

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, HUMEDAD RELATIVA  
Y CONCENTRACIÓN DE SÓLIDOS DE SALCHICHA EN LA  
COLONIZACIÓN DE *Leuconostoc mesenteroides* ADHERIDO  
A POLIPROPILENO”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**OMAR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, JUNIO DEL 2011.**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, HUMEDAD RELATIVA Y  
CONCENTRACIÓN DE SÓLIDOS DE SALCHICHA EN LA  
COLONIZACIÓN DE *Leuconostoc mesenteroides* ADHERIDO  
A POLIPROPILENO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**OMAR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO**

**SINODALES**

**Dra. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO  
DIRECTOR**

**Dr. EDUARDO FERNÁNDEZ ESCARTÍN  
SINODAL**

**Dra. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA  
SINODAL**

**M. en C. BEATRIZ LILIANA ÁLVAREZ MAYORGA  
SINODAL**

## ÍNDICE GENERAL

Contenido

Página

ÍNDICE GENERAL.	i
ÍNDICE DE CUADROS.	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.	v
RESUMEN.	
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. ANTECEDENTES.	3
II.1 La salchicha.	3
II.1.1 Composición.	3
II.1.2 Consumo y producción en México.	4
II.1.3 Microbiología del deterioro.	6
II.2 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .	9
II.2.1 Como potencial deteriorador en salchicha.	10
II.2.2 Fuentes y mecanismos de contaminación en salchichas.	11
II.3 Biopelículas.	13
II.3.1 Mecanismos propuestos para la formación de biopelículas.	14
II.3.1.1 Acondicionamiento de la superficie.	14
II.3.1.2 Adhesión celular.	15
II.3.1.3 Formación de la microcolonia.	15
II.3.1.4 Formación de una biopelícula funcional.	16
II.3.1.5 Desprendimiento y dispersión de la biopelícula.	17
II.3.2 Regulación de la formación de la biopelícula.	17
II.3.3 Biopelículas en la industria de los alimentos.	18
II.3.4 Eliminación y control de las biopelículas.	19
III. HIPÓTESIS.	22
IV. OBJETIVOS.	23
IV.1 General.	23

IV.2 Específicos.	23
V. METODOLOGÍA.	24
V.1 Materiales.	24
V.1.1 Equipo.	24
V.1.2 Medios de cultivo.	25
V.1.3 Reactivos.	25
V.1.4 Material Biológico.	25
V.2 Métodos.	27
V.2.1 Determinación de humedad relativa y temperatura durante la producción de salchicha en una empresa.	27
V.2.2 Determinación de la capacidad de cepas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> aisladas de un planta procesadora de salchicha para colonizar superficies de polipropileno.	27
V.2.2.1 Activación de la cepa.	28
V.2.2.2 Preparación del inóculo.	28
V.2.2.3 Preparación de la suspensión de salchicha.	28
V.2.2.4 Adhesión de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a polipropileno.	28
V.2.2.5 Colonización y Recuento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> adherido a polipropileno.	29
V.2.3 Efecto de la temperatura, humedad relativa y concentración de sólidos de salchicha en la colonización de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> adherido a una superficie de polipropileno.	29
V.2.3.1 Preparación de microambientes ajustados a diferentes humedades relativas.	29
V.2.3.2 Adhesión, colonización y recuento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> adherido a polipropileno.	29
V.2.4 Confirmación de la formación de la biopelícula mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).	30

V.2.5 Análisis estadístico.	31
VI. RESULTADOS.	32
VI.1 Determinación de humedad relativa y temperatura durante la producción de salchicha en una empresa.	32
VI.2 Determinación de la capacidad de cepas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> aisladas de un planta procesadora de salchicha para colonizar superficies de polipropileno.	33
VI.3 Efecto de la temperatura, humedad relativa y concentración de sólidos de salchicha en la colonización de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> adherido a una superficie de polipropileno	38
VI.4 Confirmación de la formación de la biopelícula mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).	41
VII. DISCUSIÓN.	42
VIII. CONCLUSIONES.	47
IX. BIBLIOGRAFIA.	48

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros	Página
1 Cepas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> aisladas de una planta procesadora de salchicha e identificadas mediante Biolog y PCR empleando iniciadores específicos para <i>Leuconostoc</i> .	26
2 Temperatura y humedad relativa en 3 zonas seleccionadas en el proceso de producción de salchicha.	32
3 Tasa de adhesión, velocidad de desarrollo, duración de la fase lag y población máxima alcanzada de cepas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a 30°C y 1% de suspensión de salchicha.	33
4 Parámetros cinéticos de velocidad y población máxima a 22°C ajustados con el programa DmFit. Niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.	40
5 Parámetros cinéticos de velocidad y población máxima a 4°C ajustados con el programa DmFit. Niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.* No desarrolló.	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Página
1 Precios promedio de carnes frías y embutidos del año (2000-2007)	5
2 Producción de carnes frías y embutidos en México (2003-2008)	6
3 Distribución de los valores de velocidad de colonización de las cepas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .	35
4 Distribución de los valores de población máxima alcanzada de las cepas <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .	36
5 Comportamiento de cepas de <i>L. mesenteroides</i> con mayor capacidad de colonización a 30°C y 1% de sólidos de salchicha.	37
6 Cinéticas de desarrollo de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a 22°C, 4 niveles de humedad relativa y 1% de sólidos de salchicha (A) y 5% de sólidos de salchicha (B).	38
7 Cinéticas de desarrollo de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a 4°C, 4 niveles de humedad relativa y 1% de sólidos de salchicha (A) y 5% de sólidos de salchicha (B).	39
8 Micrografías de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> colonizando superficies de polipropileno (72horas/22°C/100%HR). Imagen A (2700 ampliificaciones) e imagen B (10,000 ampliificaciones).	41
9 Micrografías de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> colonizando superficies de polipropileno (72horas/22°C/100%HR). Imagen A (12,000 ampliificaciones) e imagen B (6,000 ampliificaciones).	41

## RESUMEN

Las bandas transportadoras y equipos de las empresas productora de alimentos pueden funcionar como reservorios de microorganismos (adheridos o en biopelículas) y propiciar riesgos que comprometen la frescura e inocuidad del producto. En este trabajo se estudió la capacidad de 48 cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas de una planta procesadora de salchicha para colonizar superficies de polipropileno y la influencia de los factores ecológicos sobre la colonización. Se utilizó un modelo de esferas de polipropileno. Se promovió la adhesión por inmersión de las esferas en un homogeneizado de salchicha (0.5%p/v) previamente inoculado con 9 log UFC/mL. Se almacenaron a 30°C/4h y se sometieron a 5 lavados. Las esferas con las células adheridas se sumergieron en una suspensión de salchicha estéril al 1% y se incubaron a 30°C por 24 horas. Para observar la influencia de los factores ecológicos en la colonización se utilizó el mismo modelo. Las esferas con las células adheridas se sumergieron en suspensiones estériles de salchicha (1 y 5%) por 20 min. Se secaron en flujo laminar y se almacenaron a 4 y 22°C a 60%, 86%, y 97% de humedad relativa. Se incluyó un nivel más que consistió en esferas que se mantuvieron dentro de las suspensiones de salchicha y se denominó 100%. Periódicamente se cuantificaron las células adheridas. La remoción de las células adheridas se realizó empleando un Vortex a 3000rpm/2minutos y se cuantificó en agar MRS (30°C/48 horas). Todas las cepas mostraron capacidad para formar biopelículas. Las cepas con mayor potencial colonizador fueron: 22, 27, 54 y 63, aisladas de salchicha deteriorada, emulsión cárnica cruda y guantes de operadores. La concentración de salchicha empleada durante la colonización no mostró influencia significativa sobre el desarrollo del microorganismo ( $p>0.05$ ). A 22°C se observó desarrollo a todos los niveles de humedad relativa; en contraste a 4°C únicamente se observó desarrollo a los dos niveles más altos, 86%HR y 97%HR. La velocidad de colonización se encuentra influenciada tanto por la temperatura como por la HR, como lo muestran los datos obtenidos; 0.3390 Log UFC/cm<sup>2</sup>/22°C/100%HR y 0.0027 Log UFC/cm<sup>2</sup>/4°C/97%HR. La población máxima fue mayor a 4°C que a 22°C, aunque como se esperaba, se alcanzó en un mayor tiempo de incubación (30días vs 5días); con lo que se hace evidente el potencial psicrótrofo de *L. mesenteroides*.



## I. INTRODUCCIÓN.

Genéricamente, el consumo de la carne se encuentra condicionado por una diversidad de factores, entre ellos, ingresos económicos del individuo, disponibilidad en el mercado, y desde otro ángulo, por razones culturales, religiosas, de salud y convicciones dietéticas. Por otra parte, la disponibilidad de la carne en el mercado se ha visto favorecida por una variedad de tratamientos que se aplican con la finalidad de conservar la carne en un estado consumible por más tiempo. El procesamiento de la carne, además de preservar la inocuidad, permite disponer de diversos productos formulados con mayor vida de anaquel que la carne. La salchicha destaca como uno de los principales productos cárnicos procesados de consumo en México.

Los sistemas automatizados que en la actualidad se aplican para la elaboración de salchichas y otros productos cárnicos, pueden propiciar nuevos riesgos que comprometen la frescura e inocuidad del producto terminado. Tal es el caso de las bandas transportadoras y equipos diversos que si bien disminuyen el tiempo, energía y costo de elaboración, también pueden funcionar como reservorios de microorganismos (deterioradores o patógenos) adheridos o formando biopelículas.

Las biopelículas son comunidades bacterianas englobadas en una matriz de exopolisacáridos (glicocalix) producida por las bacterias y adheridas a una superficie viva o inerte. La formación de biopelículas causa serios problemas dentro de las plantas procesadoras de alimentos. Las células que se encuentran en la parte más superficial de la biopelícula pueden desprenderse y contaminar los alimentos. Incluso, los microorganismos inmersos en la estructura son capaces de exhibir una mayor resistencia a la acción de diversos germicidas, antibióticos, tratamientos de lavado y desinfección, factores ambientales, conservadores, tratamientos mecánicos, entre otros.

Por otra parte, el control de microorganismos adheridos o formando una biopelícula implica el estudio de los factores ecológicos que afectan su supervivencia y desarrollo. Más aún, la modificación de los factores ecológicos intrínsecos (del alimento y microorganismos) y extrínsecos puede ser de gran utilidad para el control microbiano.

De entre la microflora deterioradora de las salchichas empacadas al vacío, destacan, por su potencial psicrótrofo y microaerófilo, las bacterias Gram positivas de los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. El deterioro se manifiesta por la presencia de olores desagradables, agriado, gasificación y líquido turbio en el empaque.

Aunque la presencia de microorganismos deterioradores en el producto terminado no implica de manera directa un riesgo a la salud, una vez evidenciados algunos signos de actividad (putrefacción, ennegrecimiento, mucosidad, rancidez, desintegración, reblandecimiento), es condenada por el consumidor. Las pérdidas generadas por la acción de gérmenes con potencial deteriorador obligan a la acción de medidas preventivas y correctivas dentro de las empresas productoras.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 La salchicha.

La salchicha es un embutido curado y cocido, elaborado con carne de vacuno, carne de cerdo y vacuno, carne de aves o una mezcla de otras especies animales autorizadas, grasa animal comestible, ingredientes y aditivos de uso permitido, perfectamente trituradas, mezcladas y emulsificadas o no, introducido en tripas autorizadas con un diámetro no mayor a 27mm. El producto objeto de esta norma se clasifica por su presentación en tres tipos y un solo grado de calidad; la Salchicha de Viena, la Salchicha de Franckfort y la Salchicha de Cocktail (NMX-F-065-1984).

#### II.1.1 Composición.

La salchicha es un alimento con una actividad de agua que oscila entre 0.96-0.98, un pH de 5.6-6.0, y una composición de 9-12% de proteína, 20-25% de grasa y 50-55% de humedad (Secretaría de Salud, 2010). La elevada actividad de agua, superior a 0.95, y un pH inferior a 6.0 clasifican estos productos como altamente perecederos (Li y Torres, 1993). Los valores del análisis químico proximal realizado por la Secretaría de Salud son aproximados a los reportados por la USDA para la salchicha tipo Viena, elaborada a partir de carne de pollo, cerdo y ganado vacuno. El porcentaje de proteína es de 10.50%, el porcentaje de grasa es de 19.40% y el porcentaje de humedad es de 64.90% (USDA, 2011).

De acuerdo con la PROFECO (2010), en un estudio realizado a 62 marcas de salchicha, el contenido de macronutrientes fue de: 6-13% de proteína (contiene soya), 3.3-19.9% de carbohidratos (contiene almidón y harinas), 4.6-31.9% de grasa y 60-70% humedad. Según la norma mexicana NMX-F-065-1984, las salchichas tipo Viena, de Franckfort y tipo Cocktail deben cumplir con ciertas especificaciones químicas y físicas. De entre las especificaciones químicas el

contenido de proteína debe ser al menos de 9%, y el contenido de grasa y humedad no debe ser mayor a 30% y 70% respectivamente. Comparando los valores arrojados en el estudio realizado por la PROFECO (2010) con los valores establecidos por la norma mexicana es posible concluir, que algunos de los productores de salchicha no cumplen con los requisitos establecidos por la norma. De entre los aditivos destacan los nitratos y los nitritos por conferir a las salchichas las características organolépticas deseadas; aroma, sabor (Durand, 2002) y color característico (Fox, 1966). También por su efecto inhibitorio sobre *Clostridium botulinum* y por su potencial carcinogénico (WCRF International, 2011). *Clostridium botulinum* es la bacteria que produce la toxina bacteriana más potente que se conoce y que causa el botulismo en los humanos (Feigin, 1989). Existen siete tipos de toxinas botulínicas designadas por las letras A, B, C, D, E, F, G; sólo los tipos A, B, E se han vinculado con botulismo en humanos (Hatheway, 1992).

#### II.1.2 Consumo y producción en México.

El consumo de la salchicha en México, así como de otros productos cárnicos, se encuentra generalmente condicionado por una diversidad de factores, entre otros, recursos económicos del individuo, disponibilidad en el mercado, y desde otro ángulo, por razones culturales, religiosas, de salud y convicciones dietéticas (Fernández, 2008).

El Consejo Nacional de Empacadores de Carnes Frías y Embutidos en el año 2007 informó que el consumo per cápita de embutidos en México era de 16 kg; muy reducido si se compara con Estados Unidos, cuyo consumo per cápita oscilaba entre los 40 y 50 kg. En esta comparación se deben de tomar en cuenta las grandes diferencias de poder adquisitivo y hábitos alimenticios que existen entre los individuos de cada país.

La PROFECO (2010), informó que el embutido más popular en el mercado mexicano es la salchicha con el 48%, seguido del jamón con un 42% y la longaniza

y chorizo con un 3% de preferencia. Con base en el ingreso promedio mensual del mexicano \$6,625.00 pesos (INEGI, 2003) es factible entender porque la salchicha, siendo unos de los productos cárnicos más baratos (Figura 1), es la más consumida.

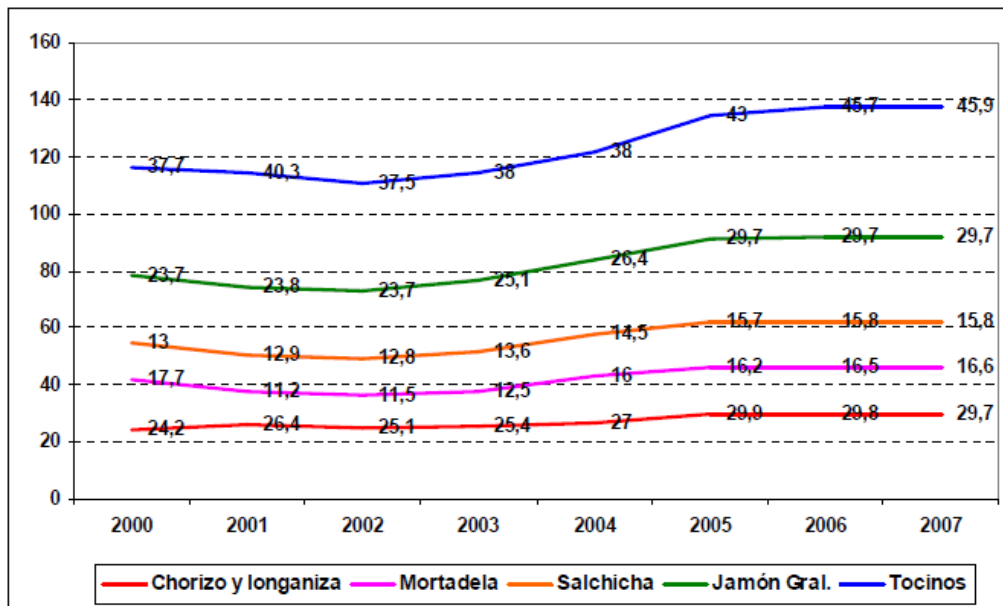


Figura 1. Precios promedio de carnes frías y embutidos del año 2000-2007 (pesos mexicanos corrientes) Fuente: Consejo Mexicano de la Carne, 2010.

La información oficial sobre producción de carnes frías y embutidos de la industria formal muestra un interesante dinamismo en el período 2003-2008, con una tasa de expansión promedio anual de 3.4%, ubicando en 2008 la producción en 595,000 toneladas (Figura 2) (INEGI, 2009). Cabe señalar que este dinamismo está motivado en gran medida por una demanda creciente por productos de tipo popular (bajo precio).

La PROFECO (2010), reportó que la producción de salchicha en México para el año 2008 y 2009 fue de 405.63 y 402.15 miles de toneladas respectivamente. Tomando en cuenta la producción de carnes frías y embutidos en el año 2008 (595,000 toneladas) y la producción de salchicha en el mismo año

reportada por la PROFECO (405,630 toneladas); resulta obvio que casi el 70% de la producción de ese año corresponde únicamente a salchicha. Lo anterior implica que la salchicha se encuentra posicionada como el producto cárnico líder en producción en México, y tomando en cuenta su bajo costo, disponibilidad en el mercado y variedad de presentaciones, podemos esperar la vigencia de este producto en el mercado por muchos años más.

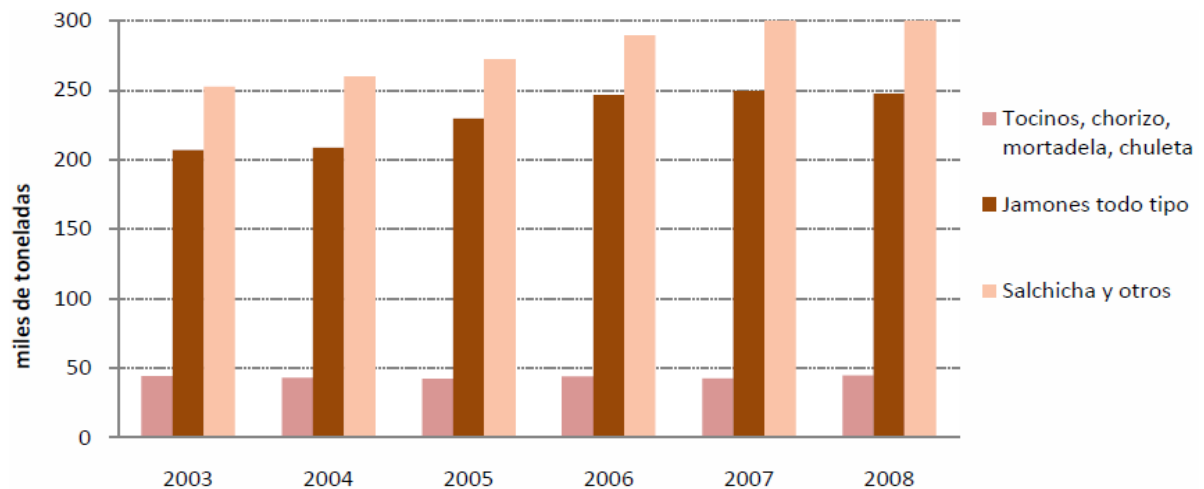


Figura 2. Producción de carnes frías y embutidos en México (2003-2008)

Fuente: Banco de información económica del INEGI, 2009.

### II.1.3 Microbiología del deterioro.

La microbiología de la carne, como de los productos cárnicos, está determinada por una diversidad de factores, entre ellos, el estado fisiológico del animal previo al sacrificio, las condiciones de matanza, transporte y almacenamiento de las canales (Upton, 1995). Existe una gran variedad de microorganismos con potencial deteriorador, capaces de ingresar y desarrollar en la carne. Y aunque es muy amplia la diversidad de bacterias que pueden recuperarse tanto de la carne como de los productos cárnicos, serán los factores ecológicos intrínsecos y extrínsecos los que definirán los géneros microbianos implicados en el deterioro (Ingram y Simonsen, 1980). En las carnes procesadas el tratamiento

térmico (aproximadamente a 70°C) da como resultado un producto virtualmente estéril. Sin embargo, la contaminación ulterior al tratamiento térmico por microorganismos ocurre con relativa facilidad (Mol y col., 1971; Nortjé y col., 1979). Es posible que aunque la contaminación ocurra de manera discreta (<10ufc/g), el deterioro se manifieste por el eventual incremento de la población inicial hasta 10<sup>8</sup> UFC/g (Hamasaki y col., 2003). La correlación entre la densidad microbiana, en particular de bacterias ácido lácticas, y los signos de deterioro son imprecisos. Korkeala y col., (1987), concluyeron que la probabilidad de que 10<sup>7</sup> UFC de *Lactobacillus* spp. /g producirían signos de deterioro en un producto cárnico es del 10% aproximadamente. No obstante, con cifras mayores a 10<sup>8</sup> UFC/g aparecen signos de descomposición debido al ataque directo sobre los aminoácidos, fuente primaria en el proceso putrefactivo, en ausencia de la glucosa que se ha agotado (Egan y col., 1980).

La temperatura parece jugar un papel importante en la generación del deterioro. A 4°C, se observó deterioro en carne de res empacada al vacío una semana después de haber alcanzado una población de 10<sup>7</sup> UFC/cm<sup>2</sup> y a -1.5°C tuvieron que transcurrir cuatro semanas para observar los mismos signos, después de haber alcanzado la misma población (Blixt y col., 1996). Como alternativa, existen indicadores químicos de deterioro en carne por la acción microbiana, entre ellos, D-lactato, acetoína, tiramina y el valor del pH (Yano y col., 1995). Según Borch y Agerhem (1992) la presencia de D-lactato y acetato indican números elevados de *Lactobacillus* spp., mientras que la presencia de D-lactato y etanol indican números elevados de *Leuconostoc* spp. Con el desarrollo de la microflora láctica es posible observar una disminución del pH, de 6.3 hasta 5.3 aproximadamente (Korkeala y col., 1987). Una disminución en el pH hasta esos niveles restringirá el desarrollo de *B. thermosphacta*, pero no de otros géneros lácticos como *Lactobacillus* spp. (Borch y col., 1996). Por otra parte, cuando los productos cárnicos se almacenan a temperatura ambiente (30°C), los microorganismos implicados en el deterioro suelen ser miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y *Acinetobacter* (Prandl y col., 1994).

En un estudio realizado en las últimas fases de deterioro de un producto cárnico procesado, se determinó la predominancia de especies como *Lactobacillus* y *Leuconostoc* en la población final (Von Holy y col., 1991). Posteriormente, Von Holy y col. (1992) realizaron un estudio en una empresa productora de salchicha Viena ahumada empacada al vacío, donde determinaron la microflora Gram negativa y Gram positiva y los géneros lácticos predominantes en superficies, en el producto y en el medio ambiente o entorno de la empresa. De entre las bacterias recuperadas en el experimento, el porcentaje de bacterias Gram positivas (71.4%) superó por mucho al porcentaje de bacterias Gram negativas (28.6%). En 1983, Egan reportó que las condiciones que se generan en la salchicha durante su producción (presencia de dióxido de carbono, nitritos, humo, sal y disminución del oxígeno y pH), muestran un mayor efecto inhibitorio en bacterias Gram negativas que en las Gram positivas. Más aún, la proliferación de los géneros lácticos contribuye a antagonizar el desarrollo de microorganismos deterioradores Gram negativos y Gram positivos (Papathanasopoulos y col., 1991). El antagonismo es generado por la producción de ácido láctico y dióxido de carbono (en el caso de bacterias homofermentativas) y ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono y alcohol (bacterias heterofermentativas) (Stamer, 1976); además de bacteriocinas que son activas contra un tipo de microorganismo en específico (Leisner y col., 1996). Si bien el empacado en sí mismo no constituye ningún método de conservación influye considerablemente sobre la clase e intensidad de las proliferaciones bacterianas debido a la modificación del medio (Prandl y col., 1994). La exclusión de oxígeno mediante el empacado al vacío crea un ambiente microaerófilo. El oxígeno residual es consumido por la acción microbiana y con ello se produce un aumento en la concentración de dióxido de carbono que en unión con la baja tensión de oxígeno favorece en productos cárnicos cocidos el desarrollo de la flora generadora de ácido láctico, en particular los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*, así como también de *B. thermosphacta* y cepas psicrotróficas de la familia *Enterobacteriaceae* (Gill y Newton, 1978).



Por otra parte, varios autores mencionan a las bacterias ácido lácticas (Gram positivas) como la microflora predominante en los productos cárnicos curados ahumados y empacados al vacío (Kitchell y Shaw, 1975; Dainty y col., 1983; Shaw y col., 1985; Ahn y Stiles, 1990; Borch y col., 1996; Gill, 1996; Jones, 1999). De entre las especies recuperadas en el experimento realizado por Von Holy y col., (1992) destacan los géneros *Leuconostoc* y *Pediococcus*, siendo el primer género el predominante en dicho estudio. Sin embargo, dentro del grupo algunos géneros de bacterias lácticas productores de ácido butírico (imparte rancidez) son capaces de propiciar el deterioro con mayor prontitud que otros géneros incapaces de producir el mismo ácido (Kochhar, 1996). En suma, las bacterias ácido lácticas ponen de manifiesto el deterioro en la salchicha generando agriado, líquido viscoso, un exudado lechoso y abombamiento del empaque por la producción de gas (Korkeala y col., 1988; von Holy y col., 1991).

## II.2 *Leuconostoc mesenteroides*.

*Leuconostoc* es un género de bacterias lácticas de la familia *Leuconostocaceae*. Las especies de *Leuconostoc* tienen generalmente forma cocoide-ovoide y a menudo forman cadenas. Son resistentes intrínsecamente a la vancomicina y catalasa-negativos (lo cual los distingue de *Staphylococcus*). Son heterofermentativos y capaces de producir dextranos a partir de la sacarosa (Björkroth y Holzapfel, 2006).

### II.2.1 Como potencial deteriorador en salchicha.

Las bacterias lácticas destacan como el mayor grupo microbiano en la carne curada empacada al vacío (Kitchell y Shaw, 1975). De entre las bacterias ácido lácticas presentes en la carne curada empacada al vacío (salchicha), destaca el género *Leuconostoc* (Von Holy y col., 1992). Entre las especies de *Leuconostoc* con potencial deteriorador se encuentran, *L. carnosum*, *L. gelidium* y *L. mesenteroides*. Con frecuencia *Leuconostoc carnosum* y *Leuconostoc*

*mesenteroides* se asocian al deterioro de productos cárnicos cocidos, empacados al vacío y almacenados en refrigeración. El deterioro se manifiesta por la presencia de olores desagradables, agriado, gasificación y líquido turbio en el empaque. El género *Leuconostoc* es psicrótrofo, por lo que es esencial mantener la cadena de frío durante todo el ciclo de elaboración, almacenamiento y distribución del producto. Además, al igual que otras bacterias lácticas, *Leuconostoc* es capaz de desarrollar bajo una variedad de condiciones que para otras bacterias, por ejemplo las *Pseudomonas*, resultan altamente inhibitorias. Entre las condiciones que le confieren ventaja selectiva respecto a la flora Gram negativa se encuentran, la resistencia al dióxido de carbono, nitrito, humo, sal y a la microaerobiosis. También, al ser heterofermentativos, toleran valores de pH más bajos que las bacterias Gram negativas comúnmente encontradas en las carnes, especialmente bajo condiciones anaeróbicas (Egan, 1983). Además, el etanol producido por las bacterias lácticas heterofermentativas, como lo es *Leuconostoc*, contribuye al deterioro de los productos cárnicos empacados al vacío (Dainty y Mackey, 1992). Y la presencia de D-lactato y etanol en el alimento son indicadores de niveles elevados de *Leuconostoc spp.* (Borch y Agerhem, 1992). Cepeda-Márquez y col., (2008), evidenciaron la capacidad de diferentes especies de *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*, *L. lactis*, *L. fallax*) para propiciar el deterioro en salchicha. De entre las 3 especies, *L. lactis* mostró los primeros signos de deterioro a los 5 días a 22°C y a los 22 días a 7°C; *L. mesenteroides* lo hizo a los 7 días a 22°C y a los 22 días a 7°C. De entre *L. mesenteroides* y *L. lactis*, fue la primera especie la que destacó por provocar mayor gasificación y mucosidad. El deterioro provocado por *L. lactis* fue menos intenso, aunque a 22°C es perceptible con mayor prontitud. Finalmente *L. fallax* mostró el deterioro más discreto de las tres especies evaluadas, observándose una ligera mucosidad y una gasificación apenas perceptible. Así pues, el orden de la capacidad para deteriorar a la salchicha fue; *L. mesenteroides* > *L. lactis* > *L. fallax*. Por otra parte, se realizó una dinámica combinando las tres cepas de *Leuconostoc* con la finalidad de observar un sinergismo entre las especies; sin embargo no ocurrió así. La gasificación fue discreta y la mucosidad ligeramente mayor a la producida por *L. fallax*.

## II.2.2 Fuentes y mecanismos de contaminación en salchichas.

La microflora presente en la salchicha, como en otros alimentos, no suele estar determinada exclusivamente por la microflora propia de las materias primas e ingredientes. Existe la posibilidad de que diversos microorganismos puedan ingresar al alimento durante su producción y manejo; peor aún, sobrevivir y desarrollar hasta alcanzar números tan elevados que se manifieste alguna clase de deterioro o que el alimento presente un riesgo a la salud posterior a su consumo. Por lo anterior, es imperativo identificar las fuentes y mecanismos de contaminación que operen dentro de los ambientes de producción para lograr su detección y control.

De entre las fuentes de contaminación durante la elaboración, manejo y empaqueo de la salchicha podemos mencionar, las materias primas, los utensilios y/o equipo, los manipuladores o trabajadores, el aire, el agua, entre otros. Por ejemplo, el contacto del producto terminado o después del tratamiento térmico con la materia prima o el empleo de materia prima de mala calidad bacteriológica puede comprometer la calidad microbiológica del alimento. El agua según sus antecedentes y procedencia puede ser vehículo de microorganismos patógenos y deterioradores, incluso satisfaciendo normas microbianas de potabilidad, podría contener bacterias con alta capacidad deterioradora (Fernández, 2008). El aire expulsado en los actos de toser o estornudar puede dispersarse sobre los alimentos o superficies, siendo particularmente objetable en la zona de empaqueo donde los productos no serán sometidos a un tratamiento térmico posterior. También todas las superficies y equipos, así como los manipuladores o trabajadores, que entran en contacto con los alimentos, se convierten en una fuente potencial de contaminación por microorganismos tanto deterioradores como patógenos. Cepeda-Márquez y col., (2008), observaron durante un muestreo longitudinal en una empresa productora de salchicha el contacto de las manos de los manipuladores con la película plástica previamente retirada de la salchicha (desecho) y posteriormente el producto en proceso sin ningún tipo de lavado o

desinfección. Al analizar las películas plásticas encontraron una carga microbiana de 7 log UFC/g. Lo que denota una mala práctica de operación que promueve la contaminación cruzada.

Desde que las bacterias lácticas han sido identificadas como la población con mayor contribución al deterioro de los productos cárnicos procesados, (Allen y Foster, 1960; Steele y Stiles, 1981; Reuter, 1981), los muestreos microbiológicos en las líneas de producción de carnes procesadas se han enfocado a este grupo (Kempton y Bobier, 1970; Mol y col., 1971; Borch y col., 1988). En un estudio realizado en salchicha Viena empacada al vacío (Dykes y col., 1991) para determinar las fuentes de contaminación y los niveles de densidad o carga microbiana alcanzados durante la producción, se observó que las bacterias lácticas contaminaron al producto después del tratamiento térmico (cocido) de manera discreta o en bajos números como resultado de una posterior etapa de manipulación (contaminación cruzada). Es bien sabido que las bacterias pueden depositarse en diversas superficies y contribuir a la formación de reservorios. Tal es el caso de las bandas transportadoras y equipos diversos que si bien disminuyen el tiempo y costo de elaboración, también pueden funcionar como reservorios de microorganismos (deterioradores o patógenos), adheridos o formando biopelículas (Herrera y col., 2007). Cepeda-Márquez y col., (2008), analizaron casi 50 muestras en una empresa productora de salchicha con la finalidad de detectar la presencia de *Leuconostoc* en el equipo. La positividad fue de 35% en el equipo que transporta las salchichas a la zona de empacado; lo que implica la posible presencia de reservorios en el equipo. El problema principal reside en la potencial contaminación de la salchicha, al entrar en contacto con el equipo, ulterior al tratamiento térmico.

Por otra parte, es importante mencionar que la contaminación de las salchichas por microorganismos deterioradores no ocurre exclusivamente por los géneros lácticos. Existen otros géneros bacterianos que se han asociado con la contaminación de la salchicha en diferentes etapas del proceso de producción. Por sus simples requerimientos de nutrientes y su potencial psicrótrofo, destaca

*Pseudomona*. La cual, ha sido relacionada con procesos de corte, procesado y empacado de los productos cárnicos (Gill, 1983; Buchanan, 1986; Nortje, 1987). También se ha localizado en el suministro de agua de la planta, en superficies, en salmueras que son recirculadas a temperaturas de 0-4°C y en suelos húmedos (Shaw y Latty, 1981; Gill, 1986; Kraft, 1986). Por lo tanto, su ingreso al producto es facilitado por trabajadores, material de empaque y equipo (Nortje y col., 1979; Nortje, 1987). Así pues, las *Pseudomonas* se han reconocido como un potencial deteriorador de salchichas y productos cárnicos bajo condiciones de aerobiosis y refrigeración (Ayres, 1960; von Holy, 1983; Grau, 1986; von Holy y Holzapfel 1988).

### II.3 Biopelículas.

Se sabe sobre la existencia de las biopelículas desde hace algún tiempo. El primer registro fue en 1943 por Zobell. A partir de entonces muchos investigadores han evidenciado la presencia de biopelículas en el ambiente marino (Costerton y col., 1978); en los cascos de los barcos (Lewin, 1984); en dispositivos médicos (Dankert y col., 1986); en la caries dental (Rosen y col., 1981); en sistemas de distribución de agua (Ridgeway y Olson, 1981); entre otros. Las biopelículas son comunidades de células microbianas adheridas de manera irreversible a una superficie sólida e inmersas en una matriz polimérica extracelular (Blaschek y col., 2007). Esta matriz polimérica actúa como pegamento y mantiene a la estructura unida. Marshall (1992) definió a las biopelículas como un conjunto de microorganismos inmovilizados en la superficie de un sustrato, generalmente integrados en la matriz de un polímero orgánico de origen bacteriano. Y según Costerton (1999), las biopelículas son comunidades bacterianas englobadas en una matriz de exopolisacáridos (glicocalix) producida por las bacterias y adheridas a una superficie viva o inerte. En la naturaleza constituyen un modo de crecimiento protegido que permite la supervivencia de las bacterias en un medio hostil. Las estructuras que forman estas microcolonias contienen canales por los que circulan los nutrientes. Las biopelículas representan estructuralmente y dinámicamente un sistema biológico complejo que provee de protección a los microorganismos en

condiciones adversas; y son de 100 a 1000 veces más resistentes a agentes antimicrobianos que su contraparte planctónica (Hall-Stoodley y col., 2004). La formación de biopelículas contribuye a las infecciones médicas, daños en los equipos y a la contaminación de los alimentos; lo cual se traduce en pérdidas billonarias cada año en los Estados Unidos (Center for Biofilm Engineering, 2008). Varios microorganismos deterioradores y patógenos como las *Pseudomonas*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*, son capaces de formar biopelículas en ambientes donde se procesan alimentos lo que favorece la contaminación del producto post-proceso, el deterioro y aumenta el riesgo a la salud pública (Shi y Zhu, 2009). Desde otra perspectiva, las biopelículas pueden ser benéficas en la industria de alimentos. Por ejemplo, las biopelículas utilizadas en la producción del vinagre y otros productos fermentados (Frazier y Westhoff, 1988).

### II.3.1 Mecanismos propuestos para la formación de biopelículas.

#### II.3.1.1 Acondicionamiento de la superficie.

Ocurre dentro de los primeros cinco a diez segundos después de que una superficie es expuesta al ambiente. En esta etapa, las trazas de moléculas orgánicas se adhieren a una superficie sólido-líquido formando una capa orgánica. Esta capa da lugar a una alta concentración de nutrientes en la superficie. En un ambiente donde se procesan alimentos la capa orgánica funciona como fuente de nutrientes para las bacterias durante la formación de la biopelícula (Kumar y Anand, 1998). Sin embargo, la adhesión de las bacterias a una superficie inerte se encuentra altamente influenciada por la compatibilidad entre las moléculas del preacondicionamiento y las características de la superficie de la bacteria. Dicho de otra manera, las moléculas del preacondicionamiento, como las proteínas que se depositan sobre una superficie inerte, pueden reducir o facilitar la adhesión bacteriana. Por ejemplo, un estudio indicó que la adhesión de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* se veía inhibida por el

preacondicionamiento con leche entera y chocolate, y además el efecto se potencializó cuando se utilizó leche diluida (Chmielewski y Frank 2003).

#### II.3.1.2 Adhesión celular.

Los microorganismos se adhieren a la superficie acondicionada en dos etapas. La primera se denomina adhesión reversible, y consiste en la formación de enlaces reversibles entre las bacterias y los sustratos de la superficie (Mittelman, 1998). La adhesión reversible se encuentra influenciada por varias fuerzas de enlace; entre ellas, fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. Durante este tipo de adhesión la bacteria puede ser fácilmente removida mediante un lavado. La adhesión reversible es seguida por la adhesión irreversible (Kumar y Anand, 1998). La adhesión irreversible consiste en la producción de flagelos, fimbrias y pili; los cuales ayudan a las bacterias a superar las fuerzas repulsivas y hacer un contacto directo con la superficie. Diversas fuerzas de corto alcance como las interacciones dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno, enlaces iónico y covalentes e interacciones hidrofóbicas, están involucradas en la adhesión irreversible. Al llegar a esta etapa, la remoción celular es más difícil y requiere un fuerte tallado de la superficie (Kumar y Anand, 1998). Algunos de los factores que influyen en el nivel de adhesión de los microorganismos sobre una superficie son: las propiedades fisicoquímicas de la superficie de la célula bacteriana, la disponibilidad de nutrientes en el medio circundante, la etapa de crecimiento de las células bacterianas y el pH y temperatura de la superficie implicada.

#### II.3.1.3 Formación de la microcolonia.

Las bacterias adheridas de forma irreversible desarrollan y se dividen por la metabolización de los nutrientes presentes en el medio hasta convertirse en una microcolonia. Algunas microcolonias se combinan para formar una capa de células que cubre la superficie. Además, durante esta etapa las bacterias adheridas

producen sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Las fibrillas facilitan la asociación irreversible mediante la formación de un puente entre las células bacterianas y la superficie. Adicionalmente, las EPS tienen distintas funciones; entre ellas, mantienen a las células unidas, contribuyen a anclar las células bacterianas a la superficie, atrapan y concentran nutrientes y protegen a las bacterias de las fluctuaciones ambientales, las sustancias tóxicas y los agentes antimicrobianos (Dreeszen, 2003).

#### II.3.1.4 Formación de una biopelícula funcional.

Las células bacterianas se adhieren y crecen continuamente en la superficie. La matriz polimérica es la principal responsable de la protección de los microorganismos inmersos en la biopelícula. Y está constituida por EPS, proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos y otras sustancias poliméricas (Davey y O'Toole, 2000). Las EPS se compone primariamente por dos tipos de polisacáridos; polisacáridos neutros o polianiónicos principalmente en bacterias Gram negativas y polisacáridos catiónicos principalmente en bacterias Gram positivas. La cantidad de EPS producido depende principalmente de la edad de la biopelícula y de la disponibilidad de nutrientes. Algunas de las funciones principales son: organización estructural, protección contra la deshidratación y mayor resistencia a agentes antimicrobianos (Donlan, 2002). Las biopelículas maduras tardan entre dos y cuatro semanas para formarse. Una biopelícula madura es una compleja comunidad metabólicamente activa que podrá contener una sola capa de células bacterianas en un poroso polímero extracelular, o multicapas no uniformes de células bacterianas atrapadas dentro de la matriz polimérica extracelular (Dreeszen, 2003). Las multicapas de la biopelícula contienen canales, altamente permeables al agua, que facilitan el intercambio de nutrientes, cationes metálicos y metabolitos. Estos canales promueven la disponibilidad de nutrientes y la eliminación o remoción de metabolitos potencialmente tóxicos (Hall-Stoodley y col., 2004). Adicionalmente los gradientes iónicos se establecen dentro de la biopelícula para proporcionar energía y localizar los nutrientes a su alrededor. La mayoría de las bacterias



metabólicamente activas permanecen en las capas más superficiales de las biopelículas, cerca de los canales de agua (Chmielewski y Frank 2003). El incremento en la adhesión de los solutos orgánicos e inorgánicos, y las partículas que rodean la fase líquida, promueven la ampliación de la biopelícula (Kumar y Anand, 1998). En una biopelícula madura, la matriz polimérica extracelular constituye entre el 75% – 95% del volumen total, mientras que las bacterias representan solamente entre 5% – 25% del volumen total (Dreeszen, 2003).

#### II.3.1.5 Desprendimiento y dispersión de la biopelícula.

El desprendimiento y dispersión de la biopelícula permite a las bacterias adheridas contaminar, sobrevivir y colonizar nuevos ambientes. El desprendimiento puede ser causado por el aumento en la velocidad de un fluido, degradación enzimática endógena, procesos que contribuyen a la liberación de las EPS o de las proteínas de unión (Hall-Stoodley y col., 2004), y estos fenómenos a su vez pueden ser influenciados por el espesor de la biopelícula, disponibilidad de nutrientes, modificación de las propiedades de la superficie de la bacteria o la superficie a la que se encuentran adheridas, entre otros. El proceso de desprendimiento es seguido por el proceso de dispersión. En este proceso las bacterias liberadas pueden viajar a nuevos nichos y comenzar el proceso de formación de la biopelícula. Los métodos por los que ocurre el proceso de dispersión de la biopelícula incluyen la dispersión en la superficie, la dispersión de la biomasa de bacterias rodeada de EPS y la dispersión de las células bacterianas en el substrato o fluido circundante (Kumar y Anand, 1998).

#### II.3.2 Regulación de la formación de la biopelícula.

Tanto la estructura como la formación de las biopelículas se encuentran regulados por diversos factores, entre ellos, la expresión genética, las condiciones ambientales y la percepción y respuesta en quórum. Diversos estudios han indicado que la regulación de la expresión genética controla la iniciación del ciclo

de la formación de la biopelícula. Se han identificado numerosos genes, cuya expresión es esencial para la formación de la biopelícula. Entre esos genes, se incluyen los que regulan la adhesión a la superficie de las proteínas, la producción de flagelos, fimbrias y pili, y la producción de EPS (Hall-Stoodley y col., 2004). Por otra parte, de entre las condiciones ambientales que influyen en la formación de la biopelícula destacan la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, el pH, la osmolaridad, la disponibilidad de hierro y la tensión de oxígeno. La respuesta a las diferentes condiciones ambientales difiere entre un microorganismo y otro; por ejemplo, mientras que *P. aeruginosa* es capaz de formar una biopelícula en la mayoría de las condiciones que permiten el desarrollo, *E.coli* O157:H7 lo realiza sólo bajo condiciones de escasez de nutrientes (Davey y O'Toole, 2000). Finalmente se ha observado que la producción de algunas moléculas, como las lactonas, permiten la percepción y respuesta en quórum en las biopelículas (Watnick y Kolter, 2000). Se sabe que estas moléculas regulan el desarrollo de la biopelícula en varias especies bacterianas. Por ejemplo, un estudio demostró que las biopelículas formadas por una cepa mutante de *P. aeruginosa* (deficiente en la producción de acil-homoserina lactona) fueron más delgadas y menos resistentes al tratamiento con surfactantes, que las formadas por una cepa sin ningún tipo de deficiencia (Donlan, 2002).

### II.3.3 Biopelículas en la industria de los alimentos.

La permanencia de los microorganismos, patógenos o deterioradores, en las superficies donde se producen alimentos puede iniciar el proceso que lleve a la pérdida de frescura o de la inocuidad del alimento. Las biopelículas son un importante reservorio de contaminación microbiana y han recibido una gran atención por parte de los científicos y de la industria alimentaria. Pueden formarse en una diversidad de materiales, entre ellas, acero inoxidable, polipropileno, gomas y vidrio. Las superficies como el acero inoxidable, al ser más hidrofílicas, permiten una mejor adhesión y posterior formación de la biopelícula que superficies hidrofóbicas como el teflón (Chmielewski y Frank 2003). Algunos de los lugares en

la industria de alimentos donde se observa la formación de biopelículas con más frecuencia son: pisos, tuberías, material de goma, bandas transportadoras, intercambiadores de calor y torres de enfriamiento. Además, la formación de biopelículas genera serios problemas en las operaciones del procesamiento. Algunos de ellos son: la biocorrosión, la biosuciedad, el biodeterioro de los sistemas poliméricos y los bloqueos mecánicos. También afectan el tratamiento de ultrafiltración y ósmosis inversa, disminuyendo la permeabilidad o dañando la membrana (Kumar y Anand, 1998). Por otra parte, las biopelículas exhiben una mayor resistencia a los agentes antimicrobianos con respecto a su contraparte planctónica. Por ejemplo, un estudio indicó que un antibiótico de amplio espectro (ciprofloxacino) requería de 40 segundos para tratar una superficie limpia mientras que para penetrar una biopelícula de *P. aeruginosa* se requirieron 21 minutos (Blaschek y col., 2007).

Se ha reportado que las bacterias ácido lácticas son capaces de formar biopelículas. Somers y col., (2001) reportaron la presencia de biopelículas de bacterias ácido lácticas, no pertenecientes a los cultivos iniciadores, en una planta productora de queso cheddar. Millsap y col., (1997) describieron la adherencia de seis especies del género *Lactobacillus* a gomas y vidrio. También se observó la formación de biopelículas entre una mezcla de especies de levaduras y bacterias lácticas; a pesar de que no se observó el mismo fenómeno de manera individual (Kawarai y col., 2007). Algunos reportes han mencionado a las bacterias lácticas como formadores de biopelículas en alimentos crudos. Adicionalmente, Hiromi y col., (2008) evidenciaron la capacidad de tres cepas de *Lactobacillus* para formar biopelículas, bajo condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas, en vidrio.

#### II.3.4 Eliminación y control de las biopelículas.

La remoción de las biopelículas es una tarea muy difícil de realizar debido a la alta resistencia a agentes antimicrobianos que exhiben por la presencia de las EPS. Mientras que un escrupuloso lavado elimina aproximadamente el 90% de los

microorganismos adheridos a la superficie, la posterior desinfección elimina la totalidad de ellos (Chmielewski y Frank 2003). Por lo tanto, se debe implementar un procedimiento de limpieza que incluya un lavado seguido de un proceso de desinfección, con el fin de evitar la acumulación de nutrientes en las superficies, la adherencia de los microorganismos y la posterior formación de la biopelícula. Algunos de los factores que influyen en la efectividad del lavado y desinfección son: la dureza del agua, la fuerza física en el lavado, la temperatura y tiempo de duración del proceso, el agente químico utilizado, las características del contaminante, el tipo de superficie y el método y la velocidad de aplicación. También es importante que los detergentes se utilicen a una temperatura específica que garantice su máxima efectividad (Vlkova y col., 2008). La limpieza debe remover de manera efectiva los residuos de alimentos, y para tal fin se pueden combinar detergentes con fuerzas mecánicas, como el flujo turbulento de agua o un tallado energético. Algunos de los componentes activos en los detergentes son: agentes quelantes (EDTA), agentes no iónicos o aniónicos, ácidos y compuestos de cloro (Chmielewski y Frank 2003). La desinfección debe eliminar el 99.9% de los microorganismos presentes en la superficie. Los agentes desinfectantes pueden ser utilizados en forma de espuma, gel o solución líquida. Algunas de las características que se deben tomar en cuenta para la correcta utilización de un desinfectante son: rango de pH donde es más efectivo, especie microbiana contra quien se sabe es más efectivo, estabilidad en solución, temperatura a la que es más efectivo, toxicidad, daño a equipos, costo y reacción con materiales orgánicos (Vlkova y col., 2008). Entre los desinfectantes más comunes se encuentran: peróxidos, halógenos y compuestos cuaternarios de amonio. Otra manera de controlar la formación de las biopelículas es mediante el diseño apropiado de los equipos en la industria alimentaria. Equipos como tuberías, tanques y accesorios deben ser diseñados para prevenir la acumulación de materia orgánica y facilitar la limpieza y desinfección. Si el equipo no está bien diseñado se favorecerá la formación de la biopelícula a pesar de un adecuado programa de limpieza y desinfección. Por otra parte, existen nuevos métodos para el control de las biopelículas. Dichos métodos se encuentran agrupados en tres categorías;

métodos físicos, químicos y biológicos. Los métodos físicos incluyen campos magnéticos, campos eléctricos pulsados combinados con ácidos orgánicos o con antibióticos. Los métodos químicos incluyen el uso de monolaurin en combinación con un tratamiento térmico o con ácidos orgánicos, cloruro de cetilpiridinio y anhídridos y cloruro de benzoilo. Los métodos biológicos incluyen el uso de bacteriocinas, cultivos lácticos, exopolisacáridos y endoglicosidasas (Kumar y Anand, 1998). La incorrecta utilización de los detergentes y desinfectantes puede propiciar la sobrevivencia y posterior formación de la biopelícula en las superficies de equipos. Cepeda-Márquez y col., (2008), observaron que incluso después de un tratamiento de lavado y desinfección el promedio de bacterias lácticas en superficies que tienen contacto con directo con las salchichas fue de 2 log UFC/área. Adicionalmente el uso de bacteriófagos puede resultar una manera natural, altamente específica y no tóxica para el control de los microorganismos implicados en la formación de biopelículas (Ahn y Stiles, 1990; Leisner y col., 1996). Hiromi y col., (2008) observaron que las bacterias lácticas inmersas en biopelículas, formadas por 24 horas, eran entre 8% - 11% más resistentes al ácido acético que su contraparte planctónica. También se observó resistencia a soluciones de 30% y 40% de etanol; y a la misma concentración las células planctónicas se encontraban bajo el límite de detección ( $<10^2$  UFC/mL).

### **III. HIPÓTESIS.**

*Leuconostoc mesenteroides* es capaz de colonizar superficies de polipropileno en las condiciones de humedad relativa y temperatura prevalecientes en la empresa productora de salchicha.

## **IV. OBJETIVOS.**

### IV.1 General.

- Evaluar la influencia de factores ecológicos en la colonización de *Leuconostoc mesenteroides* adherido a una superficie de polipropileno.

### IV.2 Específicos.

- Determinar las condiciones de temperatura y humedad relativa prevalentes durante el proceso de producción de salchicha en una empresa.
- Determinar la capacidad de cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas de una planta procesadora de salchicha para colonizar superficies de polipropileno.
- Evaluar el efecto de la temperatura, humedad relativa y concentración de sólidos de salchicha en la colonización de *Leuconostoc mesenteroides* adherido a una superficie de polipropileno.

## V. METODOLOGIA.

### V.1 Materiales

#### V.1.1 Equipo

- \* Agitador mecánico Vortex, Velp Scientifica, n<sub>o</sub>.113123
- \* Autoclave eléctrica de mesa, Market-Forge, Mod. 199-85
- \* Balanza analítica, sensibilidad 0.0001g Sartorius y BL120S
- \* Balanza granataria, sensibilidad 0.1g OHAUS, modelo CT200-S
- \* Baño maría con termostato, Arfrank, Mod. 91
- \* Bolsas de polietileno en rollo sin marca comercial 25 x 35 cm
- \* Botes de plástico de 30 x 40 x 14
- \* Higrómetros Hygrochron, I Button
- \* Campana de flujo laminar, Alder, Veco
- \* Cuenta colonias, Quebec Reicher-Jung
- \* Homogeneizador Stomacher Laboratory Blender, Mod. 400 (BA 7021)
- \* Horno para esterilización, Shel-lab
- \* Incubadora con refrigeración (22°C, 30°C, 35°C), Precision Scientific
- \* Material de uso común en el laboratorio de microbiología
- \* Micropipetas 1-1000 µL, Labsystems, Brand, Genex Beta, Rainin, Gilson
- \* Microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM-950, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany
- \* Microscopio óptico Axiostar plus, Mod. 1169-149
- \* Olla de presión Presto Steele, Mod. 21 L y 12 L.
- \* Parrilla agitadora Cimarec 2, Mod. SP46925
- \* Pellets de polipropileno
- \* Potenciómetro, Jenway, 3510 pH Meter
- \* Refrigerador OSEDA Refrigeración
- \* Refrigerador REVCO, Thermo Scientific



- \* Ultracentrífuga Heraeus, Biofugue pico, Kendro

#### V.1.2 Medios de cultivo

- \* Agar MRS (Difco)
- \* Caldo MRS (Difco)
- \* Diluyente de peptona (Difco)

#### V.1.3 Reactivos

- \* Acido clorhídrico
- \* Bromuro de sodio
- \* Hidróxido de sodio
- \* Sulfato de amonio
- \* Sulfato de potasio
- \* Sólidos de salchicha al 0.5%,1% y 5% (p/v)
- \* Solución salina fisiológica 0.85%

#### V.1.4 Material Biológico

- \* Cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas de una planta procesadora de salchicha (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas de una planta procesadora de salchicha e identificadas mediante Biolog y PCR empleando iniciadores específicos para *Leuconostoc*

No. Cepa	Origen	Fecha de aislamiento
6	Emulsión embutida	16-julio-08
11	Salchicha marca 1 deteriorada	24-diciembre-07
13	Salchicha marca 2 deteriorada	11-mayo-08
17	Mezcla en tolva	13-mayo-08
18	Restos de emulsión en tolva	09-abril-08
22	Salchicha marca 1 deteriorada	28-abril-08
24	Salchicha marca 1 deteriorada	28-abril-08
26	Emulsión embutida	21-agosto-08
27	Emulsión embutida	21-agosto-08
28	Tijeras en empaçado	21-agosto-08
29	Salchicha en horno	13-agosto-08
30	Salchicha en horno	13-agosto-08
31	Tripa de salchicha en horno	13-agosto-08
32	Tripa de salchicha en horno	13-agosto-08
34	Banda elevadora	13-agosto-08
36	Banda elevadora	13-agosto-08
37	Banda transversal del distribuidor se salchicha	13-agosto-08
38	Banda transversal del distribuidor se salchicha	13-agosto-08
39	Banda transversal del distribuidor se salchicha	13-agosto-08
43	Salchicha en empaque	13-agosto-08
44	Distribuidor se salchicha	13-agosto-08
45	Distribuidor se salchicha	13-agosto-08
51	Salchicha en empaque	13-agosto-08
52	Salchicha en buchacas para completar paquetes	13-agosto-08
53	Banda transversal distribuidor de salchicha	08-septiembre-08
54	Guantes canjilones	13-agosto-08
55	Salchicha en horno	13-agosto-08
56	Hule de salchicha en horno	13-agosto-08
61	Salchicha en empaque	07-octubre-08
62	Emulsión embutida	05-noviembre-08
63	Emulsión embutida	05-noviembre-08
64	Emulsión embutida	05-noviembre-08
65	Emulsión embutida	14-noviembre-08
66	Salmuera	21-noviembre-08
67	Restos en tambor de enfriamiento	21-noviembre-08

Cuadro 1. Cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas de una planta procesadora de salchicha e identificadas mediante Biolog y PCR empleando iniciadores específicos para *Leuconostoc* (continuación)

68	Emulsión embutida	21-noviembre-08
69	Emulsión embutida	21-noviembre-08
72	Tripa en bote	13-agosto-08
75	Banda transversal distribuidor de salchicha	13-agosto-08
76	Banda transversal del distribuidor de salchicha	13-agosto-08
77	Distribuidor de salchicha	13-agosto-08
78	Hules retenidos en canjilones	13-agosto-08
79	Distribuidor de salchicha	13-agosto-08
80	Distribuidor de salchicha	13-agosto-08
81	Salchicha retenida para empacado	13-agosto-08
83	Tripa en bote	13-agosto-08
91	Salchicha marca 3 deteriorada	18-marzo-10
98	Salchicha marca 3 deteriorada	02-marzo-10

## V.2 Métodos

### V.2.1 Determinación de humedad relativa y temperatura durante la producción de salchicha en una empresa.

Se realizaron mediciones de humedad relativa y temperatura en tres puntos seleccionados dentro de las áreas posteriores a la cocción de las salchichas durante su elaboración. Las mediciones de ambos parámetros se llevaron a cabo con higrómetros (Hygrochron, I Button) previamente programados para tomar mediciones cada 10 minutos a lo largo de 3 días consecutivos.

### V.2.2 Determinación de la capacidad de cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas de un planta procesadora de salchicha para colonizar superficies de polipropileno.

#### V.2.2.1 Activación de las cepas

Se transfirieron 40µL de una suspensión de cada cepa en caldo MRS y se incubó a 30°C/24 horas; transcurrido ese tiempo se realizó una resiembra de 40µL del cultivo a caldo MRS pero esta vez se incubó a 30°C/48 horas. Se alcanzó una población de aproximadamente de 10 log UFC/mL.

#### V.2.2.2 Preparación del inóculo.

Se colocó 1mL de la cepa activada en un tubo eppendorf y se centrifugó a 4500rpm/15 minutos. El sobrenadante se decantó y el paquete celular se lavó con solución salina fisiológica (0.85%) en dos ocasiones más.

#### V.2.2.3 Preparación de la suspensión de salchicha

Se preparó una solución a 5% p/v de salchicha en diluyente de peptona (DP). La mezcla se homogeneizó durante cuatro minutos a alta velocidad en Stomacher® y se esterilizó a 121°C por 15 minutos en calor húmedo. A partir de la suspensión estéril se prepararon diluciones para tener concentraciones de 0.5%, 1% y 5%. Estas suspensiones se emplearon como vehículo y fuente de nutrientes durante los estudios de colonización.

#### V.2.2.4 Adhesión de *Leuconostoc mesenteroides* a polipropileno

Se promovió la adhesión sumergiendo los pellet de polipropileno en una suspensión de salchicha al 0.5% que contenía 9 log UFC/mL de *Leuconostoc mesenteroides*. Se incubaron a 30°C/ 4 horas. Los pellet se lavaron con solución salina fisiológica (5 veces) con el fin de remover las células no adheridas. Los lavados se realizaron por enjuague del pellet dentro del tubo eppendorf y posterior decantado de la solución.

V.2.2.5 Colonización y Recuento de *Leuconostoc mesenteroides* adherido a polipropileno.

Los pellets conteniendo las células adheridas se colocaron en una suspensión de salchicha al 1% y se incubaron a 30°C/24 horas. A las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas se extrajeron pellets y se lavaron (dos ocasiones) con solución salina fisiológica con el fin de remover las células no adheridas. Las células adheridas se removieron mediante un Vortex a 3000rpm/2minutos. Los recuentos de células viables se realizaron en agar MRS (30°C/48 horas).

V.2.3 Efecto de la temperatura, humedad relativa y concentración de sólidos de salchicha en la colonización de *Leuconostoc mesenteroides* adherido a una superficie de polipropileno.

V.2.3.1 Preparación de microambientes ajustados a diferentes humedades relativas.

Para generar humedades relativas de 60%, 86% y 97%, se utilizaron soluciones saturadas de NaBr, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (baker) respectivamente (Multon, 1984). Las humedades relativas obtenidas se verificaron con higrómetros (Hygrochron, I Button) previamente programados para tomar mediciones cada 10 minutos. Las soluciones se esparcieron uniformemente en el fondo de cajas de (30 x 40 x 14 cm).

V.2.3.2 Adhesión, colonización y recuento de *Leuconostoc mesenteroides* adherido a polipropileno.

Se utilizó una mezcla de 5 cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas de una empresa productora de salchichas y un modelo de esferas de polipropileno. Se promovió la adhesión por inmersión de las esferas en un homogeneizado de salchicha (0.5%p/v) inoculado con aproximadamente 9 log UFC/mL (V.2.1.4.). Se

almacenaron a 30°C/4h y se procedió al lavado. Las esferas con las células adheridas se sumergieron en suspensiones de salchicha estéril (1% y 5%) por 20 min. Se secaron en flujo laminar y se almacenaron a 4°C y 22°C con: 60, 86, y 97 de humedad relativa (HR). Se incluyó un nivel más que consistió en esferas que se mantuvieron dentro de las suspensiones de salchicha y se denominó 100%. Periódicamente se cuantificaron las células adheridas. A 4°C se cuantificó a los tiempos 0, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días y a 22°C se realizó a los tiempos 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas. La remoción se realizó en un Vortex a 3000rpm/2minutos y la cuantificación en agar MRS (30°C/48 horas).

#### V.2.4 Confirmación de la formación de la biopelícula mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

Para confirmar la formación de biopelículas de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* a las superficies de polipropileno, se empleó el microscopio electrónico de barrido. Las placas (círculos de 12mm de diámetro) se prepararon, de acuerdo al método descrito por Getz y col., (1983), con algunas modificaciones realizadas por Hernández-Iturriaga (2003).

Las placas con las células adheridas, en colonización o biopelícula se fijaron durante 3h en glutaraldehído (3%), seguido de 3h en tetraóxido de osmio (1%); ambos reactivos preparados en una solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.1 M (pH 7.36). Las placas con las películas fijadas, se deshidrataron en un gradiente de soluciones de alcohol etílico (de 10 a 100%) a 4°C. Después, se secaron en un desecador de punto crítico, se colocaron en un portamuestras y se recubrieron con carbón y oro. Finalmente se examinaron en un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM-950 operado a 10kV; provisto y operado por el laboratorio de Limnología y Ecología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

### V.2.5 Análisis estadístico.

De cada cinética de colonización se estimaron los parámetros cinéticos mediante el programa DmFit ([www.combase.com](http://www.combase.com)). El análisis estadístico consistió en un análisis de varianza de los parámetros de crecimiento obtenidos, velocidad de desarrollo y máxima población alcanzada mediante el programa JMP 5.0.1.

## VI. RESULTADOS

### VI.1 Determinación de humedad relativa y temperatura durante la producción de salchicha en una empresa.

En el Cuadro 2 se observan las condiciones de temperatura y humedad relativa prevalecientes en el ambiente de producción de una empresa productora de salchicha durante tres días de consecutivos. Estos datos se utilizaron para seleccionar las condiciones de humedad relativa y temperatura en las evaluaciones posteriores. Los mínimos y máximos nos permiten identificar los límites de variación y la media y mediana los valores promedio.

Cuadro 2. Temperatura y humedad relativa en 3 zonas seleccionadas en el proceso de producción de salchicha.

Zona	Temperatura (°C)	Humedad Relativa (%)
Salida del horno	Mínimo: 9.1 Media:18.6 Mediana:23.1 Máximo:28.1	Mínimo: 51.6 Media:72.7 Mediana:76.8 Máximo:94.5
Equipo de pelado	Mínimo:7.1 Media:19.1 Mediana:22.6 Máximo:27.6	Mínimo:48.5 Media:64.9 Mediana:61.1 Máximo:86.4
Banda transportadora	Mínimo: 8.1 Media:21.2 Mediana:22.2 Máximo:28.2	Mínimo:48.6 Media:65.3 Mediana:63.9 Máximo:94.6

Como puede verse en los valores mostrados en el Cuadro 2. Tanto la temperatura como la HR muestran una amplia variabilidad a lo largo del día. Estos cambios están generados principalmente por la salida de grandes cantidades de vapor del horno.



VI.2 Determinación de la capacidad de cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas de un planta procesadora de salchicha para colonizar superficies de polipropileno.

Esta etapa se evaluó individualmente la colonización de las 48 cepas en polipropileno (a 30°C), teniendo como fuente de nutrientes 1% de sólidos de salchicha. Se obtuvieron distintos parámetros cinéticos (fase lag, porcentaje de adherencia, velocidad de desarrollo y población máxima) de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* que permitieran identificar los fenotipos con mayor potencial colonizador. El objetivo fue escoger 4 cepas que presentaran la menor fase lag, el mayor porcentaje de adherencia, la mayor velocidad de desarrollo y la mayor población máxima. El Cuadro 3 muestra los parámetros obtenidos durante el experimento para cada una de las cepas. Están resaltadas las cepas con mayor potencial colonizador.

Cuadro 3. Tasa de adhesión, velocidad de desarrollo, duración de la fase lag y población máxima alcanzada de cepas de *Leuconostoc mesenteroides* a 30°C y 1% de suspensión de salchicha.

No. de cepa	Adherencia (%)	Velocidad (Log (UFC/cm <sup>2</sup> )/h)	Fase lag (horas)	Población máxima (Log UFC/cm <sup>2</sup> )
6	0.2569	0.6928	3.1657	7.6043
11	0.1431	0.8682	5.3583	7.0493
13	0.0935	0.5002	3.4037	7.2870
17	0.5644	0.4615	2.4343	7.9653
18	0.0538	1.0259	4.4893	8.3907
<b>22</b>	<b>2.3131</b>	0.5897	4.0380	7.1617
24	0.1610	0.4789	2.9673	6.1357
26	0.1201	0.4999	4.0700	6.6557
<b>27</b>	0.0293	0.3102	<b>0.3593</b>	7.5850
28	0.0086	0.4608	2.1823	6.8237
29	0.0074	0.6654	3.3820	6.9397
30	0.0866	0.4873	3.5183	7.6273
31	0.0339	1.0689	5.5273	7.4697
32	0.0758	1.3175	5.9550	7.7190
34	0.0541	0.4267	2.1083	6.7327
36	0.0138	0.7552	3.5177	7.5287
37	0.1243	0.6324	3.7563	7.8283

Cuadro 3. Tasa de adhesión, velocidad de desarrollo, duración de la fase lag y población máxima alcanzada de cepas de *Leuconostoc mesenteroides* a 30°C y 1% de suspensión de salchicha.

(Continuación)

38	0.0191	1.0088	1.5904	7.3933
39	0.0987	0.6880	4.5647	7.7377
43	0.1189	0.6051	3.1740	7.3320
44	0.0153	0.6737	3.1620	7.3567
45	0.5780	0.8783	1.0066	7.6260
51	0.1613	1.1132	2.8250	7.2073
52	0.4567	0.6437	5.3130	8.6617
53	0.6845	0.6002	5.1167	7.7890
<b>54</b>	0.6713	0.4759	4.4783	<b>8.8537</b>
55	0.0249	0.5107	1.4452	7.6597
56	0.0348	0.9763	2.4683	6.3763
61	0.2625	0.5887	3.1030	7.1703
62	0.6467	0.8881	2.3557	8.3803
<b>63</b>	0.0948	<b>3.5790</b>	3.6130	6.9213
64	0.6467	0.4547	1.2313	6.6147
65	0.0981	0.6064	4.9633	8.6690
66	0.3123	0.3681	4.0090	7.6833
67	0.0100	0.7814	0.5284	7.6073
68	0.6467	0.3116	2.3580	8.1130
69	0.0411	0.4197	1.9923	8.1607
72	0.2060	0.5651	2.6053	7.3720
75	0.6467	1.1549	0.6370	7.5260
76	0.6467	0.3816	2.7333	7.5370
77	0.6467	0.4643	3.6993	7.5340
78	0.6467	0.5853	2.0903	7.2147
79	0.4818	0.8421	5.0853	7.4003
80	0.6467	0.6993	4.7060	7.8340
81	0.0068	0.6107	2.0967	7.4493
83	0.0364	0.6843	4.5550	7.8053
91	0.0457	0.3447	3.2497	7.3707
<b>98</b>	0.0567	0.4968	2.7507	7.6317

El comportamiento de las cepas fue muy variado para todos los parámetros analizados; lo que exhibe la amplia heterogeneidad dentro de la misma especie. Se consideraron más relevantes los parámetros de velocidad de desarrollo y la

población máxima alcanzada. Ya que, si los microorganismos tienen capacidad para alcanzar niveles altos de células en poco tiempo dentro de una biopelícula se propicia su permanencia en las superficies. Con lo que se incrementa la probabilidad de que el deteriorador ingrese al alimento durante su producción.

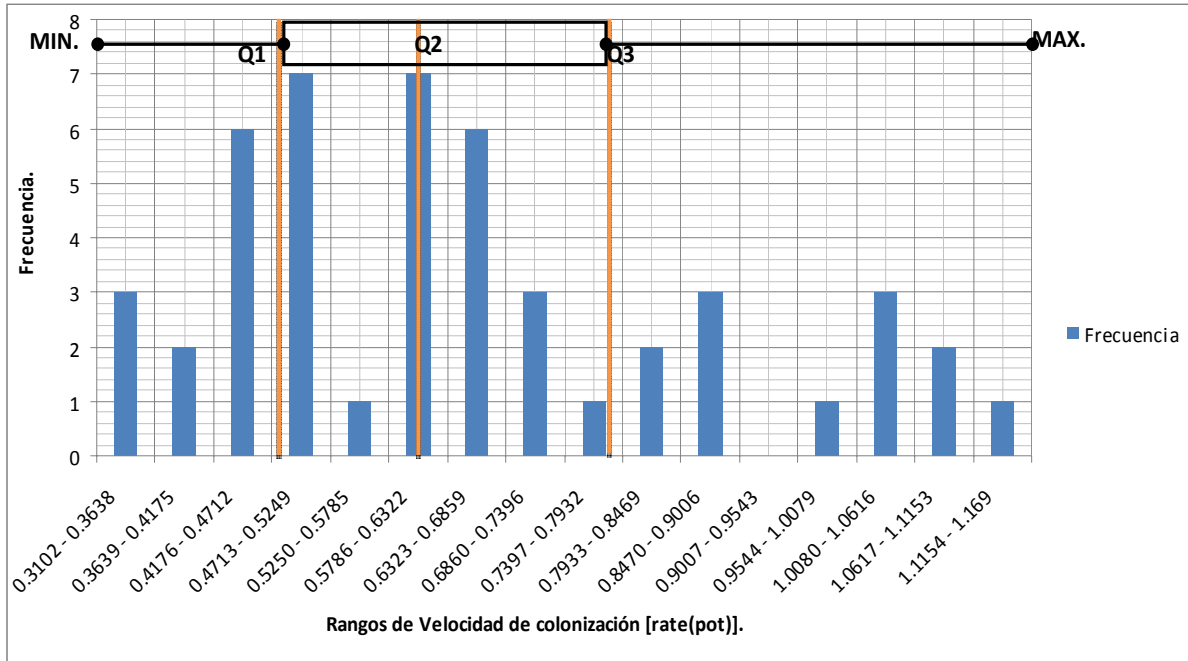


Figura 3. Distribución de los valores de velocidad de colonización de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides*.

La Figura 3 muestra los valores obtenidos para la velocidad de colonización de las cepas de *L. mesenteroides* a 30°C/1%SS. Se pueden observar 3 grupos de datos, siendo los que se encuentran entre la mediana y el percentil 0.25 los que presentan mayor frecuencia. No se observó la presencia de atípicos, y el grupo de datos que se encuentra en el rango 0.9544 – 1.169 (Log UFC/h) es el de mayor potencial colonizador.

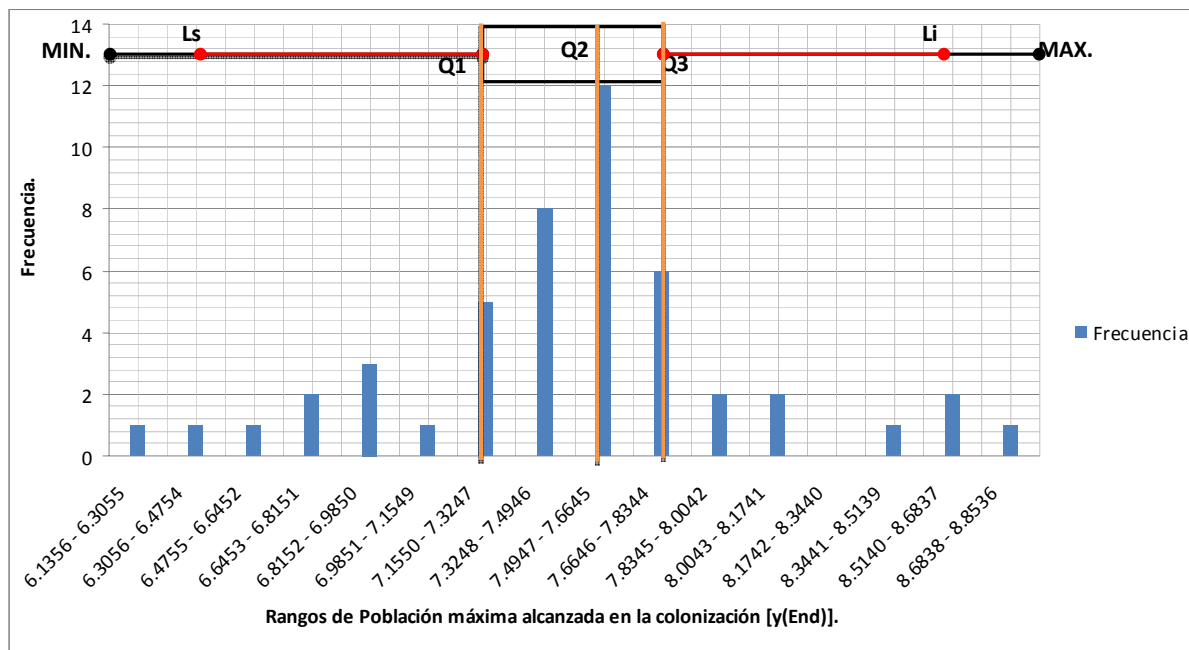


Figura 4. Distribución de los valores de población máxima alcanzada de las cepas *Leuconostoc mesenteroides*.

La Figura 4 muestra los rangos de valores obtenidos para la población máxima alcanzada en la colonización. La distribución se asemeja a una curva normal donde el mayor número de datos se encuentra en el centro. Justamente la mediana se encuentra encima de la barra que representa los datos de mayor frecuencia. En este caso se observan atípicos en los extremos, los cuales muestran la amplia heterogeneidad en un grupo de microorganismos de la misma especie. Los microorganismos que conforman el grupo del intervalo 8.3441 – 8.8536 (Log UFC/cm<sup>2</sup>) representan las cepas con mayor potencial colonizador. La cepa de mayor potencial colonizador es la que se ubica en el intervalo de datos 8.6838 – 8.8536 (Log UFC/cm<sup>2</sup>). Finalmente resultaría interesante determinar si la cepa o grupo de cepas con mayor velocidad de colonización corresponden a las cepas con mayor población máxima alcanzada. Significaría un microorganismo de excepcionales capacidades para desarrollar que sin duda representaría un riesgo para la vida de anaquel de las salchichas y posiblemente otros productos cárnicos.

En la Figura 5 se observa el comportamiento de las 5 cepas seleccionadas con base en sus parámetros cinéticos y el porcentaje de adherencia.

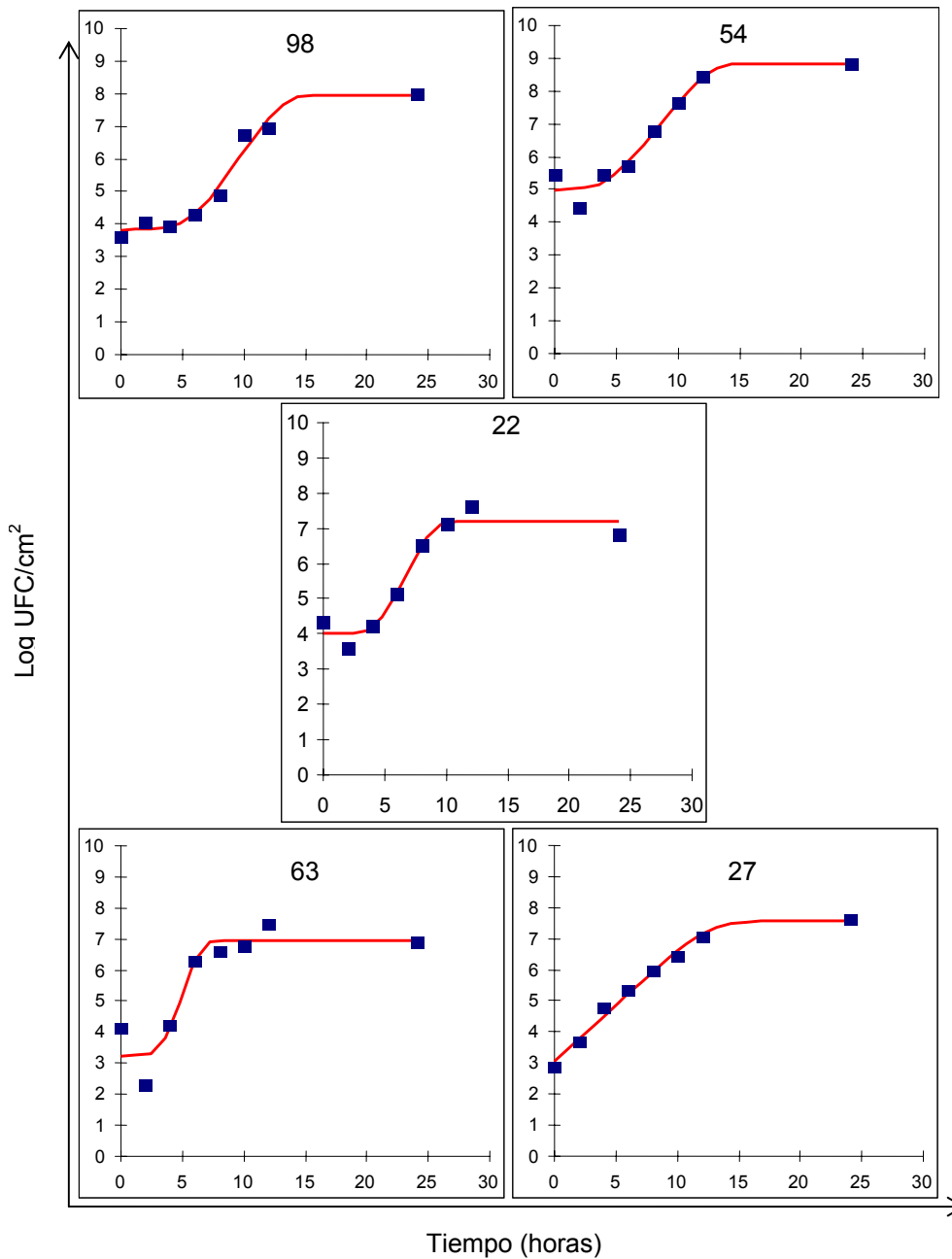


Figura 5. Comportamiento de cepas de *L. mesenteroides* con mayor capacidad de colonización a 30°C y 1% de sólidos de salchicha.

VI.3 Efecto de la temperatura, humedad relativa y concentración de sólidos de salchicha en la colonización de *Leuconostoc mesenteroides* adherido a una superficie de polipropileno.

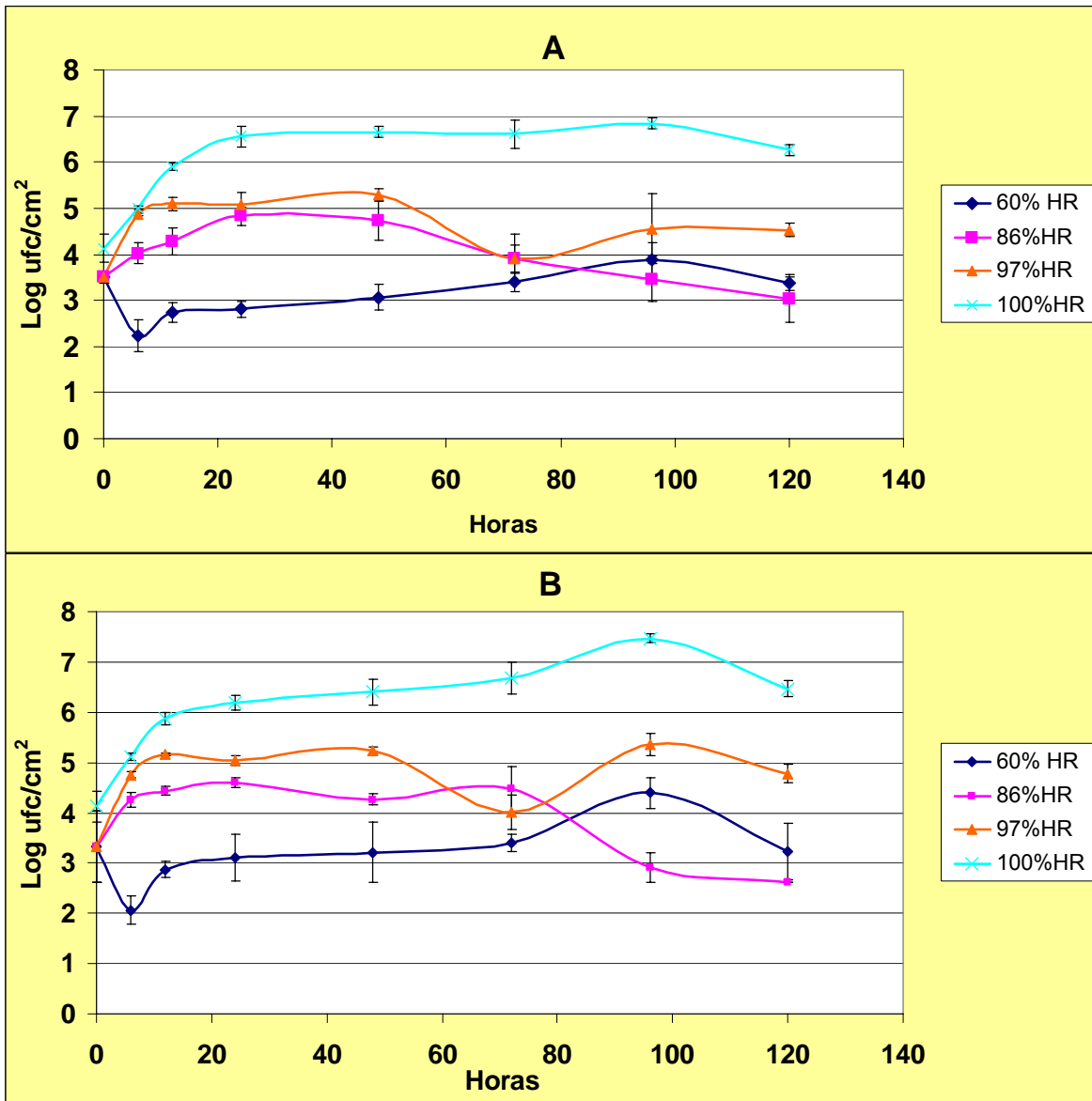


Figura 6. Cinéticas de desarrollo de *Leuconostoc mesenteroides* a 22°C, 4 niveles de humedad relativa y 1% de sólidos de salchicha (A) y 5% de sólidos de salchicha (B).

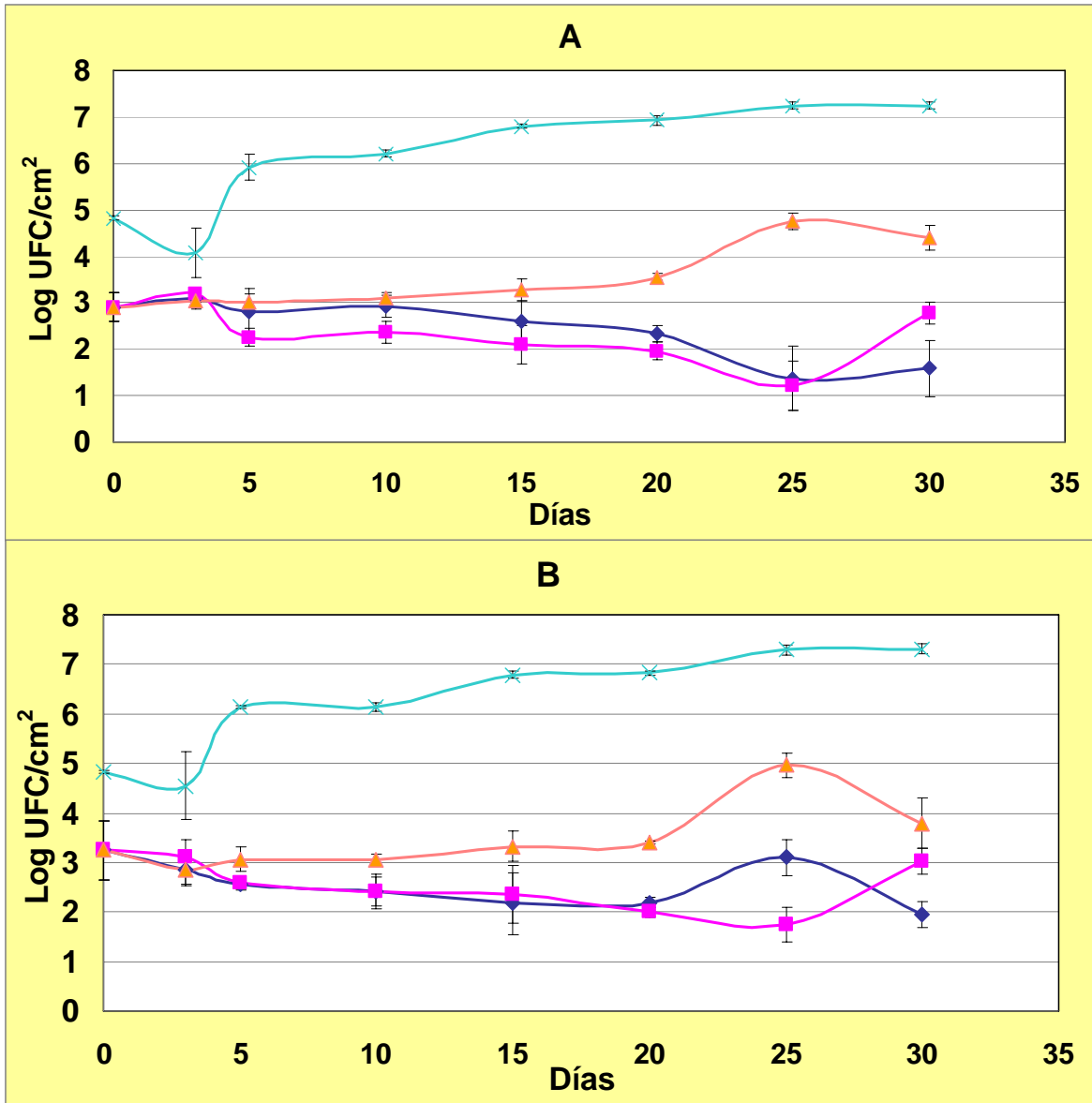


Figura 7. Cinéticas de desarrollo de *Leuconostoc mesenteroides* a 4°C, 4 niveles de humedad relativa y 1% de sólidos de salchicha (A) y 5% de sólidos de salchicha (B).

Cuadro 4. Parámetros cinéticos de velocidad y población máxima a 22°C ajustados con el programa DmFit. Niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Parámetros cinéticos ajustados con el DmFit.				
22°C				
	A 1% Sólidos de salchicha		A 5% Sólidos de salchicha	
HR	Velocidad	Población máxima	Velocidad	Población máxima
60%	0.1999 <b>AB</b>	4.9533 <b>C</b>	0.1534 <b>BC</b>	4.712 <b>C</b>
86%	0.2749 <b>AB</b>	5.369 <b>C</b>	0.2073 <b>AB</b>	5.4235 <b>C</b>
97%	0.2963 <b>AB</b>	5.326 <b>C</b>	0.3008 <b>AB</b>	5.206 <b>C</b>
100%	0.3390 <b>A</b>	6.7336 <b>AB</b>	0.3213 <b>AB</b>	6.3737 <b>B</b>

Cuadro 5. Parámetros cinéticos de velocidad y población máxima a 4°C ajustados con el programa DmFit. Niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.\* No desarrolló.

Parámetros cinéticos ajustados con el DmFit.				
22°C				
	A 1% Sólidos de salchicha		A 5% Sólidos de salchicha	
HR	Velocidad	Población máxima	Velocidad	Población máxima
60%	0.1999 <b>AB</b>	4.9533 <b>C</b>	0.1534 <b>BC</b>	4.712 <b>C</b>
86%	0.2749 <b>AB</b>	5.369 <b>C</b>	0.2073 <b>AB</b>	5.4235 <b>C</b>
97%	0.2963 <b>AB</b>	5.326 <b>C</b>	0.3008 <b>AB</b>	5.206 <b>C</b>
100%	0.3390 <b>A</b>	6.7336 <b>AB</b>	0.3213 <b>AB</b>	6.3737

Lo anterior significa que el efecto de la temperatura se reduce a un mínimo si la humedad relativa se encuentra en niveles elevados y viceversa; por tal motivo el control de solo uno de los parámetros no asegurará la prevención y control de la formación de biopelículas en el ambiente de producción.



VI.4 Confirmación de la formación de la biopelícula mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

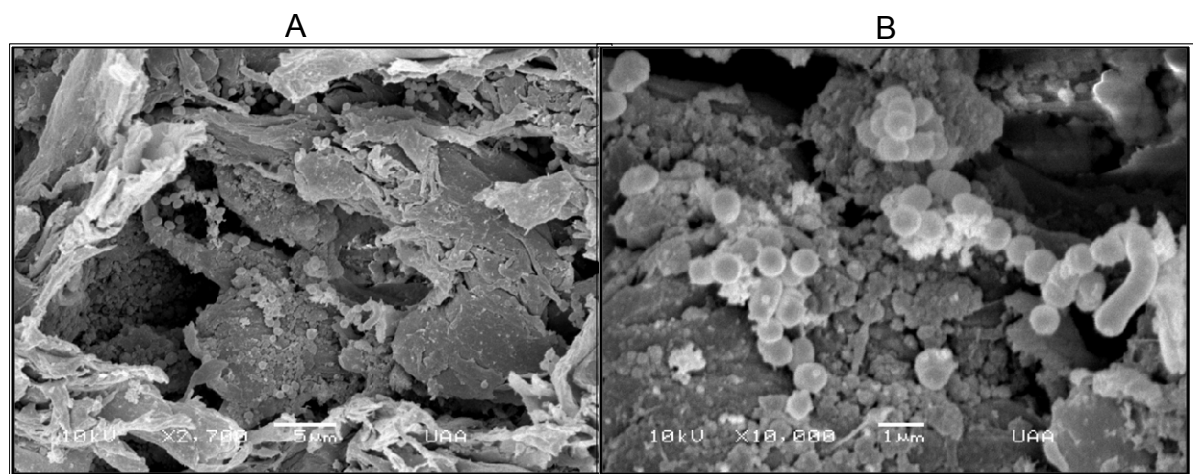


Figura 8. Micrografías de *Leuconostoc mesenteroides* colonizando superficies de polipropileno (72horas/22°C/100%HR). Imagen A (2700 ampliificaciones) e imagen B (10,000 ampliificaciones).

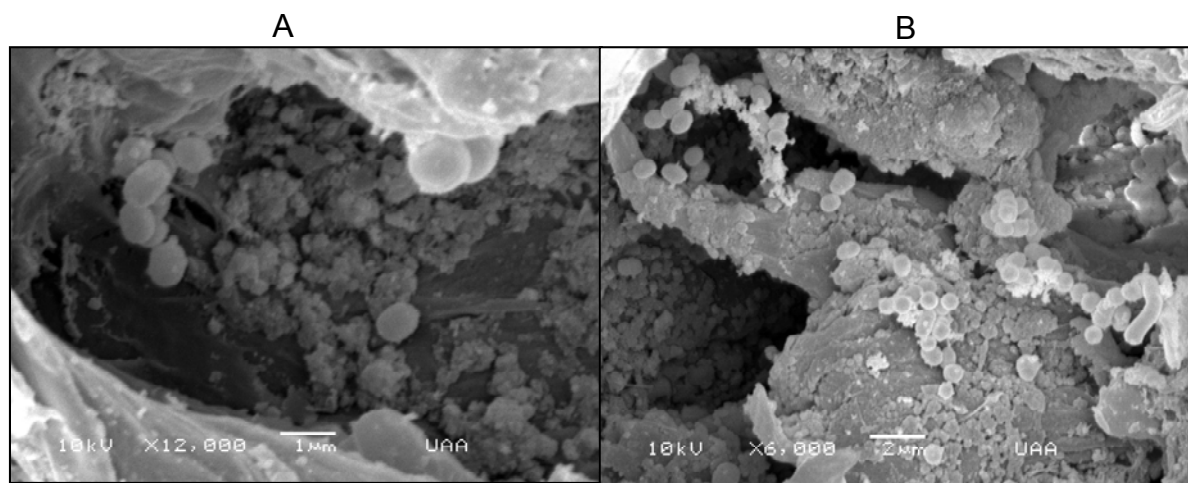


Figura 9. Micrografías de *Leuconostoc mesenteroides* colonizando superficies de polipropileno (72horas/22°C/100%HR). Imagen A (12,000ampliificaciones) e imagen B (6,000 ampliificaciones).

## VII. DISCUSIÓN

La sobrevivencia y/o desarrollo de los microorganismos en superficies de equipos se encuentra influenciada por el tipo de microorganismo, la superficie de contacto, la disponibilidad de nutrientes y las condiciones ambientales prevalecientes en el ambiente de producción. Para conocer algunas de las condiciones ambientales prevalecientes en el ambiente de producción de salchicha se realizaron mediciones de humedad relativa y temperatura en tres puntos seleccionados dentro de las áreas posteriores a la cocción de las salchichas durante su elaboración. Las mediciones se realizaron cada 10 minutos a los largo de 3 días consecutivos. El objetivo de las mediciones fue determinar los niveles a los que se realizará el experimento. Resulta alarmante que en un ambiente de producción de alimentos, que requieren mantener cadena de frío, la temperatura alcance niveles cercanos a la temperatura óptima de desarrollo de microorganismos deterioradores y patógenos. Estos niveles propician la proliferación no sólo de *L. mesenteroides* sino de todas las bacterias mesófilas que tengan la capacidad de competir con la flora residente en el ambiente de producción. El problema principal es la aparición de signos de deterioro y/o la proliferación de microorganismos patógenos que pudieran haber ingresado al alimento en alguna etapa del proceso. Por otra parte la temperatura más baja registrada (7.1°C) que todavía puede considerarse una temperatura adecuada de refrigeración se mantiene por pequeños intervalos de 10 minutos en un día de producción o durante un turno. Entonces, tomando en cuenta el potencial psicrótrofo de *L. mesenteroides* y que las bajas temperaturas registradas no son las condiciones prevalecientes, la proliferación se verá altamente favorecida. Por otra parte la humedad relativa alcanza niveles elevados (94%) por períodos de tiempo cortos (10 minutos); sin embargo recordemos que el tiempo de generación de algunas bacterias se encuentra entre 10 - 20 minutos. Lo que implica la posible proliferación intermitente.

Al analizar la capacidad de colonización de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* se determinaron las cepas con mayor potencial colonizador. Todas las cuales fueron utilizadas en la evaluación de la influencia de los factores ecológicos sobre la colonización de *Leuconostoc mesenteroides* adherido a polipropileno. Las cepas escogidas fueron la número 22, 27, 54 y 63. Debido a que las cepas seleccionadas fueron aisladas en el año 2008, se decidió añadir la cepa 98 cuyo aislamiento se realizó en el año 2010. La velocidad de colonización nos permite determinar que tan rápido proliferaría *Leuconostoc mesenteroides* en la superficie de polipropileno teniendo solamente sólidos de salchicha como fuente de nutrientes; tomando como referencia el valor de la mediana, en 5 horas se tendrá un aumento de 3 Log UFC/cm<sup>2</sup>. Si bien es cierto que una temperatura de 30°C y disponibilidad de nutrientes no son la escena más común en el ambiente de producción, permite poner de manifiesto el potencial colonizador de esta bacteria. Cifras 10<sup>7</sup> -10<sup>8</sup> UFC/g se asocian a signos de deterioro en salchichas debido al ataque directo sobre los aminoácidos, fuente primaria en el proceso putrefactivo, en ausencia de la glucosa que se ha agotado (Egan y col., 1980). Resulta entonces que un grupo de las cepas es capaz de alcanzar niveles cercanos a 10<sup>8</sup> UFC y podría en algún momento contaminar con números elevados el producto de tal manera que fuera necesario sólo un discreto desarrollo por parte del germen para generar cambios indeseables en las características del alimento.

Sin importar los géneros microbianos presentes en un alimento o superficie, serán los factores ecológicos los que determinarán la flora predominante (Ingram y Simonsen, 1980). Además, como ya se observó, las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* son capaces de colonizar bajo condiciones óptimas de desarrollo (30°C y disponibilidad de nutrientes). Sin embargo, es necesario evaluar el efecto de la temperatura, humedad relativa y concentración de sólidos de salchicha prevalecientes en la empresa en la colonización de *L. mesenteroides*.

Estas condiciones de temperatura representan el nivel óptimo registrado en el ambiente de producción de salchicha. Es de esperarse que la principal barrera

contra la proliferación microbiana sea la humedad relativa, puesto que la temperatura de 22°C se encuentra muy cercana a la temperatura óptima de desarrollo (30°C). Se encontró que a mayor humedad relativa, mayor colonización y viceversa. Hernández-Iturriaga (2003), observó desarrollo de *Salmonella* Montevideo a 22°C y 4 niveles de humedad relativa; sin embargo el aumento en la población durante la colonización fue muy parecida a la observada para *L. mesenteroides* a las mismas condiciones (97%HR/22°C), alcanzando una población de 6.31Log UFC/jitomate. Finalmente no se observó diferencia significativa entre las dos concentraciones de sólidos de salchicha.

La temperatura produce una disminución en la velocidad de desarrollo, sin embargo *Leuconostoc mesenteroides* se mantiene activo por su potencial psicrotrofo. Se ha observado en cepas de *S. Montevideo* inactivación a temperaturas de refrigeración y humedades de 97%. Aún a temperatura ambiente y a 97%HR la colonización en jitomate no sobrepasó los 3 Log UFC/jitomate después de 10 días, por lo que ambos factores ambientales pueden ser empleados para generar una barrera para la actividad microbiana (Hernández-Iturriaga, 2003). Diversos estudios han demostrado que la disminución de la temperatura disminuye la velocidad de desarrollo y por lo tanto de deterioro en alimentos por bacterias ácido lácticas (Borch y col., 1996).

La máxima población alcanzada y la mayor velocidad se obtuvo en el siguiente orden: 100%HR>97%HR>86%HR>60%HR. La concentración de salchicha no ejerció influencia sobre los parámetros de velocidad y población máxima. En la Figura 9 se observa el comportamiento de la mezcla de 5 cepas a 4°C, dos concentraciones de suspensiones de salchicha y 4 niveles de humedad relativa. Se observó una franca inactivación a 60%HR/4°C y 86%HR/4°C. Tanto a 97%HR como a 100%HR se observó desarrollo, sin embargo éste fue mucho más lento que a 22°C. La mayor humedad y disponibilidad de nutrientes a 100%HR permitieron a la bacteria alcanzar la fase estacionaria mientras que a 97%HR se observó aún en la fase logarítmica. De igual manera, *Listeria monocytogenes*

presentó desarrollo, sobrevivencia e inactivación a 97%HR, 75%HR y 60%HR respectivamente, independientemente de la temperatura (35, 22, 10 y 4°C) utilizada durante la colonización en espinaca cruda (Carranza, 2009).

En la Figura 10 observan agrupaciones de cocos adheridos a la superficie de polipropileno y los exopolisacáridos liberados. En la imagen A se observa como las bacterias al ingresar por los poros del material se adhieren en las paredes y liberan los exopolisacáridos que finalmente terminan englobándolas y les confieren resistencia a antibióticos (Costerton, 1999), agentes químicos y físicos. La configuración porosa del material les confiere una mayor protección contra agentes del medio y favorece la formación de la biopelícula. En la imagen B se observa la aglomeración de las bacterias, formando una biomasa de bacterias y exopolisacáridos que finalmente protegerá a las células más profundas. En la Figura 11, la imagen A muestra a los cocos adoptando diferentes formas, entre las que destacan, diplococos, tétradas y aglomeraciones más grandes. También se puede ver toda una pared cubierta por exopolisacáridos que favorecen la adhesión celular. En la imagen B se observan varios cocos mezclados con exopolisacáridos que le confieren rigidez a la unión y les permiten formar puentes entre dos zonas de la superficie.

En el cuadro 4 y 5 se observan los parámetros cinéticos de colonización de *Leuconostoc mesenteroides* bajo 4 niveles de humedad relativa, 2 concentraciones de salchicha y 2 temperaturas. No se observó diferencia significativa entre las dos concentraciones de salchicha. Tanto a 22°C como a 4°C la velocidad de desarrollo se encuentra influenciada por la humedad relativa; a menor humedad relativa menor velocidad de desarrollo. Obviamente la velocidad de desarrollo es menor a 4°C que a 22°C. La máxima población alcanzada a ambas temperaturas es casi la misma. La temperatura no afecta a la población máxima pero sí afecta a la velocidad de desarrollo. Más aún, la velocidad de desarrollo a los niveles más altos de humedad relativa y 4°C no es tan diferente a la velocidad a los niveles más bajos de humedad relativa y 22°C. Lo anterior significa que el efecto de la

temperatura se reduce a un mínimo si la humedad relativa se encuentra en niveles elevados y viceversa; por tal motivo el control de solo uno de los parámetros no asegurará la prevención y control de la formación de biopelículas en el ambiente de producción.

## VIII. CONCLUSIONES

Las condiciones de temperatura y humedad relativa prevalencias en la empresa son capaces de sostener la colonización de *Leuconostoc mesenteroides* adherido a superficies de polipropileno, al menos por períodos intermitentes a lo largo del día.

La colonización de *Leuconostoc mesenteroides* en polipropileno se encuentra influenciada tanto por la temperatura como por la humedad relativa, no así por la concentración de salchicha. Si ambos factores se encuentran en niveles bajos (7°C y 60%HR) el microorganismo deteriorador tenderá a la inactivación, pero si se encuentra en niveles elevados (22°C y 100%HR) su proliferación se verá altamente favorecida.

La temperatura de 4°C disminuye la velocidad de colonización pero no inhibe el desarrollo de un microorganismo psicrótrofo como *Leuconostoc mesenteroides*, ya que al cabo de 30 días de incubación se alcanzó la misma población que a 22°C/5 días.

La humedad relativa afecta tanto la velocidad de colonización como la población máxima, especialmente cuando la temperatura es cercana a la de refrigeración.

Finalmente a las condiciones más extremas 60%HR/4°C y 86%HR/4°C se observó una franca inactivación del microorganismo. Condición que puede ser propiciada en el ambiente de producción de alimentos para disminuir la formación de biopelículas en las superficies que contactan el alimento durante su producción.

## IX. BIBLIOGRAFIA

**Ahn, C., Stiles, M. E. 1990.** Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *Journal of Applied Bacteriology*. Vol. 69: 302–310.

**Allen, J. R., Foster, E. M. 1960.** Spoilage of vacuum-packed sliced processed meats during refrigerated storage. *Food Research*. Vol. 25: 19-25.

**Ayres, J. C. 1960.** The relationships of the organisms of the genus *Pseudomonas* to the spoilage of meat, poultry and eggs. *Journal of Applied Bacteriology*. Vol. 23: 471-486.

**Björkroth, J., Holzapfel, W. 2006.** The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. 3<sup>rd</sup> ed., Springer-Verlag, New York: 267 -319.

**Blaschek, H. P., Wang H. H., M. E. Agle. 2007.** Biofilms in the Food Environment. 1<sup>st</sup> ed., Blackwell Publishing, Iowa: 1-8.

**Borch, E., Kant-Muermans, M-L., Blixt, Y. 1996.** Bacterial spoilage of meat products and cured meats. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 33: 103-120.

**Borch, E., Agerhem, H. 1992.** Chemical microbial and sensory changes during the anaerobic cold storage of beef inoculated with a homofermentative *Lactobacillus spp.* or a *Leuconostoc spp.* *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 15: 99-108.

**Borch, E., Nerbrink, E., Svenson, P. 1988.** Identification of major contamination sources during processing of emulsion sausage. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 7: 317-330.

**Buchanan, R. L. 1986.** Processed meats as a microbial environment. *Food Technology*. Vol. 40: 134-139.

**Carranza, Y. 2009.** Comportamiento de *Listeria monocytogenes* en espinaca (*Spinacia oleracea*). Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de los alimentos. 46-58.

**CBE. 2008.** Center for Biofilm Engineering. Febrero 12 de 2011.



**Chmielewski, R. A. N., Frank, J. F. 2003.** Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Vol. 2: 22-32.

**COMECARNE. 2010.** Consejo Mexicano de la Carne. Febrero 5 del 2011.

**Costerton, J. W., Philip, S. S., Greenberg, E. P. 1999.** Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Science. Vol. 284: 1318-1322.

**Costerton, J. W., Geesey, G. G., Cheng, K. J. 1978.** How bacteria stick. Scientific American. Vol. 238: 86-95.

**Dainty, R. H., Mackey, B. M. 1992.** The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. Journal of Applied Bacteriology. Vol. 73: 103–114.

**Dainty, R. H., Shaw, B. G., Roberts, T. A. 1983.** Food Microbiology: Advances and Prospects. Academic Press, London: 151-178.

**Dankert, J., Hogt, A. H., Feijen, J. 1986.** Biomedical polymers: bacterial adhesion, colonization, and identification. Critical Reviews in Biocompatibility. Vol. 2: 219-301.

**Davey, M. E., O'Toole, G. A. 2000.** Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 64: 847-867.

**Donlan, R. M. 2002.** Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases. Vol. 8: 881-890.

**Dreeszen, P. H. 2003.** The Key to Understanding and Controlling Bacterial Growth in Automated Drinking Water Systems. 2<sup>ND</sup> ed., Edstrom Industries Incorporated, Wisconsin: 1-19.

**Durand, P. 2002.** Tecnología de los productos de charcutería y salazones. 1ra ed., Editorial Acribia, Zaragoza: 85-96.

**Egan, A. F. 1983.** Lactic acid bacteria of meat and meat products. Antonie Van Leeuwenhoek. Vol. 49: 327-336.

**Egan, A. F., Ford, A. T., Shay, B. J. 1980.** A comparison of *Microbacterium thermosphactum* and *Lactobacilli* as spoilage organisms of vacuum-packaged sliced luncheon meats. Journal of Food Science. Vol. 45: 1745-1748.

- Feigin, R. 1989.** Tratado de Pediatría. 1ra ed., McGraw-Hill Interamericana, México: 665-667.
- Fernández-Escartín, E. 2008.** Microbiología e inocuidad de los alimentos. 2da. ed., Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro: 41-55, 57-87, 515-542.
- Fox, J. B. 1966.** The chemistry of meat pigments. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 14:207-10.
- Frausto, J. J. 2010.** Diversidad Genética y Capacidad para formar Biopelículas de cepas de *Leuconostoc spp.* aisladas de una planta procesadora de salchichas. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de los alimentos. 40-42.
- Getz, S., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. 1983.** Scannig electron microscopy of infection sites and lesion development on tomato fruit infected whit *Pseudomonas syringae* pv. Tomato. Phytopathology. Vol. 73: 39-43.
- Gill, C. O. 1996.** Extending the storage life of raw chilled meats. Journal of Meat Science. Vol. 43: 99–109.
- Gill, C. O. 1986.** Advances in Meat Research. Vol. 2., AVI Publishing Company Incorporated, Westport: 49-88.
- Gill, C. O. 1983.** Meat spoilage and evaluation of the potential storage life of fresh meat. Journal Food Protection. Vol. 46: 444-452.
- Gill, C. O., Newton, K. G. 1978.** The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. Journal of Meat Science. Vol. 2: 207-216.
- Grau, F. H. 1986.** Advances in Meat Research. Vol. 2., AVI Publishing Company Incorporated, Westport: 1-47.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P. 2004.** Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases. Nature Reviews Microbiology. Vol. 2: 95-108.
- Hamasaki, Y., Ayaki, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Morita, H. 2003.** Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 69: 3668–3671.
- Hatheway, C. L. 1992.** Infectious Diseases. 1ra ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia: 1583-1587.

**Hernandez-Iturriaga**, Montserrat., Fernandez-Escartín, E., Beuchat, L. R., Martínez-Peniche, R. **2003**. Effect of inoculum size, relative humidity, storage temperature, and ripening stage on the attachment of *Salmonella* Montevideo to tomatoes and tomatillos. *Journal of Food Protection*. Vol. 66: 1756-1761.

**Herrera**, J., Cabo, M., González, A., Pazos, I., Pastoriza, L. **2007**. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Food Microbiology*. Vol. 24: 585-591.

**INEGI**. **2008**. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Febrero 8 de 2011.

**INEGI**. **2003**. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Febrero 10 de 2011.

**Ingram**, M., Simonsen, B. **1980**. International Commission for the Microbiological Specifications of Foods (ICMSF). Vol. 2., Academic Press, London: 303-409.

**Jones**, R. J. **1999**. Immunisation against lactic-acid bacteria as a technique to extend the chilled storage life of vacuum-packed lamb. *Food and Agricultural Immunology*. Vol. 11: 75– 81.

**Kawarai**, T., Furukawa, S., Ogihara, H., Yamazaki, M. **2007**. Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeast. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 73: 4673–4676.

**Kempton**, A. G., Bobier, S. R. **1970**. Bacterial growth in refrigerated, vacuum-packed luncheon meats. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 16: 287-297.

**Kitchell**, A. G., SHAW, B. G. **1975**. Lactic Acid Bacteria in Beverages and Foods. Fourth Long Ashton Symposium 1973., Academic Press, London: 209-220.

**Kochhar**, S. P. **1996**. Food Taints and Off-Flavours. 2<sup>nd</sup> ed., Chapman & Hall, London: 168–225.

**Korkeala**, H., Suortti, T., Makela, P. **1988**. Ropy slime formation in vacuum-packed cooked meat products caused by homofermentative *Lactobacilli* and a *Leuconostoc* species. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 7: 339–347.

**Korkeala**, H., Lindroth, S., Ahvenainen, R., Alanko, T. **1987** Interrelationship between microbial numbers and other parameters in the spoilage of vacuum-packed cooked ring sausages. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 5: 311-321.

**Kraft**, A. A. **1986**. *Advances in Meat Research*. Vol. 2., AVI Publishing Company Incorporated, Westport: 191-208.

**Kubota**, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., Uchiyama, H. **2008**. Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to Environmental Stress. *Journal of bioscience and bioengineering*. Vol. 106: 381–386.

**Kumar**, C. G., Anand, S. K. **1998**. Significance of Microbial Biofilms in Food Industry: A Review. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 42: 9-27.

**Leisner**, J. J., Greer, G. G., Stiles, M. E. **1996**. Control of beef spoilage by a sulphide-producing *Lactobacillus sake* strain with bacteriocinogenic *Leuconostoc gelidum* UAL187 during anaerobic storage at 2 °C. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 62: 2610– 2614.

**Lewin**, R. **1984**. Microbial adhesion is a sticky problem. *Science*. Vol. 224: 375-377.

**Li**, K.Y., Torres, J.A. **1993**. Effects of temperature and solute on the minimum water activity for grow and temperature characteristic of selected mesophiles and psychrotrophs. *Journal of food processing and preservation*. Vol. 17: 305 - 318.

**Mah**, T. F., O'toole, G. A. **2001**. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*. Vol. 9: 34-39.

**Millsap**, K. W., Reid, G., Van Der Mei, H. C., Busscher, H. J. **1997**. Adhesion of *Lactobacillus* species in urine and phosphate buffer to silicone rubber and glass under flow. *Biomaterials*. Vol. 18: 87–91.

**Mittelman**, M. W. **1998**. Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms in Fluid Processing Operations. *Journal of Dairy Science*. Vol. 81: 2760-2764.

**Mol**, J. H. H., Hietbrink, J. E. A., Mollen, H. W. M., Van Tinteren, J. **1971**. Observations on the microflora of vacuum packed sliced cooked meat products. *Journal of Applied Bacteriology*. Vol. 34: 377-397.

**NMX-F-065-1984**. Norma Mexicana de Alimentos. Salchichas. Especificaciones. Febrero 12 de 2011.

**Nortje**, G. L. **1987**. Microbial Ecology of Fresh Meat with Reference to the Abattoir, Wholesale and Retail Situations. Pretoria. University of Pretoria. Dissertation Submission Ph. D. Thesis.

**Nortje**, G. L., Visser, D., Holzapfel, W. H., Naudé, R. T. **1979**. The influence of various production processes on the microbiology of manufactured meat products. *South African Journal of Animal Science*. Vol. 9: 177-183.

**Papathanasopoulos**, M. A., Franz, C. M. A. P., Dykes, G. A., Von Holy, A. **1991**. Antimicrobial activity of meat spoilage lactic acid bacteria. *South African Journal of Science*. Vol. 87: 243-246.

**Prandl**, O., Fischer, A., Semidhofert, T., Sinell, H.J., **1994**. Tecnología e Higiene de la Carne. ACRIBIA S.A., Zaragoza: 854.

**PROFECO**. **2010**. Procuraduría Federal del Consumidor. Febrero 12 de 2011.

**Reuter**, G. **1981**. Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity. Academic Press, London: 253-258.

**Ridgeway**, H. F., Olson, B. H. **1981**. Scanning electron microscopic evidence for bacterial colonization of a drinking water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 41: 274-278.

**Rosen**, B. A., Appeltaum, B., Hult, S. C. **1981**. Microbial Adhesion to Surfaces. Halstead, New York: 201-225.

**Shaw**, B. G., Puckey, D. J., MacFie, H. J. H., Bolt, S. J. **1985**. Classification of some lactic acid bacteria from vacuum-packed meats by direct probe mass spectrometry. *Journal of Applied Bacteriology*. Vol. 59: 157– 165.

**Shaw**, B. G., Latty, J. B. **1981**. Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity. Academic Press, London: 259-268.

**Shi, X., X. Zhu. 2009.** Biofilm Formation and Food Safety in Food Industries. Trends in Food Science & Technology. Vol. 20: 407-413.

**Somers, E. B., Johnson, M. E., Wong, A. C. 2001.** Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. Journal of Dairy Science. Vol. 84: 1926–1936.

**SSA. 2010.** Secretaría de Salud México. Febrero 13 de 2011.

**Stamer, J. R. 1976.** Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects. AVI Publishing Company Incorporated, Westport: 404– 426.

**Steele, J. E., Stiles, M. E. 1981.** Microbial quality of vacuum packaged sliced ham. Journal of Food Protection. Vol. 44: 435-439.

**Upton, M. L. 1995.** Relationships between pathogen growth and the general microbiota on raw and processed meat and poultry. Journal of Food Safety. Vol. 15: 133-144.

**USDA. 2011.** United States Department of Agriculture. Febrero 12 de 2011.

**Vlkova, H., Babak, V., Seydlova, R., Pavlik, I., Schlegelova, J. 2008.** Biofilms and Hygiene on Dairy Farms and in the Dairy Industry: Sanitation Chemical Products and their Effectiveness on Biofilms. Czech Journal of Food Sciences. Vol. 26: 309-323.

**Von Holy, A., Holzapfel W. H., Dykes, G. A. 1992.** Bacterial populations associated with Vienna sausage packaging. Food Microbiology. Vol. 9: 45-53.

**Von Holy, A., Cloete, T. E., Holzapfel, W. H. 1991** Quantification and characterization of microbial populations associated with spoiled, vacuum-packed Vienna sausages. Food Microbiology. Vol. 8: 95-104.

**Von Holy, A., Holzapfel, W. H. 1988.** The influence of extrinsic factors on the microbiological spoilage pattern of ground beef. International Journal of Food Microbiology. Vol. 6: 269-280.

**Von Holy, A. 1983.** Bacteriological Studies on the Extension of the Shelf Life of Raw Minced Beef. Pretoria. University of Pretoria. Master Science Thesis.

**Watnick, P., Kolter, R. 2000.** Biofilm, City of Microbes. Journal of Bacteriology. Vol. 182: 2675-2679.

**WCRF International. 2011.** World Cancer Research Fund International. Febrero 15 de 2011.

**Yano, Y., Kataho, N., Watanabe, M., Nakumura, T. 1995.** Changes in the concentration of biogenic amines and application of tyramine sensor during storage of beef. Food Chemistry. Vol. 54: 155-159.

**Zobell, C. E. 1943.** The effect of solid surfaces upon bacterial activity. Journal of Bacteriology. Vol. 46: 39-56.