTO

1. Distribuir las cajas de Petri estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación; la adición del medio de cultivo y la homogenización del medio, se puedan efectuar cómoda y libremente. Marcar las cajas en sus bases con los datos de la codificación pertinente previamente a su inoculación.
2. Inocular por duplicado las alícuotas de las diluciones seleccionadas en las placas correspondientes, agregar a las cajas Petri de 12,0 a 15,0 mL de medio preparado, esterilizado y enfriado a  $45 \pm 1$ °C, y mezclarlo mediante seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en sentido contrario y seis de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal, hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio, cuidando de que no se moja la cubierta de las cajas Petri. Dejar solidificar.
3. Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente empleados, como testigo de esterilidad.  
El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo fundido a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.
4. Incubar las placas en posición invertida (con la tapa hacia abajo) por 48 h a 30 °C.

## CALCULOS Y EXPRESION DE RESULTADOS.

Proceder de igual forma que la explicación dada en el método de prueba para la enumeración de bacterias acidófilas.

## BIBLIOGRAFIA

(2001). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4<sup>th</sup> ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.). APHA, Washington, D.C.



## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

### **Solución reguladora de Fosfatos pH 7.2, (solución concentrada)**

Fosfato monobásico de potasio	34,0 g
Agua destilada	1,0 L

Disolver el fosfato en 500,0 mL de agua y ajustar el pH a 7,2, con solución de hidróxido de sodio 1N, aforar con agua a un litro. Esterilizar la solución a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  y conservar en refrigeración.

**Solución de trabajo:** Tomar 1,25 mL de la solución anterior (solución concentrada) y transferirlos a un matraz volumétrico de un litro, aforando con agua; después de distribuir en matraces o tubos, los volúmenes especificados en cada monografía, se debe esterilizar a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Después de la esterilización, los volúmenes finales y el pH, deben ser iguales a los iniciales.

### **Agar suero de naranja**

Suero de naranja	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Digerido pancreático de caseína	10,0 g
Dextrosa	4,0 g
Fosfato dipotásico	2,5 g
Agar bacteriológico	15,5 g
Agua destilada	1,0 L

Suspender 45,0 g del polvo en 1,0 L de agua. Mezclar completamente. Calentar con agitación frecuente durante 1 minuto hasta completa disolución del polvo. Dispensar en cantidades menores de 50,0 mL y esterilizar en autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 min.

Principio de acción.

El agar suero de naranja contiene peptonas como fuente de carbono y nitrógeno para promoción de crecimiento en general. El suero de naranja provee de condiciones ácidas favorables en la recuperación de microorganismos ácido tolerante. El extracto de levadura es fuente de vitaminas del complejo B que estimulan el crecimiento. La dextrosa es un carbohidrato. El agar es el agente solidificante.

## **Bacterias proteolíticas que hidrolizan la gelatina y la caseína.**

### **OBJETIVOS**

- Determinar microorganismos proteolíticos dañados o estresados que hidrolizan la gelatina que puedan causar alteración en los alimentos, utilizando técnica de desestresamiento y método de doble capa.
- Determinar microorganismos proteolíticos que hidrolizan la caseína que puedan causar alteración en los alimentos.

### **GENERALIDADES**

Los microorganismos proteolíticos que poseen enzimas proteolíticas, constituyen un grupo muy heterogéneo, en el cual podemos encontrar especies de los géneros, *Clostridium*, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Mucor* entre otros.

Se han utilizado numerosos métodos para detectar hidrólisis de gelatina por los microorganismos, dentro de estos podemos mencionar, la licuefacción de la gelatina (punción de la gelatina), y la detección de la hidrólisis de la gelatina en medio sólido con o sin precipitación química de la proteína.

### **Reparación y Detección de Microorganismos dañados o estresados.**

Los microorganismos sujetos a estrés ambiental se pueden dañar o alterar estructural o metabólicamente. Los microorganismos dañados no poseen habilidad para replicarse en ambientes selectivos en los cuales los organismos no dañados si los toleran. A los microorganismos dañados o estresados se les puede “resucitar” o permitir reparar el daño, si se les incuba en medios apropiados no selectivos.

Los alimentos o las materias primas generalmente contienen microorganismos viables (vivos) que fisiológicamente están debilitados o dañados debido al estrés ambiental al que las células microbianas han estado sujetas. El daño bacteriano puede ser consecuencia de muchos métodos de manipulación, proceso, incluyendo tratamiento térmico, refrigeración, congelación, deshidratación, e irradiación, o bien exposición a conservadores, acidez o disminución de la actividad acuosa; así como el almacenamiento.

Las superficies de los equipos que han sido sanitizadas, así como el agua utilizada en el procesamiento de los alimentos o en el lavado de los equipos, pueden contener microorganismos estresados. Datos experimentales, indican que tanto las células bacterianas gram-negativas, gram-positivas, endosporas bacterianas, levaduras y hongos pueden ser susceptibles a dañarse por estrés.

En condiciones ideales, un método utilizado para detección de microorganismos procedentes de los alimentos o de muestras medioambientales, deberían detectar tanto los microorganismos normales así como los dañados. Sin embargo, con base en investigaciones, recientemente se sabe que muchos de los métodos oficiales utilizados

para el aislamiento y enumeración de los microorganismos en alimentos, no lo permite para los microorganismos estresados y por lo tanto existe una falla en su detección. Así, los métodos empleados para determinar cómputo microbiano total en placa cuando se emplea el método de vertido en placa y la temperatura del medio de cultivo es de 45°C o temperaturas más altas, da por consecuencia la recuperación y enumeración de un menor número de colonias, debido a que los microorganismos dañados o estresados no tienen oportunidad de recuperarse debido al choque térmico que se presenta. Los microorganismos dañados o estresados son tan importantes como su contraparte que no lo está, ya que en condiciones favorables, las células vegetativas dañadas pueden resucitar y llegar a convertirse normales funcionalmente hablando y de igual manera, por ejemplo, las esporas pueden traspasar sus sistemas de daño y convertirse en célula vegetativa y aumentar su población y originar una célula vegetativa normal funcionalmente.

Es bien sabido que muchos de los componentes utilizados en la preparación de los medios de cultivo, tales como agentes surfactantes, sales, antibióticos, ácidos, colorantes, etc. se añaden para proporcionar selectividad o diferenciación de microorganismos indicadores, patógenos, de alteración o cualquier otro microorganismo proveniente de los alimentos; y éstos componentes, pueden inhibir el proceso de reparación de los microorganismos o bien ser tóxicos y causar la muerte de los microorganismos dañados. Lo anterior sugiere que los microorganismos dañados provenientes de una muestra, se les debe permitir resucitar en un medio de cultivo adecuado antes de ser expuestos al medio selectivo. Al tomar en cuenta esta medida, se evitará tener fallas en la detección de los mismos.

Las investigaciones indican, que para reparar células dañadas, esto se puede lograr cuando el organismo dañado se mantiene en condiciones adecuadas, tomando en cuenta los siguientes aspectos:

- (a) la temperatura y tiempo óptimos requeridos para la reparación puede variar según la naturaleza del estrés,
- (b) las células reparadas por completo recuperan su resistencia normal a los agentes selectivos en el medio de cultivo, y
- (c) el proceso de reparación debe preceder a la multiplicación celular.

Por lo tanto, es deseable permitirle a las células estresadas reparar cualquier daño antes de efectuar el aislamiento o pretender estimar la cifra presente por el procedimiento acostumbrado en medios selectivos.

Para el caso de bacterias esporuladas se debe completar tanto la germinación y el crecimiento antes de que inicie el crecimiento de la célula vegetativa.

Para monitorear la calidad microbiológica de productos alimenticios, se deben utilizar procedimientos estandarizados con el objeto de obtener resultados uniformes. Debido a la presencia de organismos dañados en alimentos, muchos de los métodos recomendados comúnmente, especialmente los métodos selectivos, presentan deficiencias inherentes en cuanto a la no detección de células dañadas. Su utilidad es cuestionable, especialmente para propósitos regulatorios. Sin embargo, este problema puede resolverse añadiendo un paso de reparación al método de detección selectivo.

## FUNDAMENTO

El método de prueba para recuperación de bacterias licuefacientes, consiste en realizar un preenriquecimiento para estabilizar células de microorganismos dañados, para posteriormente recuperarlos a través del método de extensión de superficie en placas con el sustrato adecuado.

El método de prueba para recuperación de bacterias proteolíticas de la caseína, consiste en realizar diluciones del alimento, utilizar el método de extensión de superficie en placas con el sustrato adecuado, incubar y finalmente enumerar.

## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

### **Material necesario para pre enriquecimiento de bacterias proteolíticas que hidrolizan la gelatina (licuefacciones) con técnica de desestresamiento:**

- 1matraz Erlenmeyer de 250,0 mL de capacidad, conteniendo 90,0 mL de caldo soya tripticaseína<sup>a</sup>.
- 2 tubos de 16 x 150 conteniendo 9,0 mL de buffer de fosfatos<sup>a</sup>.
- 6 cajas de Petri conteniendo 15,0 mL de agar gelatina (medio basal)<sup>a</sup>.
- 6 tubos de 16 x 150 conteniendo 2,5 mL de agar gelatina para la doblecapa<sup>a</sup>.
- Ácido acético al 5,0%<sup>e</sup>.

### **Material necesario para pre enriquecimiento de bacterias proteolíticas que hidrolizan la caseína:**

- 1 matraz Erlenmeyer de 250,0 mL de capacidad, conteniendo 90,0 mL de buffer de fosfatos<sup>a</sup>.
- 2 tubos de 16 x 150 conteniendo 9,0 mL de buffer de fosfatos<sup>a</sup>.
- 6 cajas de Petri conteniendo 15,0 mL de agar leche descremada<sup>a</sup>.
- HCl al 1,0% o bien ácido acético al 10,0%<sup>d</sup>.

## MATERIAL Y EQUIPO

- Mechero<sup>a</sup>
- Stomacher<sup>a</sup>
- bolsa para stomacher<sup>a</sup>
- Balanza<sup>a</sup>
- 4 pipetas de 1,0 mL<sup>a</sup>
- 1 varilla de vidrio<sup>a</sup>



- Incubadora a 20°C con termostato calibrado que evite variaciones mayores a  $\pm 0,2$  °C<sup>a</sup>
- Cuentacolonias<sup>d,e</sup>

## NOTAS

- a Material necesario al inicio de la práctica.
- b Material necesario a las 24 h. de iniciada la práctica.
- c Material necesario a las 48 h. de iniciada la práctica.
- d Material necesario a las 72 h. de iniciada la práctica.
- e Material necesario a las 96 h. de iniciada la práctica.

## PROCEDIMIENTO PARA ESTIMAR BACTERIAS LICUEFACIENTES CON DESESTRESAMIENTO:

- Pesar 10,0 gramos de la muestra y colocar en un matraz con 90,0 mL con caldo soya tripticaseína.
- Incubar a 20°C/24 h.
- Efectuar diluciones decimales según experiencia o al menos  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ .
- Inocular por duplicado y por superficie en el medio basal y distribuir uniformemente con varilla de vidrio 0,1 mL de cada dilución. Verter 2,5 mL de una sobrecapa de gelatina fundida y enfriada y distribuir sobre la superficie del agar.
- Incubar las cajas a 20°C por 72 h.
- Interpretación: se considera hidrólisis **completa** de la gelatina cuando exista licuefacción del medio basal y la doblecapa por completo y que después de someterse durante 30 min a temperatura de refrigeración, las placas de agar no solidifique. O bien,
- En el caso de que exista hidrólisis **parcial**, añadir a la superficie de la placa 10,0 mL de ácido acético al 5,0% por 15 min.
- Interpretación: se considera hidrólisis **parcial** de la gelatina las colonias que presenten halo transparente.
- Reportar como presencia o ausencia de bacterias que hidrolizan a la gelatina o licuefacientes en 10,0 g o mL de alimento.

## PROCEDIMIENTO PARA ESTIMAR BACTERIAS PROTEOLITICAS DE LA CASEINA:

- Pesar 10,0 gramos de la muestra y colocar en un matraz con 90,0 mL de solución diluyente adecuada (buffer de fosfatos, peptona de caseína, etc.)
- Efectuar diluciones decimales según experiencia o al menos  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ .
- Inocular por duplicado y por superficie en agar leche descremada y distribuir uniformemente con varilla de vidrio 0,1 mL de cada dilución.
- Incubar las cajas a 21°C por 72 h. (o bien utilizar las condiciones de incubación recomendadas para el alimento bajo estudio).

- Cubrir las placas con HCl al 1,0% o ácido acético al 10% durante 1 min. Decantar el exceso de solución ácida, posteriormente contar las colonias que estén rodeadas de zonas claras producidas por la proteólisis.
- Reportar la estimación de la cifra de bacterias que hidrolizan la caseína. Sensibilidad mínima de detección del recuento por extensión de superficie es de 100,0 UFC/g o mL.
- La sensibilidad se puede aumentar, si se inoculan 3 cajas con 0,3 mL, 0,3 mL y 0,4 mL de la primera dilución, por lo tanto la sensibilidad mínima de detección será de 10,0 UFC/g o mL.

## **BIBLIOGRAFIA**

Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3<sup>rd</sup>. ed. American Public Health Association. Copyright 1992.

## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

### **Gelatina medio basal, agar:**

Peptona de carne	5,0 g
extracto de carne	3,0 g
cloruro de sodio	5,0 g
sulfato de manganeso	0,05 g
agar bacteriológico	15,0 g
agua destilada	1,0 L.

Disolver los ingredientes en agua destilada con calentamiento suave. Ajustar a pH de 7,0, y esterilizar a 121°C durante 15 min.

### **Gelatina suave para la doblecapa, agar**

La composición de la doblecapa es la misma que para el medio basal de agar gelatina, excepto que se añade 0,8% de agar y 1,5% de gelatina.

### **Soya tripticaseína, caldo / Soya tripticaseína, agar**

Trypticaseína o triptosa	17,0 g
Fitona	3,0 g
Glucosa	2,5 g
Cloruro de sodio	2,5 g
Agar bacteriológico	15,0 g
Agua destilada	1,0 L

Disolver los ingredientes en el agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa. Distribuir porciones de 225,0 mL dentro de matraces de 500,0 mL y esterilizar en autoclave a 121±1 °C durante 15 minutos. En caso de requerirse en cajas de Petri enfriar el agar a 45°C y verter en condiciones de asepsia. El pH final debe ser de 7,3±0,2.

### **Principio de acción**

Este medio es altamente nutritivo y versátil, es recomendado para uso en general. Debido a la formulación de la triptona y la peptona de soya, el medio estimula el crecimiento abundante de organismos fastidiosos, estresados o dañados, sin la adición de suero, etc.

### **Leche descremada, agar**

Agar cuenta estándar estéril y preparado según las indicaciones 900,0 mL y 100,0 mL de leche descremada reconstituida al 10,0% en agua destilada y estéril.

Fundir el agar cuenta estándar y enfriar a 50°C, añadir 100,0 mL de leche descremada estéril. Mezclar bien y verter en cajas de Petri estériles.

## **Bacterias que hidrolizan el almidón.**

### **OBJETIVO**

- Determinar microorganismos amilolíticos y que puedan causar alteración en los alimentos.

### **GENERALIDADES**

A los microorganismos que provocan hidrólisis extracelular del almidón debido a que producen la enzima amilasa y que puedan causar alteración en los alimentos se les designa, *microorganismos amilolíticos*.

Después de la celulosa, el almidón es la sustancia más abundante que existe en la naturaleza. De las 18 toneladas de almidón que se purifica anualmente, la mitad se utiliza en la industria de los alimentos.

Las moléculas de almidón están formadas de polímeros de la D-glucosa anhidra, que se disponen en forma lineal o ramificada. La amilosa, que es la forma lineal del almidón, es el componente responsable de provocar que la viscosidad aumente cuando los gránulos de almidón se hidratan. La amilopectina, que es el otro polímero del almidón, posee una estructura altamente estable, ramificada y resistente a la gelatinización. Es por esto, que el almidón se utiliza ampliamente en aquellos productos de baja acidez sometidos a tratamiento térmico, tales como frijol con puerco, budines y salsas; alimentos ácidos tales como aderezos para ensaladas, salsa barbecue y otros condimentos; productos horneados y botanas; productos secos mezclados tales como budines instantáneos, sazoadores, sopas; y coberturas secas de dulces y goma de mascar.

La presencia de esporas termofílicas es el problema más importante en la microbiología del almidón. Y debido a que el almidón es un producto que proviene de cultivos del campo, diversas especies de *Bacillus* que habitan en el suelo son las que predominan en el producto terminado. Además, de la presencia de los microorganismos por sí mismos, la presencia de las amilasas termo estables, las cuales pueden permanecer aún después de que las células hayan sido destruidas, pueden causar alteración de los productos elaborados con almidones contaminados con enzimas. Con frecuencia la carga microbiana puede reducirse durante los procesos de fabricación, solo para dejar las enzimas activas que continuarán degradando los productos después de la producción o cuando el ingrediente crudo es incorporado al producto terminado. Por esta razón, no solo es importante determinar el número de contaminantes microbianos como prueba de calidad rutinaria, sino que se debieran además, identificar los microorganismos involucrados.

## FUNDAMENTO

El método de prueba para recuperación de bacterias *amilolíticas*, consiste en realizar diluciones del alimento, utilizar el método de extensión de superficie en placas con el sustrato adecuado, incubar, utilizar un revelador para detección de la degradación del almidón y finalmente contabilizar.

## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

- 1 matraz Erlenmeyer de 250,0 mL de capacidad conteniendo 90,0 mL de agua peptonada<sup>a</sup>.
- 2 tubos de 16 x 150 conteniendo 9,0 mL de agua peptonada<sup>a</sup>.
- 6 cajas de agar nutritivo conteniendo 15,0 mL de agar almidón al 1,0 %<sup>a</sup>.

## SOLUCIONES, REACTIVOS E INDICADORES

- Solución de yodo de Gram ó alcohol etílico al 95,0%<sup>c</sup>.

## MATERIAL Y EQUIPO

- Mechero<sup>a</sup>.
- Stomacher<sup>a</sup>.
- Bolsa para stomacher<sup>a</sup>.
- Balanza<sup>a</sup>.
- Cuentacolonias<sup>c</sup>.
- 4 pipeta de 1,0 mL<sup>a</sup>
- 1 varilla de vidrio<sup>a</sup>.
- Incubadora a 35 °C con termostato calibrado que evite variaciones mayores a  $\pm 0,2$  °C<sup>a,b,c</sup>.

## NOTAS

- a Material necesario al inicio de la práctica.
- b Material necesario a las 24 h. de iniciada la práctica.
- c Material necesario a los 7 días de iniciada la práctica.

## PROCEDIMIENTO

- Pesar 10,0 gramos de la muestra y colocar en un matraz con 90,0 mL de solución diluyente adecuada (buffer de fosfatos, peptona de caseína, etc.)
- Efectuar diluciones decimales según experiencia o al menos  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ .
- Inocular por duplicado y por superficie en agar almidón y distribuir uniformemente con varilla de vidrio 0,1 mL de cada dilución.
- Incubar las cajas a 35 °C /1-7 días.

- Investigar la presencia de almidón residual bañando la superficie del agar con solución de yodo de Gram. Una zona clara adyacente a la colonia indica una prueba positiva; el almidón no hidrolizado toma color azul oscuro al acomplejarse con el yodo.
- En lugar de solución de yodo de Gram, también se puede utilizar alcohol etílico al 95%. Una zona clara, translúcida alrededor y por debajo de las colonias desarrolladas en las placas es evidencia de que el almidón ha sido hidrolizado. Cuando no existe hidrólisis, el medio es de apariencia blanca y opaca. Es necesario dar suficiente tiempo (5-30 min) para permitir que el alcohol difunda a través del agar antes de registrar los resultados.
- Reportar la estimación de la cifra de bacterias que hidrolizan al almidón. Sensibilidad mínima de detección del recuento por extensión de superficie es de 100,0 UFC/g o 10,0 UFC/mL.
- La sensibilidad se puede aumentar, si se inoculan 3 cajas con 0,3 mL, 0,3 mL y 0,4 mL de la primera dilución, por lo tanto la sensibilidad mínima de detección será de 10,0 UFC/g o 1,0 UFC/mL.

## **BIBLIOGRAFIA**

Laboratory Manual for Food Canners and Processors. Vol. 1. Microbiology and Processing. The Avi Publishing Company, Inc. 1968.

Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas color. Koneman, Elmer, W. Editorial Médica Panamericana. 1983.

## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

### **Almidón al 1%, medio basal, agar**

Peptona de carne	5,0 g
extracto de carne	3,0 g
agar bacteriológico	15,0 g
los 3 ingredientes anteriores constituyen la formulación del agar nutritivo,	
almidón soluble, de preferencia de papa	10,0 g
agua destilada	1,0 L.

Disolver los ingredientes en agua destilada con calentamiento suave. Ajustar a pH de 7,0, y esterilizar a 121°C durante 15 min.



## **Detección de *Leuconostoc mesenteroides* en alimentos.**

### **OBJETIVOS**

- Conocer los microorganismos osmofílicos de importancia dentro de los alimentos.
- Determinar la presencia de *Leuconostoc mesenteroides* en alimentos.
- Conocer la importancia económica e industrial de este microorganismo dentro de la industria alimentaria.

### **GENERALIDADES**

*Leuconostoc mesenteroides* es un estreptococo láctico heterofermentativo osmofílico, esto significa que es capaz de crecer en concentraciones de sacarosa iguales o mayores al 10%.

Tiene gran tolerancia para desarrollarse en concentraciones azucaradas de hasta 55 a 60%, lo que permite su desarrollo en jarabes, caramelo líquido, crema de helado, etc. Produce gran cantidad de mucílago en medios que contienen sacarosa, esto es deseable cuando es necesaria la producción de dextrano (polisacárido gomoso), sin embargo, en otros casos representa un contratiempo, sobre todo en la elaboración u obtención de alimentos ricos en este disacárido, como por ejemplo en la extracción de azúcar a partir de caña o remolacha azucarera.

Para efectuar la detección de este microorganismo se efectúa un enriquecimiento utilizando un medio de crecimiento que contenga altas concentraciones de sacarosa (10%). Posteriormente se aísla en un medio sólido selectivo con concentraciones similares del carbohidrato. *L. mesenteroides* forma colonias características convexas, translúcidas, mucosas por la producción de dextranas que se asemejan a gotas de agua y se le identifica posteriormente con una observación microscópica, ya sea por tinción de Gram (diplococo capsulado Gram +) o bien de cápsula.

El hábitat de esta especie bacteriana lo constituyen las superficies de vegetales, frutas, soluciones azucaradas, la leche y productos lácteos.

El *Leuconostoc mesenteroides* participa en la primer etapa de las fermentaciones lácticas, contribuyendo en la producción de ácido láctico hasta una concentración que va de 0.7 al 1%, además de otras sustancias tales como, ácido acético, etanol, manitol y dióxido de carbono, que en conjunto le proporcionan un sabor y aroma característico al producto fermentado. Además existen ciertos biotipos que presentan metabolismo aerobio oxidativo y que producen dióxido de carbono y ésteres del ácido láctico y acético.

El dextrano tiene amplia utilización como estabilizador en jarabes, helados o productos de pastelería.

## **FUNDAMENTO**

El método de prueba para recuperación de bacterias mucogénicas, consiste en realizar un pre enriquecimiento, para posteriormente recuperarlos a través de aislamiento y reconocimiento de características morfológicas en placas con el sustrato metabolizable.

## **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

- 1 Matraz Erlenmeyer de 250,0 mL de capacidad, conteniendo 90,0 mL de caldo nutritivo<sup>a</sup>.
- 1 Caja de Petri con agar nutritivo adicionado de 10% de sacarosa<sup>b</sup>.

## **SOLUCIONES, REACTIVOS E INDICADORES**

- Reactivos para la tinción de Gram<sup>b</sup>.
- Tinta china<sup>b</sup>.

## **MATERIAL Y EQUIPO**

- Balanza granataria<sup>a</sup>.
- caja de Petri estéril<sup>a</sup>.
- 1 cuchara estéril<sup>a</sup>.
- Mechero<sup>a</sup>.
- Incubadora a 28 °C con termostato calibrado que evite variaciones mayores a  $\pm 0,2$  °C
- Microscopio óptico<sup>b</sup>.
- Cuenta colonias<sup>b</sup>.
- Asa bacteriológica<sup>b</sup>.
- Portaobjetos<sup>b</sup>.

## **NOTAS:**

<sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.

<sup>b</sup> Material necesario a las 48 h de iniciada la práctica.

## PROCEDIMIENTO

- Pesar 10,0 g de muestra (azúcar blanca, morena, mascabado, piloncillo, etc.) en área aséptica.
- Verter la muestra en un matraz Erlenmeyer que contiene 90,0 mL de caldo nutritivo.
- Incubar  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.
- Después de incubar, realizar observaciones microscópicas de la muestra inoculada (tinción de Gram y tinción de cápsula) y observar la consistencia del medio (viscosidad).
- Aislar, estriando por agotamiento en el agar nutritivo que contiene 10 % de sacarosa.
- Incubar  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 y 48 horas.
- Realizar observaciones macroscópicas (características coloniales) y microscópicas (tinción de Gram y tinción de cápsula).
- Reportar presencia o ausencia de *Leuconostoc mesenteroides* en la muestra analizada.

## BIBLIOGRAFÍA

Jay, J.M. (1987). **Microbiología moderna de los alimentos**. Acribia. España.

## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

### Nutritivo más 10% de sacarosa, agar

Peptona de gelatina	5,0 g
Extracto de carne de res	3,0 g
Agar bacteriológico	15,0 g
Sacarosa	100,0 g
pH <sup>25°C</sup> 7,0	

Suspender los ingredientes del medio en 1,0 L de agua destilada. Humectar los ingredientes unos 15 minutos, mezclar con la sacarosa y calentar a ebullición de 1 a 2 minutos hasta disolver el producto. Distribuir en cajas o tubos y esterilizar a 121 °C, 15 lb de presión, durante 15 minutos.

#### Principio de acción

La peptona es fuente de carbono y nitrógeno. El extracto de carne de res es fuente de elementos traza, vitaminas y amino ácidos. La sacarosa es fuente de carbohidratos que proporciona carbono. El agar bacteriológico es el agente solidificante.

## **Esporas totales y termorresistentes (80 °C y 100 °C).**

### **OBJETIVO**

- Conocer el método microbiológico para estimar la presencia de esporas totales (80°C) aerobias y anaerobias, así como, esporas termorresistentes (100°C) aerobias y anaerobias en productos alimenticios tanto en materia prima como en producto terminado, mediante esporulación de las muestras y cuenta en placa.

### **GENERALIDADES**

Las esporas del género *Bacillus*, comúnmente se encuentran en la leche cruda. Sobreviven al proceso de pasteurización y pueden sobrevivir en productos que reciben tratamiento térmico aún más severo. En la leche pasteurizada existen problemas ocasionados por el desarrollo de esporas formadoras de colonias que incluyen defectos tales como la proteólisis ácida, provocada por el desarrollo de *Bacillus cereus*, y en leche evaporada enlatada la coagulación provocada por *Bacillus subtilis* y *Bacillus coagulans*.

Dentro de la morfología y estructura de las bacterias, las esporas son formaciones intracelulares u ovals. La génesis de las esporas, es uno de los estadios en el ciclo de desarrollo de ciertos microorganismos que se ha dado en respuesta al proceso evolutivo en la lucha por la conservación de la especie. La capacidad de esporogénesis la poseen algunos microorganismos, preferentemente del tipo bastonado (bacilos y clostridios) tales como los agentes de la pústula maligna, del tétanos, de la infección gaseosa anaerobia, del botulismo y algunas especies saprofitas que viven en el terreno, en agua y en el organismo de los animales.

La formación de esporas tiene lugar en el medio externo (en el terreno y en los medios de cultivo) y no se observa en los tejidos del cuerpo humano o de los animales.

El proceso de esporogénesis se desarrolla consecutivamente en cuatro estadios:

- 1) Estadio preparatorio
- 2) Estadio de pre-esporas
- 3) Estadio de la formación de la envoltura.
- 4) Estadio de la maduración.

Cuando los bacilos se encuentran en un medio determinado, sobre todo en condiciones desfavorables, se operan en ellos ciertas modificaciones estructurales. En uno de los segmentos de la célula, el citoplasma se condensa, formándose la pre-espora que se

ubre después de una envoltura densa, multiestratificada poco permeable, mientras que el resto de la célula termina por sucumbir. En lugar de la forma vegetativa, se genera una espora madura que representa aproximadamente la décima parte de la célula materna, concluyendo todo el proceso de formación de la espora en un periodo de 18-20 horas.

Las esporas se caracterizan por presentar una gran refringencia a la luz y al observarlas al microscopio sin teñir, ofrecen el aspecto de granos brillantes que toman con dificultad los colorantes. Las esporas presentan una gran resistencia a la acción de los factores del medio circundante y pueden conservarse durante un periodo prolongado (de años) en condiciones desfavorables, debido a que poseen una envoltura compacta, formada por multitud de capas, de estructura laminar, una cantidad mínima de agua libre y una elevada proporción de calcio y de lípidos.

Las esporas de algunos bacilos son resistentes a la ebullición y a la influencia de concentraciones elevadas de sustancias desinfectantes, muriendo en el autoclave bajo la acción del vapor de agua saturado, a temperaturas de 115 - 125 °C, y en el horno seco de 150 - 170 °C.

Las esporas cuando se encuentran en condiciones favorables, se desarrollan y se vuelven a transformar en formas vegetativas. Bajo estas condiciones, las esporas se hinchan, aumentan de tamaño, se incrementa su contenido de agua y se intensifican sus procesos metabólicos.

Desde la envoltura de la espora, en su centro o entre los polos y el centro, aparece una prominencia que va creciendo hasta convertirse en un bastoncillo. Generalmente, el desarrollo de este último, se efectúa más rápidamente que la formación de la espora ( en el curso de 4 a 5 horas. )

Según la localización en el cuerpo de los bacilos y clostridios, las esporas pueden ser; centrales, situadas en el centro de la célula; terminales, situadas en el extremo del bacilo y subterminales, situadas cerca del extremo.

La esporogénesis no es una función reproductora en los bacilos y dicha capacidad para formar esporas es empleada en la clasificación de los microorganismos, pudiendo llegar a perderse si se hacen resiembras frecuentes en medios de cultivo o cultivándose a temperaturas elevadas.

Debido a su importancia en los procesos de esterilización, la resistencia al calor de las esporas es la propiedad que mayor atención ha recibido, sin embargo, el principal papel ecológico de las esporas consiste en su capacidad de sobrevivencia en estado de sequedad.

Por su resistencia al calor, la mayoría de los microorganismos esporulados son termofílicos y termodúricos.

Se califican de termodúricos, aquellos microorganismos que sobreviven en un alimento después de ser sometidos a tratamientos térmicos moderadamente elevados con el propósito de destruir los gérmenes patógenos que pudieran contener y prolongar su capacidad de auto-conservación.

Los organismos termofílicos tienden a comportarse como termodúricos, aunque la mayoría de estos últimos son incapaces de proliferar a temperaturas de 55 °C o mayores.

A pesar de que el carácter de termodúrico se encuentra muy constante en las especies de bacterias esporuladas, es posible encontrar cepas termorresistentes en bacterias no esporuladas.

El método para determinar la presencia de esporas totales (80°C) y termorresistentes (100 °C) se basa en la capacidad de generar esporas bajo ciertas condiciones de los géneros *Bacillus*, *Clostridium* y *Sporolactobacillus*.

El principio de esta técnica analítica se basa en efectuar la determinación de:

- a) Esporas totales. Inocular diluciones decimales de la muestra esporulada a 80°C/12 min en agar triptona extracto de levadura adicionando de 2,3,5 trifenil-tetrazolio (TTC), seguido por incubación aeróbica o anaeróbica a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $55 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- b) Esporas termorresistentes. Inocular diluciones decimales de la muestra esporulada a 100 °C/10 min en agar triptona extracto de levadura adicionado de TTC, seguido de incubación aeróbica o anaeróbica a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $55 \pm 1^\circ\text{C}$ .

## FUNDAMENTO

El método de prueba para recuperación de microorganismos esporulados, consiste en realizar un tratamiento térmico severo del alimento o su dilución, tras el cual se propicia la liberación de las estructuras de resistencia mediante la aplicación de un choque térmico a baja temperatura. Posteriormente utilizando el método de vertido en placa, con la adición de trifenil de tetrazolio al medio de cultivo utilizado, incubación durante el tiempo, condiciones de presencia/ausencia de oxígeno y temperatura, se logra obtener la estimación de la cifra para cada grupo de esporas analizado.

## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

Los reactivos que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico.

Cuando se indique agua, debe entenderse agua destilada.

- 2 Matraces Erlenmeyer con capacidad de 250,0 mL con tapón de baquelita conteniendo 90,0 mL de solución diluyente de fosfatos o agua peptonada al 0,1% pH 7<sup>a</sup>.
- 6 tubos de 16 x 150 mm conteniendo 9,0 mL de solución diluyente de fosfatos o agua peptonada al 0,1% pH 7<sup>a</sup>.
- 32 tubos de 22x175 mm conteniendo 18,0 mL de agar cuenta estándar o 1 matraz Erlenmeyer de 500,0 mL de capacidad conteniendo 300,0 mL de agar cuenta

estándar. Preparar de acuerdo a las instrucciones del marbete. Esterilizar a 121 °C/15 min. enfriar y mantener a  $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$  en baño María hasta su utilización. Antes de utilizarlo, adicionar 1,0 mL de TTC/100,0 mL de medio esterilizado por filtración<sup>a</sup>.

- Solución acuosa de TTC (2,3,5 trifeníl-tetrazolio) al 0,3 % esterilizada por filtración<sup>a</sup>.

**NOTA:** \* El número de tubos requeridos para efectuar diluciones, así como de agar cuenta estándar, estará determinado por la experiencia que se tenga sobre la muestra. Si no se cuenta con información alguna, preparar placas con diluciones de la 1 a la 4 ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ ).

## MATERIAL Y EQUIPO

- Equipo usual en los laboratorios de microbiología<sup>a, b</sup>.
- Baño de agua control de temperatura de  $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ <sup>a</sup>.
- Incubadora a 37 °C con termostato que evite variaciones mayores de  $\pm 2^{\text{a, b, c}}$ .
- Incubadora a 55 °C con termostato que evite variaciones mayores de  $\pm 2^{\text{a, b}}$ .
- Contador de colonias<sup>b, c</sup>.
- Termómetros<sup>a</sup>.
- Frascos y tubos de ensayo<sup>a</sup>.
- Pipetas graduadas de 1,0, 5,0 y 10,0 mL<sup>a</sup>.
- Cajas de Petri<sup>a</sup>.
- Espátulas, cucharas, etc. para manipular la muestra<sup>a</sup>.

## NOTAS:

- <sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.
- <sup>b</sup> Material necesario a las 24 horas de iniciada la práctica.
- <sup>c</sup> Material necesario a las 48 horas de iniciada la práctica.

## PROCEDIMIENTO

### A) Vaciado en placa.

#### Para polvos:

Pesar 10,0 g de muestra en condiciones de asepsia y colocar en un frasco de dilución conteniendo 90,0 mL de diluyente estéril. Homogeneizar de tal manera que se hidrate todo el polvo y se disuelva la mayor parte.



### **Para muestras líquidas:**

Verter en condiciones de asepsia 10,0 mL de la muestra bien mezclada en un tubo de ensayo estéril con tapón de rosca.

#### **A.1. Esporas totales.**

1. Colocar un frasco o tubo de cada muestra en un baño de agua a 80°C. Para registrar la temperatura, colocar un frasco o tubo con el mismo volumen de agua con un termómetro dentro y un tapón de algodón en un baño María. Una vez alcanzada la temperatura deseada (80°C), esperar 10 minutos.
2. Después de los 10 minutos colocar el frasco o tubo en un baño de agua tibia durante un minuto, inmediatamente pasarlo a un baño de agua fría.
3. Hacer las diluciones convenientes.
4. Inocular 4 series de cajas con 1,0 mL por cada dilución en 16 cajas, vaciar de 18,0-20,0 mL de medio de cultivo fundido y atemperado, (a cada 100,0 mL agar cuenta estándar adicionar 1,0 mL de TTC y mezclar), homogeneizar el medio con la muestra y dejar solidificar. En este momento se cuenta con 4 series de 4 placas con diluciones de la  $10^{-1}$  a la  $10^{-4}$  cada una.
5. Incubar las 4 series de placas, una a 37°C y otra a 55 °C, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.
6. Contar las colonias que se hayan desarrollado, incluir las placas que muestren un crecimiento entre 30 y 300 colonias.

#### **A.2. Esporas Termorresistentes:**

1. Colocar el frasco o tubo (cubiertos con parafilm o papel parafinado para evitar que la muestra se derrame) en el autoclave u olla de presión cerrada correctamente, encenderla hasta alcanzar una temperatura de 100 °C durante 10 minutos o en un baño de aceite a 100 °C.
2. Después de transcurridos los 10 minutos, proseguir como en el caso de esporas totales.

## **INFORME DE RESULTADOS**

Reportar como:

- Esporas totales mesofílicas aerobias / g o mL
- Esporas totales termofílicas aerobias / g o mL
- Esporas totales mesofílicas anaerobias / g o mL
- Esporas totales termofílicas anaerobias / g o mL
- Esporas termorresistentes mesofílicas aerobias /g o mL
- Esporas termorresistentes mesofílicas anaerobias / g mL
- Esporas termorresistentes termofílicas aerobias / g o mL
- Esporas termorresistentes termofílicas anaerobias / g o mL
- Esporas /g ó mL = Número de colonias por el inverso de la dilución.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Association of Official Analytical Chemist. (1995). **Official Methods of Analysis**, 16 th ed. AOAC. Arlington, VA.

Marshall, R. T. (1992). **Standard Methods for the examination of Dairy Products**. American Public Health Association. Copyright, Washington, D. C.

Vanderzant, C. (Editores). (1992). **Compendium of Methods for the microbiological examination of foods**. American Public Health Association. Copyright, Washington, D. C. pag. 265-323.

## **Esporas sulfatorreductoras en alimentos.**

### **OBJETIVO**

- Determinar la presencia de esporas sulfatorreductoras, cuyo representante es, *Desulfotomaculum nigrificans* en los alimentos

### **GENERALIDADES**

La alteración sulfhídrica es causada por una bacteria termófila facultativa, reductora del sulfato que se denominó *Clostridium nigrificans* y en la octava edición del manual Bergey aparece como una nueva denominación *Desulfotomaculum nigrificans*.

Este microorganismo se encuentra en la tierra, aguas termales, azúcar, almidones, arroz, etc., y produce la degradación sulfhídrica de vegetales enlatados, entre ellos el maíz dulce, en donde las latas alteradas no muestran deformación pero al abrirlas se observa el contenido de color negro y la producción de H<sub>2</sub>S que imparte olor desagradable al producto. En chícharos, maíz y hongos enlatados se presenta un líquido azul grisáceo con numerosos granos oscuros flotando, el ennegrecimiento se debe a la reacción del hierro con la formación de H<sub>2</sub>S dando sulfuro ferroso. Los productos ácidos no se involucran en este tipo de alteración. El microorganismo no es sacarolítico, es ligeramente proteolítico y la cisteína la degrada originando H<sub>2</sub>S.

La temperatura máxima de crecimiento es de 65 a 70°C, dependiendo de la cepa, con un mínimo de 30 a 31°C y un óptimo de 55°C. El pH óptimo para su crecimiento oscila entre 7,2 a 7,4 y no crece a pH de 5,8 ó 7,6

Las esporas de este microorganismo sobreviven a 100°C durante 8 h a pH 7,0 y se ha reportado que en productos de maíz procesados a 118°C durante 70 minutos han sobrevivido con la alteración posterior del producto.

### **FUNDAMENTO**

Esporular una solución del alimento en agua y repartir en agar sulfito ferroso, enfriar rápidamente para efectos de la esporulación, incubar a 55°C y contar colonias negras (sulfatorreductoras).

### **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

- 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, conteniendo 100,0 mL de agua estéril<sup>a</sup>

- 6 tubos de 22 x 175 mm con tapón de rosca, conteniendo 10,0 mL de agar sulfito de hierro<sup>a</sup>, (para muestras de almidón, harina, azúcar).
- 2 tubos de 22 x 175 mm con tapón de rosca, conteniendo 10,0 mL de agar sulfito de hierro<sup>a</sup>, (para muestras de leche en polvo).
- 10 tubos de 22 x 175 mm con tapón de rosca, conteniendo 10,0 mL de agar sulfito de hierro<sup>a</sup>, (para muestras de crema y aislados de proteína de soya).

## **SOLUCIONES, REACTIVOS E INDICADORES**

- solución de hidróxido de sodio 0,02N<sup>a</sup>, (para muestras de leche en polvo)
- 2,0 g de goma tragacanto <sup>a</sup>, (para muestras de crema y aislados de proteína de soya)
- 1,0 g de goma arábica <sup>a</sup>, (para muestras de crema y aislados de proteína de soya)
- Vaspar <sup>a</sup>, (mezcla de vaselina-parafina en proporción 1:1, para muestras de crema y aislados de proteína de soya)

•

## **MATERIAL Y EQUIPO**

- 1 matraz Erlenmeyer de 250,0 mL de capacidad con tapón de rosca estéril<sup>a</sup>.
- Pipetas de 5,0 ó 10,0 mL<sup>a</sup>
- Mechero de Bunsen, tripié y charola para calentamiento<sup>a</sup>.
- 1 vaso de precipitados con capacidad de 400,0 mL<sup>a</sup>.
- Stomacher<sup>a</sup>
- Bolsa para stomacher<sup>a</sup>
- Incubadora de 55 °C con termostato que evite variaciones mayores de  $\pm 2^{\text{a,b}}$ .
- Baño de agua<sup>a</sup>.
- Cuentacolonias<sup>b</sup>

## **NOTAS:**

<sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.

<sup>b</sup> Material necesario a las 48 horas de iniciada la práctica.

## **PROCEDIMIENTO**

### Almidón y Harina

- Pesar 20,0 g de harina, almidón o azúcar en condiciones de asepsia.
- Adicionar la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250,0 mL y añadir 100,0 mL de agua estéril, agitar hasta obtener una suspensión homogénea libre de grumos.

- Dividir 20,0 mL de la muestra en 6 tubos colocando alícuotas de 3,3 mL por tubo conteniendo 10,0 mL de agar sulfito de hierro.
- Calentar a ebullición durante 15 min en baño de agua. Agitar los tubos varias veces antes y durante los 15 minutos de calentamiento.
- Después del calentamiento enfriar rápidamente los tubos en agua fría corriente.
- Precalentar los tubos a 50-55 °C e incubar a esta temperatura por 24-48 hrs.
- Recuento: las colonias de *D. nigrificans* aparecerán como esferas de color negro. Contar el total de colonias en los 6 tubos y multiplicar por 2,5. Reportar como número de esporas por 10,0 g de muestra.
- Los tubos que contengan numerosas colonias de *D. nigrificans* pueden ennegrecer completamente el medio después de 48 h de incubación por lo que se debe hacer un recuento preliminar a las 24 h.

#### Azúcar

- Pesar 20,0 g azúcar en condiciones de asepsia.
- Adicionar la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250,0 mL y añadir 100,0 mL de agua estéril, agitar hasta obtener una suspensión homogénea.
- Calentar a ebullición durante 5 min en baño de agua. Reemplazar el líquido evaporado con agua estéril.
- Después del calentamiento enfriar rápidamente el matraz en agua fría corriente.
- Dividir 20,0 mL de la solución calentada entre 6 tubos con tapón de rosca que contengan aproximadamente 10,0 mL de agar sulfito de hierro.
- Realizar la inoculación en medios recién preparados, solidificar rápidamente colocando los tubos en agua fría.
- Precalentar los tubos a 50-55°C e incubar a esta temperatura por 24-48 hrs.
- Recuento: las colonias de *D. nigrificans* aparecerán como esferas de color negro. Contar el total de colonias en los 6 tubos y multiplicar por 2,5. Reportar como número de esporas por 10,0 g de muestra.
- Los tubos que contengan numerosas colonias de *D. nigrificans* pueden ennegrecer completamente el medio después de 48 h de incubación por lo que se debe hacer un recuento preliminar a las 24 h.

#### Leche en polvo sin grasa

- Pesar 10,0 g de muestra en un matraz Erlenmeyer marcado en 100,0 mL.
- Añadir una solución de hidróxido de sodio 0,02N hasta el aforo de 100,0 mL y agitar hasta disolución completa.
- Calentar 10 min a 5 lb de presión. Enfriar inmediatamente.
- Transferir 2,0 mL de la solución caliente a 2 tubos con agar sulfito de hierro recién preparado o previamente desoxigenado.
- Agitar varias veces y solidificar rápidamente colocando los tubos en agua fría.
- Precalentar los tubos a 50-55°C e incubar a la misma temperatura por 24-48 h

- Recuento: las colonias de *D. nigrificans* aparecerán como esferas de color negro. Contar el total de colonias en los 2 tubos y multiplicar por 2,0. Reportar como número de esporas por 10,0 g de muestra.
- Los tubos que contengan numerosas colonias de *D. nigrificans* pueden ennegrecer completamente el medio después de 48 h de incubación por lo que se debe hacer un recuento preliminar a las 24 h.

#### Crema.

- Mezclar 2,0 g de goma tragacanto y 1,0 g de goma arábica en 100,0 mL de agua en un matraz Erlenmeyer.
- Esterilizar en autoclave durante 20 min a 121°C.
- Transferir 20,0 mL de la muestra a un matraz marcado con 100,0 mL.
- Añadir la mezcla de goma esterilizada al matraz conteniendo la muestra a analizar y agitar cuidadosamente, utilizando un agitador con goma estéril.
- Retirar el agitador y esterilizar durante 5 min a 5-psi de presión.
- Añadir 1,0 mL de la suspensión a cada uno de 10 tubos que contengan agar sulfito de hierro fundido.
- Calentar los tubos inmediatamente antes de la inoculación para eliminar el oxígeno.
- Después de inocular, los tubos se mezclan, y solidifican en un baño con hielo. Colocar Vaspar como sobrenadante y precalentar a 55°C.
- Incubar los tubos por 14 días a 55°C.
- Contar colonias esféricas color negro en los 10 tubos y reportar como el número de esporas/g.
- Preliminarmente efectuar cuentas a las 48 h 7 días y 14 días en caso de que los tubos se tornen rápidamente negros.

#### Aislados de proteína de soya

- Preparar una suspensión al 10% de aislado de proteína de soya en agua peptonada al 0,1% en frascos de dilución.
- Ajustar el pH a  $7.0 \pm 0.1$ .
- Colocar en autoclave (aproximadamente 5 lb de presión) durante 20 min.
- Añadir 1,0 mL de la suspensión a cada uno de 10 tubos que contengan agar sulfito de hierro fundido.
- Calentar los tubos inmediatamente antes de la inoculación para eliminar el oxígeno.
- Después de inocular, los tubos se mezclan, y solidifican en un baño con hielo. Colocar Vaspar como sobrenadante y precalentar a 55°C.
- Incubar los tubos por 14 días a 55°C.
- Contar colonias esféricas color negro en los 10 tubos y reportar como el número de esporas/g.
- Preliminarmente efectuar cuentas a las 48 h 7 días y 14 días en caso de que los tubos se tornen rápidamente negros.

## **CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS**

La utilización de un valor para esporas sulfatorreductoras solo sería aplicable en ingredientes utilizados para la fabricación de enlatados de acidez baja.

Las esporas productoras de ácido sulfhídrico no deberán estar presentes en más de (40%) de 5 muestras probadas y ninguna muestra presentará más de 5 esporas /10,0 g. Esto equivaldrá a un total de 2 colonias en los tubos inoculados.

Reportar el número de esporas productoras de H<sub>2</sub>S contenidas en la muestra estudiada.

## **BIBLIOGRAFIA**

Carl Vanderzant & Don F. Splittstoesser. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association. 3era. Ed. Copyright 1992.

## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

### Sulfito de hierro, agar

Digerido pancreático de caseína	10,0 g
Sulfito de sodio	1,0 g
Agar bacteriológico	20,0 g
Solución de sulfato ferroso al 7% o bien, un clavo limpio, o bien, solución de citrato férrico al 5,0%.	
pH <sup>25°C</sup> 6,9 ± 1	

Suspender 31,0 g del polvo en 1,0 L de agua destilada. Mezclar hasta homogeneizar. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto hasta disolver por completo el polvo. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Cuando el medio se encuentre aproximadamente a 50°C, añadir 20 mL de una solución de sulfato ferroso al 7%, mezclar y verter en los recipientes adecuados.

La solución de sulfato ferroso al 7% se puede sustituir por un clavo limpio en ácido clorhídrico y enjuagado muy bien para remover cualquier tipo de oxidación presente antes de colocarse en los recipientes adecuados. Suspender 31,0 g del polvo en 1,0 L de agua destilada, calentar hasta ebullición y distribuir en tubos, colocando el clavo limpio en cada uno de ellos. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos

También se puede sustituir el sulfato ferroso o el clavo, añadiendo 10 mL de una solución de citrato férrico al 5,0%.

### Principio de acción

Las peptonas son fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El sulfito de sodio cuando se reduce libera ácido sulfhídrico.

El clavo, sulfato ferroso o citrato férrico reaccionan con el ácido sulfhídrico para formar la sal negra de sulfuro ferroso. Las condiciones anaeróbicas se propician mediante la reacción de cualquier oxígeno disuelto del medio con el hierro. El agar es el agente solidificante.



## Detección de *Alicyclobacillus* spp.

### OBJETIVO

- Determinar la presencia de *Alicyclobacillus* spp. en jugos de frutas sometidos a tratamiento térmico.

### GENERALIDADES

El género *Alicyclobacillus* pertenece a un grupo de bacterias termofílicas con forma de bacilo, Gram positivas, aerobias estrictas, que pueden aislarse de una gran variedad de jugos de fruta ácidos. Las esporas son muy resistentes a la temperatura y pueden sobrevivir a las condiciones usuales de pasteurización en la industria de jugos. Los microorganismos del género no crecen bien a temperaturas inferiores de 20°C y crecen en un intervalo de pH de 2 a 7, mientras que las esporas germinan en un pH de entre 3 y 4.

El primer *Alicyclobacillus* spp. se aisló en 1982, y se pensó que estaba únicamente confinado a ambientes termofílicos y ácidos. Dos años después, otra especie de *Alicyclobacillus* spp.; *A. acidoterrestris*, se identificó como el agente causal de la alteración en jugo de manzana pasteurizado. Estudios posteriores rápidamente encontraron que el *Alicyclobacillus* spp. es una bacteria ubicua del suelo y no requiere de condiciones estrictas termofílicas ni ácidas. *Alicyclobacillus* spp. posee varias características distintivas; la principal es su habilidad para sobrevivir procesos comerciales de pasteurización y producir sabores indeseables en jugos de frutas. La industria de jugos de frutas reconoce a *Alicyclobacillus* spp., como el principal microorganismo de control de calidad. Se ha identificado al guayacol y a los halofenoles como los responsables de la alteración y provocar el mal sabor y olor medicinal. A pesar de que la vía de formación de este mal sabor aún no ha sido identificado, las investigaciones coinciden en que la presencia de *Alicyclobacillus* spp. en el medio, es el principal factor para su formación. Se han desarrollado muchos métodos y medios de aislamiento en estas dos últimas décadas. Sin embargo, la mayoría de estos métodos se desarrollaron específicamente para detectar a *A. acidoterrestris* debido a que fue la primer especie identificada como productora del mal sabor. Sin embargo, estudios recientes indican, que otras especies de *Alicyclobacillus* también producen guayacol o compuestos halofenólicos. Por lo tanto, se deben monitorear todas las especies de *Alicyclobacillus* como potenciales bacterias de alteración en jugos de frutas que se conserven a temperatura ambiente.

La alteración provocada por *Alicyclobacillus* en productos a base de jugos de fruta, repercute en grandes pérdidas económicas anuales. Además, la contaminación por *Alicyclobacillus* se está convirtiendo en un problema cada vez más frecuente en, endulzantes naturales y artificiales (ejemplo, azúcares y miel de maíz).

Por lo tanto, la detección oportuna de *Alicyclobacillus* en materia prima y producto terminado que se conserve a temperatura ambiente, es de gran valor en el control de calidad microbiológico.

## FUNDAMENTO

El método de prueba para recuperación de *Alicyclobacillus*, consiste en realizar un tratamiento térmico del alimento o su dilución, tras el cual se propicia la liberación de las estructuras de resistencia mediante la aplicación de un choque térmico a baja temperatura. Posteriormente utilizando el método de extensión de superficie en el medio de cultivo seleccionado, incubación durante el tiempo, condiciones y temperatura, se logra obtener la estimación de la cifra de esporas de *Alicyclobacillus*.

## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

- 2 tubos de 16 x 150 mm conteniendo 9,0 mL de solución diluyente de fosfatos o agua peptonada al 0,1% pH 7<sup>a</sup>.
- 6 placas de Petri conteniendo 18,0 mL de medio YSG<sup>a</sup>. (medios de cultivo alternos: agar BAT, agar suero de naranja, agar PDA)

## MATERIAL Y EQUIPO

- 1 tubo de ensayo de 22 x 175 con tapón de rosca estéril<sup>a</sup>.
- Pipetas de 5,0 ó 10,0 mL<sup>a</sup>
- Mechero de Bunsen, tripié y charola para calentamiento<sup>a</sup>.
- Stomacher<sup>a</sup>
- Bolsa para stomacher<sup>a</sup>
- Incubadora de 45 °C con termostato que evite variaciones mayores de  $\pm 2^{a,b}$ .
- Baño de agua con control de temperatura de  $45 \pm 1$  °C<sup>a</sup>.
- Contador de colonias<sup>b, c</sup>.
- Termómetros<sup>a</sup>.
- Espátulas, cucharas, etc. para manipular la muestra<sup>a</sup>.

## NOTAS:

<sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.

<sup>b</sup> Material necesario a los 7 días de iniciada la práctica.

## PROCEDIMIENTO

1. Colocar en un frasco o tubo, la muestra o su dilución en un baño de agua a 70°C. Para registrar la temperatura, colocar un frasco o tubo con el mismo volumen de agua con un termómetro dentro y un tapón de algodón en un baño María. Una vez alcanzada la temperatura deseada (70°C), esperar 20 minutos.
2. Para muestras pasteurizadas y refrigeradas: después de los 20 minutos colocar el frasco en un baño de agua tibia durante un minuto, inmediatamente pasarlo a un baño de agua fría. Nota: para análisis de muestras recién sometidas al proceso de pasteurización, no es necesario realizar un choque térmico.
3. Hacer las diluciones convenientes.
4. Inocular 2 series de cajas con 0,1 mL por cada dilución utilizando el método de extensión en superficie, en 6 cajas con medio YSG (extracto-almidón-glucosa). Nota: Si no se cuenta con el medio YSG, se pueden utilizar placas de agar BAT pH 4,0, PDA acidificado a 3,7; agar suero de naranja pH 5,5; ó agar K.
5. Incubar la serie de placas, a 45 °C durante 7 días. Nota: ciertos autores recomiendan incubar a 55 °C
6. Contar las colonias que se hayan desarrollado y considerarlas como *Alicyclobacillus*, incluir las placas que muestren un crecimiento entre 30 y 300 colonias. Para caracterización de las colonias, realizar pruebas bioquímicas.

NOTA: Se puede utilizar el método de filtración por membrana en lugar de la siembra por extensión de superficie.

## INFORME DE RESULTADOS

Reportar como:

- Esporas de *Alicyclobacillus* spp. / g o mL.

## BIBLIOGRAFÍA

Akira, Y., Tateo, F., Keiichi, G. (2007) *Alicyclobacillus*: Thermophilic Acidophilic Bacilli (Google books results). Springer.

Murray, M. B.; Gurtler, J. B.; Ryu, J.; Harrison, M. A.; Beuchat, L. R. (2006). Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. Elsevier, Amsterdam, Copyright.

Letters in Applied Microbiology. Volume 45 Issue 2, Pages 224 – 229.  
Published Online: 21 Jun 2007. Journal compilation © 2008 The Society for Applied Microbiology

## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

**YSG, agar.** pH 3,7 ± 1 ajustado con ácido sulfúrico 2N

extracto de levadura	2,0 g
glucosa	1,0 g
almidón soluble	2,0 g
agar	15,0 g
agua	1,0 L

Suspender 20,0 g del polvo en 1,0 L de agua. Mezclar para homogeneizar. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto hasta disolución completa. Esterilizar a 121 °C durante 15 min. Ajustar el pH a 3,7 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N estéril, después de esterilizar.

**Suero de naranja, agar.** Medio de cultivo propuesto para el aislamiento, cultivo y enumeración de microorganismos de alteración ácido tolerantes, en jugos de frutas y concentrados de jugos de frutas, especialmente frutas cítricas.

Peptone de caseína	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de naranja	5,0 g
glucosa	4,0 g
fosfato de potásico dibásico	3,0 g
agar	17,0 g
agua	1,0 L

Suspender 42,0 g/L, esterilizar en condiciones suaves durante 15 min a 115 °C. No sobrecalentar. Verter las placas. pH 5,5 ± 0,2 a 25 °C.

Principio de acción

El medio de cultivo está adaptado para cubrir los requerimientos de la microbiota presente en jugos de frutas, (ejemplo, especies de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* hongos, etc.) debido a que contiene extracto de naranja.

**BAT, agar**

extracto de lavadura	2,0 g
Glucosa	5,0 g
Cloruro de calcio	0,25 g

(NOTA: El medio de cultivo incluye adicionalmente en la mezcla de minerales otra cantidad traza de cloruro de calcio)

Sulfato de magnesio	0,5g
Sulfato de amonio	0,2 g
Fosfato de potasio monobásico	3,0 g
agar	18,0 g
mezcla de minerales: cloruro de calcio 0.00066 g; sulfato de zinc 0.00018 g; sulfato de cobre 0.00016 g; sulfato de manganeso 0.00015 g; cloruro de cobalto 0.00015 g; ácido bórico 0.00010 g; molibdato de sodio 0.00030 g.	
agua	1,0 L

Suspender 29,0 g/L; el medio de cultivo tiene un pH de  $5,3 \pm 0.2$  de forma espontánea con la finalidad de mantener la fuerza de gelificación. Esterilizar durante 15 min a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ajustar el pH con 1,7 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N estéril a  $4,0 \pm 0.2$  y verter las placas.

Principio de acción.

El agar BAT está propuesto para recuperar y mantener *Alicyclobacillus*. El pH bajo en combinación con la alta temperatura de incubación, inhibe el crecimiento de la microbiota acompañante.

## Investigación de *Pseudomonas aeruginosa*.

### OBJETIVO

- Detectar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en agua y alimentos.

### GENERALIDADES

*Pseudomonas*, es un género predominantemente de alteración. Estos organismos son capaces de provocar alteración debido a dos importantes características. Primero, debido a que son psicotróficos, y por lo tanto se pueden multiplicar a temperaturas de refrigeración. Y segundo, debido a que atacan diversas sustancias en los tejidos (ej. Pescados, mariscos, carnes) para producir compuestos asociados con malos olores y sabores. Dentro de estos compuestos se encuentran; metil mercaptanos, dimetil disulfuros, dimetil trisulfuros, 3-metil-1-butanol, trimetilamina, y etil ésteres de acetato, butirato y hexanoato. Este género se encuentra formando parte de la microbiota natural en productos tropicales y subtropicales, en concentraciones insignificantes del total de la población bacteriana. Sin embargo, debido a que (1) posee un tiempo de generación más corto que otros microorganismos, (2) son microorganismos antagonistas o que presentan reacciones sinérgicas, (3) poseen habilidad para atacar moléculas proteicas largas, y (4) superan la actividad bioquímica; y aunado a que se cometen abusos durante las prácticas de manipulación y/o almacenamiento de los alimentos, son las razones por las cuales este género se convierte en predominantemente de alteración.

### FUNDAMENTO

La presente técnica para la detección de *Pseudomonas aeruginosa* en alimentos, describe un esquema general que consiste en 3 pasos básicos:

- Enriquecimiento, es el paso en donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Pseudomonas* dañadas, logrando de esta manera una condición fisiológica estable.
- Enriquecimiento selectivo, se logra a partir de un medio de cultivo que incrementa la población de *Pseudomonas* y por otro inhibe otros microorganismos presentes en la muestra. Permite el reconocimiento visual característico de colonias sospechosas.
- Identificación bioquímica, este paso permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos falsos sospechosos.

## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

- 1 matraz Erlenmeyer de 250mL de capacidad, conteniendo 90,0 mL de caldo soya tripticaseína<sup>a</sup>
- 2 cajas de Petri con agar cetrimida<sup>a</sup>.
- 1 caja de Agar Pseudomonas P<sup>b</sup>.
- 1 caja de Agar Pseudomonas F<sup>b</sup>.

## SOLUCIONES, REACTIVOS E INDICADORES

- solución de diclorohidrato N-N-p-fenilendiamina al 1,0%<sup>c</sup>.

## NOTAS

- <sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.
- <sup>b</sup> Material necesario a las 48 horas de iniciada la práctica.
- <sup>c</sup> Material necesario a las 72 horas de iniciada la práctica.

## MATERIAL Y EQUIPO

- Mechero de Bunsen<sup>a</sup>.
- Stomacher<sup>a</sup>
- Bolsa para stomacher<sup>a</sup>
- Incubadora de 35 °C con termostato que evite variaciones mayores de  $\pm 2^{\text{a a,b}}$ .
- Baño de agua<sup>a</sup>.
- Asa bacteriológica<sup>b,c</sup>.

## PROCEDIMIENTO

- 1.-Pesar 10,0 g. de muestra en una caja de petri estéril.
- 2.-Transferir la muestra pesada a una bolsa de Stomacher.
- 3.-Adicionar 90,0 ml. de caldo soya tripticaseina.
- 4.-Homogeneizar 30 s. en stomacher a velocidad media.
- 5.-Incubar a 35°C de 24 a 48h.
- 6.-Si se observa crecimiento, tomar una asada y sembrar por estría cruzada en agar cetrimida. Incubar a 35°C por 24-48 h.

Confirmación de *Pseudomonas aeruginosa*



Medio de cultivo: agar cetrimida  
Morfología colonial: colonias verdosas.  
Fluorescencia con luz u.v: verdosa  
Tinción de gram: bacilos gram –

Producción de pigmentos.

Las colonias sospechosas de *Pseudomonas aeruginosa* sembrarlas en los medios:

a) Agar *Pseudomonas* para detección de fluoresceína  
Morfología colonial.- colonias incoloras o amarillo claro  
Fluorescencia con luz u.v: amarillo claro.

b) Agar *Pseudomonas* para detección de piocianina.  
Morfología colonial: colonias generalmente amarillo claro.  
Fluorescencia con luz u.v: azul

Si la morfología colonial es positiva, efectuar la siguiente prueba.

Prueba de la oxidasa.

Impregnar una tira de papel filtro con una solución de diclorohidrato N-N-p-fenilendiamina al 1,0% y colocar sobre ella una pequeña porción de la colonia sospechosa. La prueba será positiva si se desarrolla un color púrpura en 10 s.

Control positivo.- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619

Control negativo.- *Escherichia coli* ATCC 10536

## **BIBLIOGRAFÍA**

USP 28 NF 23 (2005) The Official Compendia of Standards. United States Pharmacopeia. The Standard of Quality.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Novena edición. Sector Salud

## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

### Cetrimida, agar

Digerido pancreático de gelatina	20,0 g
Cloruro de magnesio	1,4 g
Sulfato de potasio	10,0
Cetrimina (bromuro de tetradeciltrimetilamonio)	0,3 g
Agar bacteriológico	13,6 g

Suspender 45,3 g del polvo en 1,0 L de agua destilada que contenga 10,0 mL de glicerol. Mezclar para homogeneizar. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto hasta disolución completa. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

#### Principio de acción

La producción de la piocianina está estimulada por el cloruro de magnesio y el sulfato de potasio. La cetrimida es un compuesto cuaternario de amonio el cual es inhibitorio para una amplia variedad de bacterias incluyendo especies de *Pseudomonas* diferentes a *aeruginosa*.

### *Pseudomonas* F, agar

Digerido pancreático de caseína	10,0 g
Proteosa peptona no. 3	10,0 g
Fosfato dipotásico	1,5 g
Sulfato de magnesio	1,5 g
Agar bacteriológico	15,0 g

Suspender 38,0 g del polvo en 1,0 L de polvo que contenga 10,0 g de glicerol. Mezclar para homogeneizar. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto hasta disolución completa. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

#### Principio de acción

La proporción 1:1 de peptona de caseína y peptona de carne conduce a la producción de fluoresceína. Estas peptonas contienen fósforo, el cual estimula la producción de

fluoresceína. La adición de fosfato dipotásico aumenta el contenido de fósforo del medio y por lo tanto se incrementa la producción de pigmentos fluorescentes. El sulfato de magnesio proporciona iones esenciales para la producción de fluoresceína. El glicerol es fuente de energía que estimula la producción del pigmento.

### **Pseudomonas P, agar**

Digerido pancreático de gelatina	20,0 g
Cloruro de magnesio	1,4 g
Sulfato de potasio	10,0 g
Agar bacteriológico	15,0 g

Suspender 46,4 g del polvo en 1,0 L de polvo que contenga 10,0 g de glicerol. Mezclar para homogeneizar. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto hasta disolución completa. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

### Principio de acción

Contiene digerido enzimático de gelatina que provee de amino ácidos y otras sustancias nitrogenadas esenciales. La peptona de gelatina es degradada a fósforo para minimizar la acción inhibitoria de la producción de la piocianina. Los iones de magnesio, potasio y sulfato promueven la producción de piocianina. El glicerol es fuente de energía que estimula la producción del pigmento.

## **Bacterias lipolíticas.**

### **OBJETIVO**

- Determinar microorganismos lipolíticos que hidrolizan grasas y aceites y que causan alteración en los alimentos.

### **GENERALIDADES**

A los microorganismos que hidrolizan grasas y aceites se les conoce como microorganismos lipolíticos. Las lipasas se definen como aquellas enzimas capaces de hidrolizar los enlaces éster de los ácidos carboxílicos de sustratos insolubles. Y en contraste, las enzimas que hidrolizan los enlaces ésteres de sustratos solubles en agua se conocen como esterasas. El rol biológico de las lipasas consiste en iniciar el metabolismo de las grasas y aceites reduciéndolos a ácidos grasos libres realmente metabolizables y glicerol. Los triglicéridos no se absorben intactos dentro de la célula, así que la hidrólisis inicial ocurre extracelularmente. Por esta razón, las lipasas microbianas generalmente son excretadas por la célula, y se encuentran como enzimas extracelulares. En algunos casos, la acción lipolítica provoca cambios indeseables, teniendo por consecuencia el rechazo y disposición final de los alimentos.

Mediante la utilización de medios de cultivo especiales en placa, los microorganismos que producen lipasas pueden enumerarse. Tal enumeración no se realiza con fines rutinarios, sino cuando se presenta algún problema. La determinación del número de microorganismos lipolíticos presentes en una muestra de alimentos, puede proporcionar información al fabricante de si el problema relacionado con los lípidos es microbiano o de origen no microbiano.

### **FUNDAMENTO**

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra, en un medio de cultivo selectivo específico que contiene triglicéridos, aprovechando la capacidad de este grupo microbiano de alteración, de utilizar como nutrientes a los ácidos grasos mediante la lipólisis enzimática. Al medio de cultivo se le añade un colorante, rojo neutro, y al difundir la enzimas en el medio de cultivo sólido, disminuye el pH debido a la acumulación de los ácidos grasos libres, y su color rojo se vuelve visualmente más brillante e intenso en aquellas zonas en donde se encuentran los ácidos grasos libres.

## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

- 1 matraz Erlenmeyer de 250,0 mL de capacidad conteniendo 90,0 mL de agua peptonada<sup>a</sup>.
- 2 tubos de 16 x 150 conteniendo 9,0 mL de agua peptonada<sup>a</sup>.
- 6 cajas de Petri con 15,0 mL de agar Rojo Neutro. (medios de cultivo alternos, agar tributirina para bacterias y/o agar tributirina para levaduras)<sup>a</sup>.

## MATERIAL Y EQUIPO

- Mechero<sup>a</sup>.
- Stomacher<sup>a</sup>.
- Bolsa para stomacher<sup>a</sup>.
- Balanza<sup>a</sup>.
- Cuentacolonias<sup>b</sup>.
- 4 pipeta de 1,0 mL<sup>a</sup>
- 1 varilla de vidrio<sup>a</sup>.
- Incubadora a 35 °C con termostato calibrado que evite variaciones mayores a  $\pm 0,2$  °C<sup>a,b</sup>.

## NOTAS

<sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.

<sup>b</sup> Material necesario a las 24 h. de iniciada la práctica.

## PROCEDIMIENTO

- Pesar 10,0 gramos de la muestra y colocar en un matraz con 90,0 mL de solución diluyente adecuada (buffer de fosfatos, peptona de caseína, etc.)
- Efectuar diluciones decimales según experiencia o al menos  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ .
- Inocular por duplicado y por superficie en agar rojo neutro y distribuir uniformemente con varilla de vidrio 0,1 mL de cada dilución.
- Incubar las cajas a 35 °C /48 h.
- Investigar la presencia de bacterias lipolíticas, colonas rojas o rosadas, el medio original es de un tono naranja-rojizo y cuando hay una degradación de grasa, disminuye el pH debido a que los ácidos grasos acumulados hacen que el medio se acidifique, entonces, el indicador virará a rosa o rojizo.
- Reportar la estimación de la cifra de bacterias que lipolíticas. Sensibilidad mínima de detección del recuento por extensión de superficie es de 100,0 UFC/g o 10,0 UFC/mL.
- La sensibilidad se puede aumentar, si se inoculan 3 cajas con 0,3 mL, 0,3 mL y 0,4 mL de la primera dilución, por lo tanto la sensibilidad mínima de detección será de 10,0 UFC/g o 1,0 UFC/mL.

**NOTA:**

Si se desea, se puede sustituir el agar rojo de fenol con los siguientes medios de cultivo alternos:

- Agar Tributirina para bacterias.- Las bacterias lipolíticas forman un halo claro, alrededor de las colonias en contraste con el medio de cultivo que permanece turbio. Incubar a  $30 \pm 1$  °C/72 h
- Agar Tributirina para levaduras.- Las levaduras lipolíticas forman un halo claro, alrededor de las colonias en contraste con el medio de cultivo que permanece turbio.

**BIBLIOGRAFIA**

- Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association; 4 ed. (April 15, 2001)
- Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso cotija. Tesis para obtener título de Q. A. presentado por Verónica García Saturnino. UNAM, Fac. De Química no. 2006.
- Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas color. Koneman, Elmer, W. Editorial Médica Panamericana. 1983.

## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

### **Rojo neutro, agar**

Caldo nutritivo	8,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Aceite de olivo	10,0 mL
Rojo neutro al 0,5%	10,0 mL
Tween 80	0,01 %
Agar bacteriológico	15,0 g
Agua	1,0 L

Disolver 0,5 g de rojo neutro en 10 mL de etanol en un matraz volumétrico aforado y llevar a 100 mL con agua destilada. Disolver en agua destilada el caldo nutritivo, el cloruro de sodio y 10 mL de la solución de rojo neutro previamente preparada. Ajustar el pH a 7,4. Después agregar el aceite de olivo, el tween 80 y emulsificar con ayuda de algún homogenizador (ultraturex, licuadora, batidora) aproximadamente 10 minutos a velocidad mínima. Agregar el agar, calentar hasta disolución completa. Esterilizar a 121 °C durante 15 min. Distribuir en cajas.

### Principio de acción

Medio de cultivo selectivo específico que contiene aceite de olivo, el cual será degradado enzimáticamente por microorganismos con capacidad lipolítica. Al medio de cultivo se le añade un colorante, rojo neutro, y al difundir la enzimas en el medio de cultivo sólido, disminuye el pH debido a la acumulación de los ácidos grasos libres, y su color rojo se vuelve visualmente más brillante e intenso en aquellas zonas en donde se encuentran los ácidos grasos libres.

### **Tributirina, agar (para bacterias)**

triptona	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Cloruro de sodio	10,0 g
Tributirina	10,0 mL
Agar	15,0 g
Agua	1,0 L

Glucosa al 20% (esterilizada por filtración en membrana) 5,0 mL

Disolver en agua destilada la triptona, el extracto de levadura, el cloruro de sodio, y la tributirina. Ajustar el pH a 7,7. Emulsificar con ayuda de algún homogenizador (ultraturex, licuadora, batidora), aproximadamente 10 minutos a velocidad mínima. Agregar el agar, calentar hasta disolución completa. Esterilizar a 121 °C durante 15 min. Enfriar y agregar la glucosa previamente esterilizada por filtración en membrana. Homogeneizar y distribuir en cajas.

Principio de acción

Medio de cultivo selectivo específico que contiene tributirina como triglicérido. Este nutriente será degradado por las bacterias lipolíticas mediante la lipólisis enzimática. Las enzimas degradan la tributirina liberando ácidos grasos, lo que provoca una disminución del pH, y las colonias con actividad lipolítica presentan un halo claro alrededor en aquellas zonas en donde se encuentran los ácidos grasos libres y en contraste el resto del medio de cultivo permanece turbio.

### **Tributirina, agar (levaduras)**

Extracto de levadura	10,0 g
Peptona	20,0 g
Tributirina	10,0 mL
Agar	15,0 g
Agua	1,0 L
Glucosa al 20% (esterilizada por filtración en membrana)	25,0 mL

Disolver en agua destilada el extracto de levadura, peptona y la tributirina. Ajustar el pH a 6,5. Emulsificar con ayuda de algún homogenizador (ultraturex, licuadora, batidora), aproximadamente 10 minutos a velocidad mínima. Agregar el agar, calentar hasta disolución completa. Esterilizar a 121 °C durante 15 min. Enfriar y agregar la glucosa previamente esterilizada por filtración en membrana. Homogeneizar y distribuir en cajas.

Principio de acción

Medio de cultivo selectivo específico que contiene tributirina como triglicérido. Este nutriente será degradado por las bacterias lipolíticas mediante la lipólisis enzimática. Las enzimas degradan la tributirina liberando ácidos grasos, lo que provoca una disminución del pH, y las colonias con actividad lipolítica presentan un halo claro alrededor en aquellas zonas en donde se encuentran los ácidos grasos libres.