



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTO

“Capacidad deterioradora y de formación de biopelículas de bacterias ácido lácticas aisladas de una planta procesadora de jamón cocido rebanado y su interacción con *Listeria monocytogenes*”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta

Q.F.B. SILVIA MARTÍNEZ RIVERA

Dirigido por:

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. NOVIEMBRE 2014.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

PROGRAMA DE POSGRADO DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)
MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Capacidad deterioradora y de formación de biopelículas de bacterias ácido lácticas aisladas de una planta procesadora de jamón cocido rebanado y su interacción con *Listeria monocytogenes*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta:

Q.F.B. Silvia Martínez Rivera

Dirigido por:

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

SINODALES


Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Presidente


Firma

Dr. Gregory Ross Siragusa
Secretario

Dr. Gregory Ross Siragusa
Firma

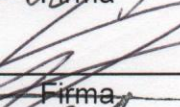
Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Vocal



Firma


Dr. Ramón Álvar Martínez Peniche
Suplente


Firma

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Suplente


Firma


M. en S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad


Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Basta un poco de espíritu aventurero para estar siempre satisfechos, pues en esta vida, gracias a dios, nada sucede como deseábamos, como suponíamos, ni como teníamos previsto.

Noel Clarasó

RESUMEN

Las empresas procesadoras de embutidos han introducido al mercado el jamón cocido y rebanado. El jamón cocido lleva un tratamiento térmico suficiente que garantiza su calidad microbiana; sin embargo, las operaciones de pelado, rebanado y empacado al vacío incrementan el riesgo de una contaminación con microorganismos deterioradores tales como bacterias ácido lácticas y patógenos como *Listeria monocytogenes*, microorganismos que pueden estar presentes en el medio ambiente de una planta procesadora. El objetivo de este trabajo fue caracterizar bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas durante el procesamiento de jamón cocido rebanado (JCR) de acuerdo a su capacidad deterioradora y de formación de biopelículas, y establecer su interrelación con *L. monocytogenes* en superficies inertes. Se aislaron 32 cepas de BAL de una línea procesadora de JCR. Las cepas de BAL se inocularon de manera individual (10^3 UFC/g) sobre paquetes de jamón pasteurizado (10 g). Los paquetes fueron sellados al vacío y almacenados a 4 y 25 °C durante 30 y 7 días, respectivamente. Periódicamente se realizó una inspección visual con la finalidad de detectar alteraciones en el JCR. La habilidad para formar biopelículas de las cepas aisladas de BAL se llevó a cabo mediante una técnica espectrofotométrica (análisis de adhesión de cristal violeta) incubando a 4 y 25 °C. Para ambas condiciones de almacenamiento 12 cepas de BAL mostraron los cambios visuales en el jamón en los periodos de tiempo más cortos (después de 35 días a 4 °C y 3 días a 25 °C). Trece cepas mostraron las densidades ópticas más altas lo que indica una alta formación de biopelículas. Se seleccionaron las 5 cepas (34, 37, 121, 122 y 123) que mostraron la mayor capacidad deterioradora de jamón y la más alta formación de biopelículas. Las cepas se identificaron como: *Lactobacillus casei* (Cepa 34), *Lactobacillus paracasei* (Cepa 37), *Lactobacillus graminis* (Cepa 121), *Lactobacillus sakei* (Cepa 122) y *Lactobacillus curvatus* (Cepa 123). Posteriormente, se realizaron pruebas de interacción entre células planctónicas de cada cepa de BAL con *L. monocytogenes* en CST y extracto de jamón (10%). En CST a 25 °C para la cepa 122 existió una disminución de 2 log UFC/ml de *L. monocytogenes* comparada con su control, no observándose algún comportamiento similar cuando eran incubadas en Extracto de Jamón al 10%. Finalmente, se evaluó la interacción sobre acero inoxidable de la mezcla de las cinco cepas de BAL y la cepa de *L. monocytogenes* en CST y extracto de jamón. En CST a 25 °C se alcanzó una DO de 0.48 para la mezcla de BAL con el patógeno y no se observó una disminución en la población del patógeno. En extracto de jamón a 25 °C se alcanzó una DO de 0.28 y se logró observar una disminución de la población de *L. monocytogenes* (1 Log UFC/ml) comparado con el control. A 4 °C para CST y extracto de jamón se obtuvieron resultados similares a lo observado a 25 °C, sin embargo la producción de biopelículas fue menor. Por lo que existe un peligro inminente de que al establecerse las BAL en la planta procesadora pueda impactar en una eventual adhesión y persistencia de *L. monocytogenes*, al mostrar un desarrollo óptimo del patógeno cuando interactúa con BAL en una biopelícula.

Palabras clave: Bacterias ácido lácticas, *Listeria monocytogenes*, deterioro, biopelículas y jamón.

ABSTRACT

Processing companies have entered at the market the sliced cooked ham. The cooked ham takes a sufficient heat treatment to ensure their microbial quality; however, stripping operations, sliced and vacuum packed increase the risk of contamination with spoilage microorganisms (lactic acid bacteria mainly) and pathogens such as *Listeria monocytogenes*. Both types of microorganisms might be present in the environment of a processing plant. The objective of this study was to characterize lactic acid bacteria (LAB) isolated during processing of sliced cooked ham (SCH) according to their spoilage and biofilm formation capacity and establish its interaction with *L. monocytogenes* on inert surfaces. 32 LAB strains were isolated from a processing line of SCH. LAB strains were individually inoculated (10^3 UFC/g) on pasteurized ham packages (10 g). Ham were sealed, vacuumed package and stored at 4 and 25°C during 30 and 7 days, respectively. Periodically (7 days for 4°C and every 24 hours for 25°C) a visual inspection was conducted to detect alterations in ham characteristics. To determine strain's biofilm formation ability, a spectrophotometric technique (crystal violet binding assay) was used and incubated at 4 and 25°C. At both storage conditions twelve LAB strains showed the shortest time to cause visual changes in ham samples ($p > 0.05$). At 4°C ham spoilage was observed after 35 days, while at 25°C it takes only 3 days. Regarding to biofilm formation ability, 13 LAB strains demonstrated the highest optical densities that are related with biopolymers formation ($p > 0.05$). Then, we selected 5 LAB strains (34, 37, 121, 122 y 123) because they have the higher spoilage and biofilm formation capacity. The strains were identified as: *Lactobacillus casei* (strain 34), *Lactobacillus paracasei* (strain 37), *Lactobacillus graminis* (strain 121), *Lactobacillus sakei* (Cepa 122) and *Lactobacillus curvatus* (Cepa 123). Subsequently, the interaction between planktonic cells of each LAB strain with *L. monocytogenes* in trypticase soy broth (TSB) and ham extract (10%) was evaluated. In TSB at 25°C for strain 122 there was a decrease of 2 log CFU / ml of *L. monocytogenes* compared to control, a similar behavior was not observed when they were incubated in Ham Extract 10%. Finally, the interaction of five LAB strains and *L. monocytogenes* on stainless steel in TSB and ham extract was evaluated. In TSB at 25°C was reached an OD of 0.48 for the mixture of LAB with the pathogen and not a decrease was observed in the pathogen population. Ham extract at 25 ° C was reached an OD of 0.28 and a reduction of the population of *L. monocytogenes* (1 log CFU / ml) compared to the control was observed. At 4°C to ham extract and TSB were obtained similar results to that observed at 25°C, however the biofilm formation was lower. Biofilm formation on stainless steel promotes the survival of *L. monocytogenes* and LAB, under optimal growth conditions (TSB 25°C) and the simulated conditions of the plant (Ham extract at 4°C). So there is an imminent danger that favor the establishment of LAB in the processing plant that impact on eventual attachment and persistence *L.monocytogenes* by not observe any antagonistic effect when interacting with LAB inside the biofilm.

Key words: Lactic acid bacteria, *Listeria monocytogenes*, spoilage, biofilm, ham.

DEDICATORIA

A mis padres y hermano, por apoyarme en cada sueño, todo lo que soy ahora es gracias a ustedes.

LOS AMO

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por mostrarme cada día algo nuevo, por las alegrías y dificultades, por cada nuevo comienzo.

A mis padres, que son mi orgullo y motivación, aún en la distancia nos unimos más que nunca. Mi gratitud, admiración y amor para ustedes siempre.

A mi hermano por ser mi confidente, mi refugio y quien me entiende como nadie.

A mis amigos de hace tiempo y a las maravillosas personas que conocí en mi estancia durante la maestría, de cada uno de ustedes me llevo un momento, palabra y detalle que me acompañará a lo largo de mi vida. A César por todos los lindos momentos compartidos y por cada palabra de aliento. Gracias a mi Pau y Adri, sin ustedes esta aventura no habría sido la misma, las adoro y son mi mayor regalo.

A la Dra. Monserrat Hernández, por confiar en mí y aceptarme como tesista, por mostrarme lo gratificante que es amar tu profesión.

A cada uno de los miembros de mi comité por sus aportaciones y por ayudarme a realizar las cosas de la mejor manera, en especial al Dr. Ramón P. por todo su entusiasmo y apoyo.

A CONACYT por la beca otorgada para la realización de este proyecto y meta profesional.

MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE

Índice

Índice de cuadros

Índice de figuras

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN.....	15
II. ANTECEDENTES	17
II.1 Jamón	17
II.1. Características	17
II.2. Proceso de elaboración.....	19
II.3. Problemas asociados a la producción de jamón	24
II.3.1 Deterioro (tipos).....	24
II.3.2 Impacto económico del deterioro de jamón.....	26
II.3.3 Método de prevención del deterioro	27
II.2. Microbiota asociada a jamón cocido rebanado.....	29
II.2.1 Microorganismos patógenos (<i>Listeria monocytogenes</i>)	29
II.2.1.1 Características	29
II.2.2 Microorganismos deterioradores	30
II.2.2.1 Bacterias ácido lácticas.....	31
II.2.2.1.1 Características	31
II.3. Prevalencia de los microorganismos en las plantas procesadoras...	33
II.3.1 Formación de biopelículas	33
II.3.2 Interacción entre microorganismos dentro de una biopelícula	36

III.	JUSTIFICACIÓN	38
IV.	OBJETIVOS	39
	IV.1 Objetivo general	39
	IV.2 Objetivos específicos.....	39
V.	METODOLOGÍA	40
	V.1 Materiales.....	40
	V.1.1 Equipos y materiales.....	40
	V.1.2 Medios de cultivo	41
	V.1.3 Reactivos	41
	V.1.4 Material biológico	41
	V.2 Identificación preliminar de bacterias ácido lácticas	42
	V.3 Determinación de la capacidad deterioradora	42
	V.3.1 Preparación e inoculación de las muestras	42
	V.3.2 Análisis de las muestras	43
	V.4 Determinación de la capacidad de formación de biopelículas	43
	V.5 Identificación bioquímica	44
	V.6 Identificación molecular	45
	V.6.1 Extracción de ADN.....	45
	V.6.2 Secuenciación por 16 rDNA.....	45
	V.6.3 Análisis de datos e identificación de las especies.....	46
	V.7 Interacción entre bacterias deterioradoras y <i>L. monocytogenes</i>	46
	V.7.1 Interacción entre células planctónicas (en suspensión)	46
	V.7.2 Interacción en acero inoxidable	47

V.9 Análisis estadístico	48
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
VI.1 Identificación y selección de BAL	49
VI.2 Caracterización fenotípica de las cepas de BAL	51
VI.2.1 Determinación de la capacidad deterioradora.....	51
VI.2.2 Determinación de la capacidad de formación de biopelículas	58
VI.3 Identificación de las BAL seleccionadas.....	66
VI.4 Interacción entre BAL y <i>L. monocytogenes</i> en medio líquido y acero inoxidable.....	68
VII. CONCLUSIONES	81
VIII. BIBLIOGRAFÍA	83
APÉNDICE A	89
APÉNDICE B	91
APÉNDICE C	102
APÉNDICE D	104

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Denominación comercial de jamón por su tipo de carne.	17
2	Especificaciones técnicas que determinan la calidad del jamón.	18
3	Especificaciones microbiológicas del jamón según la NOM-158-SCFI-2003.	19
4	Mezcla de reacción para la reacción de PCR	45
5	Pruebas de identificación de cepas BAL	49
6	Presencia de deterioro (días) en JCR inoculado con BAL almacenado a 25 y 4°C	51
7	Valores de densidad óptica obtenida por cada cepa de BAL asociados a la producción de biopolímeros en caldo MRS y extracto de jamón.	59
8	Identificación bioquímica de cepas de BAL seleccionadas	66
9	Cepas identificadas por la secuenciación del gen 16S Rdna De cultivos puros de BAL seleccionadas.	67
10	Parámetros de desarrollo de las BAL en caldo MRS y Extracto de jamón (10%).	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diagrama de flujo del proceso de elaboración de Jamón cocido rebanado.	23
2	Fases de formación de una biopelícula.	34
3	Procedimiento para la identificación bioquímica mediante el sistema BIOLOG.	44
4	Morfología microscópica de cepas de microorganismos aislados durante el procesamiento de JCR. A) Frotis de levaduras, B) Frotis con bacilos Gram positivos, C) Frotis de bacilos Gram negativos.	50
5	Signos de deterioro observado en las muestras de JCR inoculadas con BAL. A) Cambio de coloración; B) Producción de líquido lechoso; C) Producción de gas.	52
6	Contenido de BAL en JCR almacenado a 25°C con signos de deterioro.	53
7	Contenido de BAL en JCR almacenado a 4°C con signos de deterioro.	54
8	Correlación entre el crecimiento de BAL y la presencia de deterioro en JCR almacenado a 25°C.	56
9	Correlación entre el crecimiento de BAL y la presencia de deterioro en JCR almacenado a 4°C.	57
10	Formación de biopelículas por BAL en medio MRS y Extracto de jamón a 25 y 4 °C	61
11	Formación de biopelículas por BAL en caldo MRS y Extracto de jamón (10%) a 25°C	62
12	Formación de biopelículas en caldo MRS y Extracto de Jamón al 10% almacenado a 4°C.	62

13	Análisis de correlación entre la capacidad de deterioro de JCR y la formación de biopelículas a 25 °C.	64
14	Análisis de correlación entre la capacidad de deterioro de JCR y la formación de biopelículas de BAL a 4°C.	65
15	Interacción en células planctónicas entre BAL: A (Cepa 34), B (Cepa 37), C (Cepa 121), D (Cepa 122) y E (Cepa 123) seleccionadas y <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 en CST a 25°C.	70
16	Interacción en células planctónicas entre BAL: A (Cepa 34), B (Cepa 37), C (Cepa 121), D (Cepa 122) y E (Cepa 123) seleccionadas y <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 en Extracto de jamón a 25°C.	72
17	Interacción entre células planctónicas de BAL y <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 en CST incubado a 4°C: A (Cepa 34), B (Cepa 37), C (Cepa 121), D (Cepa 122) y E (Cepa 123) seleccionadas en Extracto de Jamón al 10% a 25°C.	73
18	Interacción entre células planctónicas de BAL y <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 en Extracto de Jamón al 10% incubado a 4°C: A (cepa 34), B (cepa 37), C (cepa 121), D (cepa 122) y E (cepa 123)	75
19	Crecimiento y formación de biopelículas en una mezcla de BAL y <i>L. monocytogenes</i> sobre placas de acero inoxidable inmersas en CST y extracto de jamón durante el almacenamiento a 25°C. A) Poblaciones microbianas en CST; B) Cuantificación de biopelículas en extracto de jamón.	76
20	Crecimiento y formación de biopelículas en una mezcla de BAL y <i>L. monocytogenes</i> sobre placas	78

	de acero inoxidable inmersas en CST y extracto de jamón durante el almacenamiento a 4°C. A) Poblaciones microbianas en CST; B) Cuantificación de biopelículas en extracto de jamón.	
21	Contenido de BAL en JCR sin pasteurizar y y pasteurizado	89
22	Ejemplo de la comparación del crecimiento observado en caldo MRS y extracto de jamón en las BAL seleccionadas.	93
23	Gel de integridad de las BAL seleccionadas. M= marcador de peso molecular.	102
24	Gel de electroforesis de los productos de PCR obtenidos de las BAL seleccionadas. M= marcador de peso molecular.	103
25	Recuento después de cada uno de los lavados de las placas de acero inoxidable con solución salina fisiológica (SSF). La línea roja representa el límite de detección de la técnica. Los números representan el número de lavados realizados.	105
26	Recuperación de BAL después de someter las placas de acero inoxidable inmersas en SSF al tratamiento mecánico (vortex) y de sonicación. la línea roja representa el límite de detección de la técnica.	106

I. INTRODUCCIÓN

Durante la producción de jamón cocido y rebanado (JCR) se tienen procesos subsecuentes al tratamiento térmico, lo que implica una manipulación del producto, que incrementa el riesgo de contaminación por microorganismos deterioradores y patógenos (principalmente *Listeria monocytogenes*). El deterioro del jamón se puede presentar como gasificación, mal olor y líquido viscoso.

El jamón cocido es un alimento con bajo contenido de sal (~2 %), con valores de pH alrededor de 6.0 y una actividad de agua superior a 0.95, estos factores no representan obstáculos para el crecimiento de microorganismos.

Dentro del grupo de bacterias deterioradoras se encuentran principalmente las bacterias ácido lácticas (BAL), en ellas se ha estudiado su capacidad de formación de biopelículas, lo que les permite la sobrevivencia dentro de una planta procesadora, aunado a las características propias de este grupo bacteriano.

Uno de los principales patógenos asociados al JCR es *L. monocytogenes*, debido a que es ubicua, psicótrofa, halotolerante y formadora de biopelículas, lo que le podría permitir convivir con las bacterias deterioradoras presentes, al compartir ciertas características.

La capacidad de formación de biopelículas compartida por las BAL (bacterias deterioradoras) y el patógeno de interés les permite crear resistencia ante agentes antimicrobianos como los desinfectantes, evitar la deshidratación, reforzar su resistencia ante el estrés ambiental, además de permitir a los microorganismos capturar nutrientes.

La interacción entre las bacterias deterioradoras y *L. monocytogenes* genera un gran interés en la industria productora de embutidos, debido a que se busca garantizar la calidad de los productos, donde la inocuidad juega un rol principal. Sin embargo, escasa es la información respecto a la posible interacción

entre ambos tipos de bacterias dentro de biopelículas que pueden llegar a formarse en los equipos de una planta procesadora de productos cárnicos, específicamente de JCR. Por lo tanto, el objetivo de éste trabajo fue elucidar las interacciones que pueden presentar tanto las bacterias deterioradoras de jamón cocido rebanado con patógenos como *L. monocytogenes* en el ambiente de una planta procesadora.

II. ANTECEDENTES

II.1 Jamón

II.1. Características

Los jamones se encuentran en el grupo de productos cárnicos procesados, los cuales, según la NOM-213-SSA1-2002 se definen como “productos elaborados con carne, vísceras, sangre o sus mezclas, curados o no, que son sometidos a proceso térmico. Pueden presentarse enteros, en cortes, emulsionados o troceados” (Fernández, 2008).

Con la finalidad de contar con la denominación y clasificación comercial del jamón, así como las especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas, organolépticas dentro de los Estados Unidos Mexicanos se cuenta con la Norma Oficial Mexicana (NOM) 158-SCFI-2003. Otro de los apartados dentro de la norma describe los métodos de prueba a realizarse en este alimento (% humedad, % grasa, % proteína, % fécula) y la información comercial que deben contener los envases del producto. El jamón cocido se clasifica en función de la carne utilizada (Cuadro 1).

Cuadro 1. Denominación comercial de jamón por su tipo de carne.

Denominación comercial	Definición
Jamón o jamón de pierna	Los elaborados exclusivamente con carne de la pierna trasera del cerdo (con o sin hueso)
Jamón de pavo	Los elaborados exclusivamente con carne del muslo del pavo
Jamón de cerdo y de pavo	Los elaborados con un mínimo del 55 % de carne de cerdo y el resto con carne de pavo

Jamón de pavo y de cerdo

Los elaborados con un mínimo del 55% de carne de pavo y el resto con carne de cerdo.

NOM-158-SCFI-2003

Para asegurar una correcta comercialización del producto dentro del territorio nacional, deben de cumplir con las especificaciones mostradas en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Especificaciones técnicas que determinan la calidad del jamón.

Denominación comercial	% PLG* Mínimo	% Grasa Máximo	% Humedad máximo	% Proteína adicionada	% Carragenina Máximo	% Fécula Máximo
Extrafino	18	6	75	0	1.5	0
Fino	16	6	76	2	1.5	0
Preferente	14	8	76	2	1.5	5
Comercial	12	10	76	2	1.5	10
Económico	10	10	76	2	1.5	10

*Proteína libre de grasa, incluyendo en su caso la proteína adicionada.

NOM-158-SCFI-2003

Las especificaciones organolépticas de conformidad con lo establecido en la NOM-158-SCFI-2003 para este alimento son:

- Color: Rosado característico.
- Olor: Agradable, característico, exento de olores extraños.
- Sabor: Agradable, característico, exento de sabores extraños.
- Consistencia: Firme, compacta y el aspecto del producto debe ser terso.

De acuerdo a la aplicación de la NOM-158-SCFI-2003 se deben cumplir con las especificaciones sanitarias y microbiológicas para el jamón cocido

establecidas en las normas oficiales mexicanas NOM-122-SSA1-1994 y la NOM-145-SSA1-1995 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Especificaciones microbiológicas del jamón según la NOM-158-SCFI-2003

Microorganismo	Límite máximo
Mesófilos aerobios	100,000 UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	Negativo
Hongos y levaduras	< 10 UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	100 UFC/g
<i>Salmonella spp</i>	Negativo en 25 g
Coliformes fecales	3 NMP/g

Recientemente se han lanzado al mercado nuevas presentaciones para la venta de jamón, tal es el caso del jamón cocido rebanado (JCR) y empacado al vacío. Debido a la demanda de los consumidores por productos de alta calidad y bajos niveles de conservadores así como tiempos mínimos para la preparación de alimentos (Peck & Stringer., 2005). Una de las desventajas de esta presentación es que posterior al proceso de cocimiento, el producto es manipulado durante los procesos de rebanado, pesado y empacado al vacío. Convirtiéndose en la principal causa de contaminación de microorganismos patógenos y deterioradores (Samelis *et al.*, 1998).

II.2 Proceso de elaboración

El jamón cocido es producido de acuerdo a estándares y formulación establecidos por cada empresa (Figura 1). Es importante una buena selección de la carne a utilizar para elaborar el jamón, y los factores más importantes a considerar son el valor de pH de la carne y sus características microbiológicas. El pH de la carne está asociado a diversos factores pero el más importante para la elaboración del jamón es la capacidad de la carne para retener agua (Mora, 2010).

Se recomienda seleccionar piezas con pH de 5.8 y 6.2; los jamones con estos valores de pH cuentan con una buena retención de agua, proporcionando un buen rendimiento en la fabricación, una textura blanda y jugosa (Mora, 2010). La carne usada debe ser de las extremidades posteriores del cerdo, fresca y cortada en grandes piezas (López y Quiroga, 2004).

En la carne cruda es deseable que las bacterias no deseadas se encuentren en cantidades mínimas al comienzo de la curación; después se deben mantener condiciones que permitan el desarrollo óptimo de las bacterias típicas de la carne curada (Fernández, 2008).

Los pasos para la elaboración del jamón cocido, son los siguientes:

- a) **Desengrasado y deshuesado:** Los músculos se separan de los huesos, después se corta cada músculo individualmente de grasa intramuscular, nervios, ganglios y tendones, al resultante se le denomina magro de la pieza y al total magro de la canal. Este proceso facilitará la disponibilidad de las proteínas proporcionando así una mejor adherencia de todos y cada uno de los pedazos de carne (Toldrá, 2010).
- b) **Curado:** La carne es sensible a la descomposición bacteriana, que produce olores, seguidos de producción de limo y rupturas estructurales. El propósito de la curación es prevenir o retrasar este proceso natural de descomposición. Esto se realiza cambiando las propiedades de las carnes a fin de prevenir el crecimiento de bacterias que de otra manera causarían una rápida descomposición.

Durante este proceso la carne fresca es inyectada con una solución previo al proceso de cocción. Algunos de los ingredientes de la salmuera son: cloruro de sodio, azúcar, nitrito de sodio, nitrato de sodio, eritorbato de sodio, fosfato de sodio, cloruro de potasio, agua y saborizantes en algunos casos (sabor ahumado). Cabe destacar que ingredientes como el ascorbato

de sodio ayuda a la preservación de la carne así como el desarrollo del color e intensificación del sabor. Los nitratos y nitritos contribuyen al sabor del curado y al color rojo-rosado tan característico del jamón, además de inhibir el crecimiento de *Clostridium botulinum* (USDA, 2012).

Al añadir estas sales, las condiciones de desarrollo son menos apropiadas para las bacterias que provocan alteraciones de la carne, pero son más apropiadas para otra especie de bacterias que pueden tolerar la sal, nitritos, nitratos, etc. El proceso microbiológico neto que ocurre durante el curado consiste por lo tanto en la sustitución de la flora de la carne (principalmente *Pseudomonas*) por una flora de carne curada (principalmente lactobacilos y micrococos).

En el curado la salmuera penetra en las células de la carne y permite a las fibras musculares inflamarse. Debido al espacio limitado para esta inflamación de las miofibrillas y a la cantidad mínima de salmuera usada (2%), la disolución entre las miofibrillas musculares se encuentra limitada (Toldrá, 2010).

- c) Masajeado:** Durante este proceso la pieza curada es sometida a compresión mecánica y por lo tanto de una fragmentación seguida de una homogenización de la pieza. Durante el masajeado se logra la fragmentación de la carne, la extracción de las proteínas lo que previene la separación de la salmuera durante y después del proceso de cocción; así como el ablandamiento de la carne (Toldrá, 2010).
- d) Reposo, embutido y moldeado:** El proceso de reposo dura entre ocho y 12 horas (previniendo el desarrollo microbiano debido a que durante el masajeado al liberarse las proteínas ofrece un medio idóneo)

En el embutido y moldeado, la carne se meterá en bolsas plásticas, la presión ejercida previene o al menos minimiza la humedad o la separación de la emulsión de carne. También evita que pudieran quedar huecos que pudieran llenarse de líquido durante el proceso de cocción (López y Quiroga, 2004).

De manera general la temperatura de cocción para el jamón es de 65 a 75 °C, finalizando cuando el centro de la pieza se encuentre a esa temperatura. En la cocción las miofibrillas inflamadas con la salmuera se ponen suaves y la salmuera permanece dentro del producto, dejando una textura jugosa en el jamón (Toldrá, 2010).

Durante la cocción las proteínas presentes en la carne se desnaturalizan y esto causa un cambio estructural de la carne, como la destrucción de las membranas celulares, encogimiento de las fibras musculares, la agregación y la formación de gel de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares, además del encogimiento y solubilización del tejido conectivo y colágeno presente (Nikmaram., *et al.* 2011). La importancia de la coagulación de las proteínas durante el proceso de cocción radica en la unión que se forma entre la carne ayudando a que al rebanar el jamón, éste se mantenga compacto (Pioselli., *et al.* 2011).

- e) **Enfriamiento:** El jamón cocido debe enfriarse hasta alcanzar una temperatura en el centro de la pieza de 20 °C, para poder ser refrigerado a 4 °C no rebasando esta temperatura (Griethuysen., *et al.* 2001).

Un buen enfriamiento de las piezas de jamón repercutirá en una buena cohesión de la matriz alimenticia. Se requiere que este proceso dure de 24 a 48 horas, a fin de asegurar que el color y las demás características organolépticas del producto se hayan estabilizado. Siempre asegurando que el centro de la pieza se encuentre a 4 °C o menos (Lagares, 2014).



Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de jamón cocido rebanado.

II.3. Problemas asociados a la producción de jamón

II.3.1 Deterioro

El deterioro de los alimentos se asocia al cambio organoléptico de éste, que lo hace inaceptable para el consumidor ó no apto para el consumo humano. Los alimentos pueden ser objeto de deterioro físico, químico y biológico (Hicks, 2014).

El jamón cocido rebanado es un producto de cárnico considerado como altamente perecedero. Esto se debe a su bajo contenido de sal (2% aproximadamente en fase acuosa), un pH de alrededor de 6.0 y una actividad de agua mayor a 0.945, lo que ocasiona que este producto pueda favorecer el desarrollo para los microorganismos típicamente asociados a la contaminación post-procesamiento (Bacterias ácido lácticas principalmente) (Kotzekidou, P & Bloukas, J.G. 1996).

Las carnes cocidas y curadas empacadas al vacío no son productos estériles pero se pueden producir con un mínimo de carga microbiana y mediante la refrigeración evitar su desarrollo. En el caso de la descomposición del jamón se presenta un agriado, comúnmente con proteólisis, putrefacción con desprendimiento de olores desagradables, formación de mucosidad, gasificación y colores anormales. Cuando la temperatura se aleja de los 0-3 °C éste proceso se acelera (Toldrá, 2010).

Tipos de deterioro

a) Defectos de origen

Los defectos que se presentan previos al sacrificio pueden tener su origen en el tipo de alimentación o alguna posible enfermedad. Otra causa es la alteración por no respetar el periodo de reposo necesario antes del sacrificio, lo que trae como consecuencia una disminución en el contenido

de ácido láctico provocando un elevado valor de pH. En tales condiciones la mioglobina tiende a una forma más oscura.

También es frecuente que durante la práctica del sacrificio se produzcan alteraciones del color debidas a la intervención de los procesos bioquímicos y que son atribuidos al desarrollo de gérmenes con capacidad oxidante y que originan metamioglobina o la aparición de ciertos microorganismos que al desarrollarse producen pigmentos anormales.

Debido a una refrigeración incorrecta también se pueden originar defectos, que dan lugar a músculos pegajosos, pálidos, blandos y con poca consistencia (Fernández, 2008).

b) Defectos tecnológicos

La aplicación de una tecnología defectuosa puede dar lugar a alteraciones como acortezado (por una desecación muy rápida, originando una costra superficial impermeable que impide la pérdida de agua), ablandado (también producido por un proceso de elaboración acelerado), excesos en el salado (aunque la cantidad de sal sea la misma, unos jamones pueden ser más salados que otros por la penetración favorecida por un mayor contenido en grasa), agrietado (debido a una desecación excesiva y que puede ser un punto de desarrollo e invasión de coleópteros y dípteros), coloraciones anormales (puede tener varios orígenes, como pueden ser impurezas presentes en la sal, o la presencia de gérmenes que actúan sobre la mioglobina dando tonalidades verdes), presencia de mohos (Samelis 1998). Algunos ejemplos son:

Sabor salado: Se encuentra en función del contenido de grasa de la pieza sometida a salazón. Es una alteración difícilmente controlable, ya que en las piezas no se pueden detectar a simple vista los excesos de salado.

Sabor aceitoso: La elaboración a temperaturas superiores a las normales da lugar a una activación de las lipasas que hidrolizan a los triglicéridos de las grasas dejando una gran cantidad de ácidos grasos libres, que son los que proporcionan un sabor aceitoso.

Sabor rancio: Se debe a la oxidación de los ácidos grasos insaturados, la cual se ve favorecida por la luz y las temperaturas elevadas.

c) Defectos de almacenamiento incorrecto.

Se originan a lo largo de la vida comercial del jamón por defectos provocados por cortes o golpes y consiguiente penetración de microorganismos (Aymerich, 2005).

d) Defectos de origen microbiano.

Los procesos que afectan a la sanidad del jamón que pueden provocar una putrefacción profunda de origen microbiano incluyen: una alimentación inadecuada, ausencia de reposo del animal, sangría mal realizada, evisceración defectuosa, uso de material higiénicamente poco recomendable y una aplicación de sal poco homogenizada que no permite al cloruro de sodio impedir la proliferación de microorganismos causantes de la putrefacción (Fernández, 2008).

II.3.2. Impacto económico del deterioro del jamón

Los alimentos deteriorados, generalmente se consideran no aptos para el consumo. El costo económico del producto deteriorado, no sólo involucra el retiro del producto dañado del mercado, sino también su posible sustitución por uno nuevo, en el punto de venta. No obstante, las pérdidas económicas no sólo atañen a los productores, sino también a los distribuidores e incluso a los consumidores,

ya sea por la elevación de precios o la restricción de su abastecimiento, o por simple pérdida del producto en conservación en su cocina (Fernández, 2009).

Un eficiente control de la temperatura de los alimentos desde su fabricación, permite disminuir las pérdidas económicas por deterioro, principalmente en las fases de transporte y almacenamiento en los centros de acopio y abasto (Comisión del Codex Alimentario, 1995; FAO, 1996). Esto contribuye a abatir el problema de deterioro que ocasionalmente irrumpe de forma explosiva en una industria.

Actualmente la industria de carnes frías se ve afectada por fallas y/o carencias en la cadena de frío durante la comercialización del alimento, lo cual compromete la conservación del producto terminado (FAO. 1996). Un control exhaustivo de las buenas prácticas de manufactura y sanitarias en la elaboración del jamón, así como la implementación de barreras que controlen eficientemente el deterioro prematuro, son acciones que pueden garantizar al mercado, no sólo productos de buena calidad, sino también de aceptable estabilidad comercial.

II.3.3 Métodos de prevención del deterioro

La vida de anaquel se define como el periodo de tiempo bajo condiciones de almacenamiento establecidas, posterior a la manufactura o empaque, durante el cual un producto permanece seguro para su consumo. En otras palabras, durante este periodo de tiempo, el producto deberá mantener sus características sensoriales, químicas, físicas y microbiológicas (Man, D. 2002).

La predicción de la vida de anaquel por las empresas permite un buen control del almacenamiento del producto y a su vez, de minimizar pérdidas económicas (Raab., *et al.* 2008).

El término de la vida de anaquel para el jamón cocido rebanado, puede definirse como la presencia de un alto nivel de recuento de microorganismos los

cuales se consideren como máximos inaceptables así como la presencia de un nivel inaceptable de cambio de color, de textura, olor, sabor o formación de líquido lechoso (Borch, E., *et al.* 1996).

Una vez vistos los defectos y alteraciones más frecuentes que pueden presentarse, se debe indicar la forma en que éstos pueden ser prevenidos adoptando una serie de medidas higiénicas y sanitarias que alejen tales peligros.

En primer lugar, habrá de tenerse en cuenta el animal vivo que servirá como materia prima para elaborar el jamón, antes del sacrificio debe tener un ayuno de 18-20 horas, reduciendo así los riesgos de una posible contaminación de la canal producida por la flora intestinal.

Preparada la canal para la evisceración, la refrigeración debe de hacerse rápidamente, de forma que la temperatura del centro llegue a 7-10 °C a las 6 -8 horas, con lo que se consigue controlar los procesos de glucólisis y se impide el desarrollo bacteriano que puede provocar procesos de putrefacción.

Una vez desprendidas las vísceras del resto de la canal, debe evitarse que entre en contacto con el suelo. La manipulación debe ser muy cuidadosa para evitar cualquier tipo de traumatismos o fisuras, ya que éstos son puntos fáciles de entrada de microorganismos.

La aplicación de sal debe ser lo más racional posible para permitir un ligero lavado y no tener que recurrir a realizar lavados muy prolongados que faciliten la transmisión por medio del agua de microorganismos de unas piezas a otras (Toldrá, 2010).

Otras medidas de control van encaminadas hacia los parásitos (insectos y arácnidos sobre todo), para toda la instalación, como son la eliminación de toda materia en los alrededores que favorezca su desarrollo, superficies lisas en paredes y techos para favorecer la limpieza y desinfección, etc. La vida útil de las

carnes empacadas al vacío se define a menudo como el tiempo necesario para que la concentración de bacterias ácido lácticas alcancen aproximadamente 10^6 UFC/g (Borch, 1988). Esta determinación de la vida de anaquel es un tema de debate. Samelis (1998) reportó que el deterioro no fue visible en jamón empacado al vacío que contenían más de 10^8 UFC/g de bacterias ácido lácticas después de dos semanas de almacenamiento a 4 y 12 °C. Estos resultados concuerdan con los reportados por Korkeala (1987, 1989), quien sugirió un nivel de 10^7 UFC/g para que un embutido sea considerado como inaceptable para el consumo.

Para prevenir el crecimiento de microorganismos deterioradores en el jamón rebanado y así extender su vida útil es necesario, no sólo asegurar un adecuado cocimiento del producto a una temperatura de centro del producto de 65 °C por 40 minutos (Carlier, 1996), sino también prevenir la re-contaminación durante el rebanado y empacado y seguir rigurosamente la cadena de frío durante su distribución y comercialización (Béumer, 1996). La temperatura es uno de los principales factores que influye en el desarrollo del deterioro de los alimentos. De forma general entre los microorganismos, la velocidad específica de crecimiento y la duración de la fase lag son altamente dependientes de la temperatura. Es conocido que las bajas temperaturas de almacenamiento prolongan la vida útil de los productos.

II.2 Microbiota asociada a jamón cocido rebanado

II.2.1 Microorganismos patógenos (*Listeria monocytogenes*)

II.2.1.1. Características

L. monocytogenes es un microorganismo Gram positivo, que se mantiene viable en o sobre muchos alimentos, debido a que puede sobrevivir a rangos de pH de 4.7 a 9.2, altas concentraciones de sal (10% peso/volumen) y temperaturas de refrigeración de -0.5 a 9.3 °C, éste muestra una amplia capacidad para multiplicarse, en tanto los límites de los factores ecológicos prevalentes no

rebasen los que le son propios para proliferar. Su carácter psicrótrofo le permite proliferar en alimentos a temperaturas de refrigeración, por lo tanto la temperatura influye de manera decisiva en la tasa de multiplicación (Ferreira, 2014).

Como sucede en la mayoría de los patógenos el desarrollo de *L. monocytogenes* a niveles suficientes para provocar infecciones en personas hipersensibles no se acompaña de signos de deterioro del alimento implicado (Fernández, 2008).

En la industria de alimentos, *L. monocytogenes* representa un alto riesgo a la salud. El consumo de productos alimenticios contaminados, produce listeriosis, una seria enfermedad con una tasa de letalidad de 30% (Guilbaud, 2005). La listeriosis puede afectar a individuos sanos, pero la mayoría de casos ocurren en niños, ancianos y personas inmunocomprometidas. Se manifiesta como septicemia, meningitis y otras infecciones del sistema nervioso central. En mujeres embarazadas la infección puede causar abortos.

Un ejemplo de un brote asociado a embutidos por *L. monocytogenes* es el reportado en agosto de 2010 en Louisiana, EUA. Donde se reportaron 14 personas enfermas, siete fueron hospitalizadas y dos murieron. Los productos asociados fueron paquetes de salchichas ahumadas (CDC, 2014).

II.2.2 Microorganismos deterioradores

El conocimiento acerca de la microflora de los alimentos y específicamente de los microorganismos deterioradores específicos puede eventualmente ser utilizado en inspecciones microbiológicas de los procesos de producción, predicción de la vida de anaquel y diseño de nuevos métodos de producción y preservación (Hansen, 1998).

Los microorganismos aislados con mayor frecuencia en embutidos deteriorados, son: *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* y *Leuconostoc*

mesenteroides. Algunas otras bacterias implicadas son *Lactobacillus* spp., *Brocothrix thermosphacta*, *Weissella viridescens* y *Carnobacterium divergens* y especies de *Leuconostoc* diferentes a *mesenteroides* (Fernández, 2008).

Los microorganismos de interés en la descomposición en los productos cárnicos son: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Lactobacillus* causantes del agriado; *Clostridium* y *Streptococcus* de gasificación; *Micrococcus*, *Microbacterium* y levaduras de formación de mucosidad. Por lo que se puede concluir que existe una gran diversidad entre la microflora presente en estos productos (Ping, 2008).

II.2.2.1 Bacterias ácido lácticas (BAL)

II.2.2.1.1 Características

Las bacterias ácido lácticas son Gram positivas, no esporuladas, catalasa negativas, sin citocromos, no aeróbicas pero aerotolerantes, de difícil cultivo, acidúricas y estrictamente fermentativas, con el ácido láctico como principal producto final. Se pueden encontrar en ambientes ricos en nutrientes (verduras, cárnicos y lácteos) y localidades del cuerpo de mamíferos como boca, intestino y vagina (Fernández, 2008).

Las BAL son las predominantes en los jamones y cuando su concentración llega a 10^8 UFC/g, son notables los cambios sensoriales que producen. Las BAL heterofermentativas comunes en empaques al vacío o con atmósfera de CO₂ son *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Leuconostoc* y *Brocothrix thermosphacta* (Fernández, 2008).

Una de las principales características de las BAL es su capacidad para sobrevivir a condiciones de estrés. Zhu *et al.* (2001) demostraron que la tolerancia a la acidez de las BAL incrementa al menos en dos estados fisiológicos: 1)

Durante la fase logarítmica de crecimiento donde aparece una respuesta adaptativa conocida como L-ATR, esta puede ser inducida por la incubación a un pH bajo; 2) Una vez en la fase estacionaria la tolerancia a la acidez aumenta como resultado de la inducción por el estrés en general. Esta última respuesta es generalmente independiente del pH externo. No se sabe si estas dos respuestas son independientes o se superponen. La producción de biopelículas puede ser un tercer estado que mejore la tolerancia a la acidez. También presentan resistencia al someterlas a bajas temperaturas. Por lo que las BAL han desarrollado una respuesta de adaptación transitoria, denominada respuesta ante un shock de frío, en la cual se induce la formación de proteínas que son sintetizadas con el fin de mantener la fluidez de la membrana mediante el aumento de la proporción de ácidos grasos cortos y/o ácidos grasos insaturados y el superenrollamiento del ADN (Phadtare *et al.*, 2000).

Otro mecanismo de defensa de las BAL contra otros microorganismos es la producción de bacteriocinas, las cuales se clasifican de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas, según lo propuesto por Ness en 1996. Se clasifican en tres clases: I) Lantibióticos: péptido pequeño activos a nivel de membrana y que tienen aminoácidos poco comunes como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina. Un ejemplo de estas bacteriocinas es la nisina. II) No lantibióticos: son bacteriocinas de peso molecular variable que contienen aminoácidos regulares. Este grupo se divide en tres subclases: IIa) Son péptidos activos contra *Listeria*, ejemplos son la pediocina PA-1 y la sakacina P. IIb) Son formadores de complejos de poración que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para la actividad microbiana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK. IIc) Péptidos pequeños, termoestables, no modificados. En esta subclase se encuentran la divergicina A y acidocina B. Y la clase III) Son péptidos grandes mayores de 30 kDa, en esta clase se encuentran las helveticinas J y V, acidofilicina A, lactacinas A y B (Cintas *et al.*, 2001)

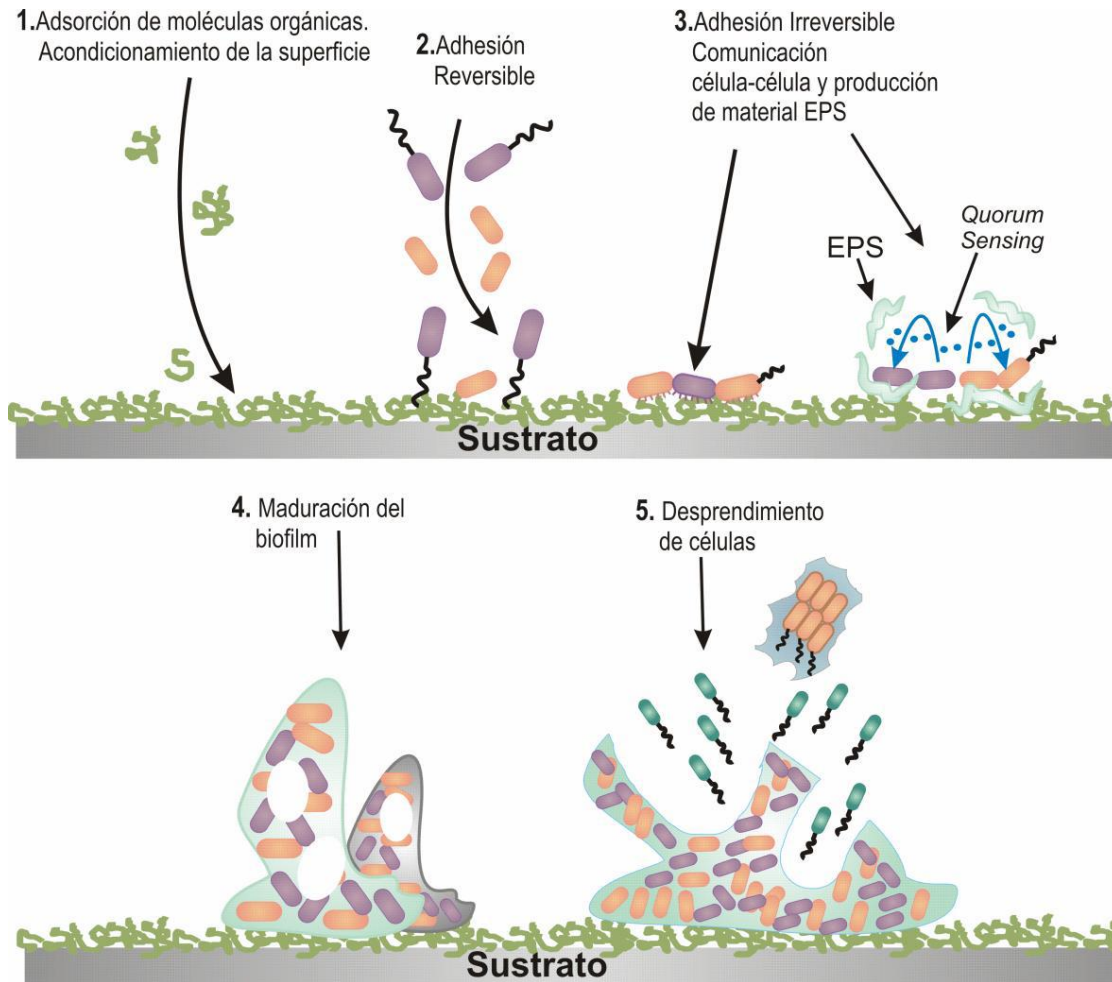
II.3 Prevalencia de los microorganismos en las plantas procesadoras

II.3.1 Formación de biopelículas

La formación de biopelículas es una adaptación de las bacterias, representando una forma de sobrevivir en ambientes hostiles y de colonizar nuevos nichos (Hall *et al.*, 2009).

Se define una biopelícula como una comunidad microbiana adherida a una superficie, rodeada de una sustancia polimérica extracelular de diversas naturalezas y longitudes, llamada matriz (Hall, 2009). Los componentes del material polimérico en el que están embebidos consisten en una mezcla de polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos teicoicos y nucleicos, y otras sustancias poliméricas, lo que le permite tener una humedad relativa de entre 85 y 95% (Hilbert, 2003).

La formación de las biopelículas consta de varias fases, las cuales son: 1) adhesión, 2) formación de microcolonias y sustancias poliméricas, y 3) maduración de la biopelícula (Figura 2). Después de que ha madurado la biopelícula pueden presentar un desprendimiento de pequeñas porciones (Fase 4), con lo que se favorece la colonización de nuevos nichos (Fase 5) (Hilbert, 2003).



EPS= Sustancia polimérica extracelular.

Figura 2. Fases de formación de una biopelícula.

La adhesión, primera fase de la formación de biopelículas se divide en dos etapas, la fase reversible y la no reversible. La primera ocurre en los primeros 5 a 30 segundos en los que se da la fijación de las células a la superficie. Dicha adhesión puede ser pasiva, por gravedad o dinámica de los fluidos, o activa, por flagelos, pilis, cargas electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, entre otras. La fase irreversible comienza con la producción de los polímeros extracelulares.

La formación de microcolonias, segunda fase de la formación de biopelículas, resulta de la agregación y del crecimiento de las bacterias,

acompañados por la formación de los materiales que componen la matriz extracelular. Cuando dos o más bacterias con la capacidad de formar biopelículas se unen a la matriz tiene una composición más compleja, por lo que la matriz es más estable contra las condiciones ambientales adversas.

Las células adheridas que inician la formación de la biopelícula sobre una superficie están rodeadas por pequeñas cantidades de material polimérico extracelular (Fase 3). A medida que la biopelícula madura, se desarrolla la estructura típica de las microcolonias con los espacios intercelulares o canales (Fase 4). Posteriormente algunas microcolonias pueden desprenderse de la superficie o pueden liberarse células individuales revirtiendo su estado a bacterias planctónicas que se desprenden de la matriz extracelular dejando espacios entre las microcolonias que pueden actuar como canales dentro de la estructura de la biopelícula (Fase 5).

Estos procesos no necesariamente se encuentran sincronizados a través de toda la biopelícula sino que generalmente ocurren de manera tal que en cualquier momento, una región de las colonias está ocupada por biopelículas en distintos estadios del desarrollo.

Los genes responsables de la expresión y regulación de las vías de producción de los compuestos responsables de la adhesión y formación del material polimérico extracelular se encienden bajo el estímulo externo de estrés ambiental (presión osmótica, pH, temperatura, falta de nutrientes, entre otros) o densidad de la población (Hilbert, 2003).

La prevención del establecimiento de biopelículas en superficies es un punto crucial para el cumplimiento de la inocuidad y asegurar un producto de buena calidad. Cuando se ha establecido la biopelícula se da una contaminación constante e indefinida de los productos y su remoción es complicada. Un factor que favorece el establecimiento de las biopelículas es una limpieza inadecuada de

los equipos, ya que se van acumulando residuos de materia orgánica dando las condiciones apropiadas para el desarrollo de las bacterias (Latorre, 2010).

Se ha demostrado que el tipo de alimento procesado y el del material con que está hecho el equipo, además de la topología de la superficie, son factores importantes en la formación y en la posterior eliminación de las biopelículas. Cuando las superficies del material presenta defectos o rayaduras son más difíciles de limpiar en comparación con aquellas que son lisas, si a los defectos se unen algunas características, como las cargas electroestáticas o fuerzas de Van der Waals, propias de los materiales o el preacondicionamiento con materia orgánica la adhesión de las bacterias se ve facilitada (Hilbert, 2003).

Los primeros estudios realizados sobre formación de biopelículas eran enfocados sobre una sola especie de microorganismos. Pero en la realidad, sin embargo, las biopelículas están compuestas por más de una especie (Kawarai *et al.*, 2007).

II.3.2. Interacción entre microorganismos dentro de una biopelícula

La comunicación célula-célula ejerce un marcado impacto sobre las distintas etapas del desarrollo de biopelículas. Las bacterias utilizan una amplia variedad de mecanismos para comunicarse entre ellas. Existen varios tipos de mecanismos de comunicación: canales de señales químicas de largo y corto alcance; comunicación en uno, dos o en múltiples sentidos y señalización mediada por contacto (Nealson *et al.*, 1970).

Actualmente, se sabe que la comunicación intercelular no es excepcional sino que es una norma en el ecosistema bacteriano y este proceso es conocido como *quorum sensing* (QS) y es fundamental en la formación de biopelículas (Donlan, 2002).

El desarrollo de interacciones célula-célula se facilita por la estrecha proximidad existente entre las bacterias de una biopelícula. Esta interrelación, vía

pequeñas moléculas mensajeras beneficia a la bacteria al permitirle percibir la presencia de microorganismos vecinos, determinar la densidad de la población existente y responder a eventuales condiciones cambiantes. El proceso QS funciona debido a que cada bacteria que se une a una superficie produce una molécula señal, de manera tal que mientras más bacterias se unen, se incrementa la concentración local de esta señal (Thomas *et al.*, 2006).

Existen estudios donde se hace referencia de cómo la existencia de flagelos en *L. monocytogenes* puede favorecer a la adhesión de éste microorganismo a las superficies inertes y que este hecho se relaciona con la formación de biopelículas (Savitri *et al.*, 2000). Además existen algunos artículos acerca de la formación de biopelículas en mezcla con otros microorganismos, un ejemplo es el estudio realizado por Kawarai *et al.* (2007) quienes investigaron el comportamiento de BAL y levaduras utilizadas para la elaboración de vino. Douglas (2002) observó la formación de biopelículas de *Candida albicans* y *Staphylococcus epidermidis*, debido a que estos microorganismos están asociados a infecciones debidas al uso de catéteres. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios referentes a la interacción entre BAL (causantes principales de deterioro en embutidos) y patógenos como *L. monocytogenes*, y sobre todo del impacto que este fenómeno puede causar en la industria alimenticia.

II. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el consumidor demanda alimentos de alta calidad y con un tiempo mínimo de preparación, en respuesta a esto aparecen los denominados “alimentos listos para su consumo”. Dentro de este grupo de alimentos se encuentra el jamón cocido rebanado, con un gran incremento en su demanda en México.

Aunque durante la elaboración del jamón cocido rebanado se lleva a cabo un proceso de cocción, donde se logra eliminar la carga microbiana presente en la carne; los procesos subsecuentes a éste (al retirar el plástico de la pieza, el rebanado y empacado al vacío) pueden incrementar el riesgo de contaminación del producto con microorganismos deterioradores y patógenos como *L. monocytogenes*. Ambos tipos de microorganismos pueden estar presentes en el medio ambiente de la planta procesadora.

Con el fin de obtener un producto de buena calidad, inocuo y con larga vida de anaquel, las industrias buscan implementar procesos controlados y validados que garanticen jamones libres de microorganismos patógenos y deterioradores, para evitar afectar la salud del consumidor y las pérdidas económicas para la empresa.

Una de las principales características que comparten tanto microorganismos deterioradores y el patógeno de interés en esta investigación (*L. monocytogenes*) es la capacidad de formación de biopelículas. Por lo que se puede suponer que los microorganismos deterioradores al ser capaces de prevalecer en el ambiente de una planta procesadora, la adhesión a la superficie mediante la formación de biopolímeros pudiera ayudar a la adhesión, prevalencia y protección de patógenos de igual manera.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo General

Caracterizar BAL aisladas durante el procesamiento de JCR de acuerdo a su capacidad deterioradora y de formación de biopelículas y establecer su interrelación con *L. monocytogenes* en superficies inertes.

IV.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar la capacidad deterioradora de BAL aisladas de una planta procesadora de jamón.
2. Evaluar la capacidad de formación de biopelículas de BAL aisladas de una planta procesadora de jamón.
3. Identificar bioquímica y molecularmente las BAL seleccionadas por sus características fenotípicas.
4. Evaluar la interacción entre BAL y *L. monocytogenes* en suspensión y en superficies inertes.

V. METODOLOGÍA

V.1. Materiales

V.1.1. Equipos y materiales

- Agitador mecánico Vortex[®], Stuart[®] SA8
- Autoclave eléctrica de mesa, Market-Forge[®], Mod. 199-85
- Balanza analítica (sensibilidad 0.0001g), Santorious[®] y BL120S
- Balanza granataria, sensibilidad 0.1g OAHUS[®], modelo CT200-S
- Biolog[®], MicroStation, Mod. 637
- Cámara Kodak[®], Edas[®] 290
- Campana de flujo laminar, Alder[®], Veco[®]
- Cuenta colonias, Quebec[®] Reicher- Jung[®]
- Cámara de electroforesis, BioRad[®], CHEF-DR-II[®]
- Fuente de poder para electroforesis Amercham Pharmacia Biotech[®] EPS 301
- Fotodocumentador DNR[®] Mod. MiniBis Pro
- Homogenizador Stomacher[®] Laboratory Blender[®], Mod. 400 (BA 7021)
- Horno para esterilización, Shel-lab[®]
- Incubadora con refrigeración (a 22, 30, 35°C), Precision Scientific[®]
- Micropipetas 1-1000 µl, Labsystems[®], Brand[®], Genex Beta[®], Rainin[®], Gilson
- Microscópio óptico Axiostar plus[®], Mod. 1169-149
- NanoDrop Thermo scientific[®] Mod. 2000c
- Olla de presión Presto Steele[®], Mod. 21 Lts y 12 Lts
- Potenciometro, Jenway[®], 3510 pH Meter[®]
- Refrigerador OSEDA[®] Refrigeración
- Refrigerador REVCO[®], Thermo Scientific[®]
- Termobloque Eppendorf[®]
- Termociclador Tech-gene[®], Mod. 512
- Material de uso común en el laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos

V.1.2. Medios de cultivo

- Agar de Man-Rogosa-Sharp (MRS), Dibico®
- Agar soya tripticaseína (AST), Dibico®
- Caldo de Man-Rogosa-Sharp (MRS), Dibico®
- Caldo soya tripticaseína (CST), Dibico®
- Diluyente de peptona 0.1% (DP), Dibico®

V.1.3. Reactivos

- Agarosa Ultrapura, Invitrogen®
- Alcohol etílico absoluto, Reactivos Monterrey®
- Bromuro de etidio (1 ppm), Biorad®
- Buffer de corrimiento 10x BlueJuice®, Invitrogen®
- Cristal violeta, Sigma®
- EDTA-Na₂ 2H₂O, USB®
- Glicerol, Drogas la Paz®
- Marcador de peso molecular, DNA ladder 50, 100 y 1000 pb, Invitrogen®
- Platinum PCR supermix, Invitrogen®

V.1.4. Material biológico

Se emplearon 131 cepas provenientes de un estudio previo realizado por el Laboratorio de Microbiología e Inocuidad de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro. Las cepas se aislaron de diversos materiales como equipos de producción, utensilios y producto en proceso y terminado en una planta productora de JCR. Las cepas se mantuvieron congeladas a -70 °C en caldo soya tripticasa con glicerol (15%) hasta su análisis.

V.2 Identificación preliminar de BAL

Cada una de las cepas se reactivó en agar MRS y se incubaron durante 48 ± 2 horas a 30 ± 2 °C. Posteriormente se sembraron en AST, y se incubaron bajo las condiciones previamente mencionadas. La pureza de cada cultivo se comprobó considerando el tamaño, forma y color de las colonias, y mediante una tinción de Gram. Adicionalmente se llevó a cabo la prueba de catalasa con peróxido de hidrógeno a 3 %.

V.3. Determinación de la capacidad deterioradora de las BAL

V.3.1. Preparación e inoculación de las muestras

Se utilizaron paquetes de JCR de una marca comercial. Con la finalidad de eliminar cualquier flora microbiana presente, los paquetes se sometieron a un tratamiento de pasteurización a 75 °C por 50 min. Posteriormente, el jamón cocido se cortó con un cuchillo estéril en cuadros de 4.5 cm con un espesor de 1 cm aproximadamente (~ 10 g).

Las cepas previamente congeladas fueron reactivadas por separado. Para ello, se tomaron 40 µl de cada cepa congelada y se hicieron pases consecutivos a tubos de caldo MRS (3 ml) incubándose a 30 °C por 24 horas. Una vez activadas las cepas, se procedió a realizar una serie de diluciones con la finalidad de obtener una concentración de células de $\sim 10^3$ - 10^4 UFC/g. La concentración del inóculo se verificó al realizar el recuento de BAL por extensión de superficie utilizando agar MRS e incubando a 30 °C por 48 horas.

Los paquetes de JCR se inocularon por separado con cada una de las cepas de BAL aisladas de la planta de producción ($\sim 10^3$ - 10^4 UFC/g) colocando y extendiendo 200 µl entre las rebanadas de jamón previamente pasteurizadas (50 µl entre cada rebanada de jamón). Las muestras de jamón inoculado después de ser empacadas al vacío se almacenaron a 4 y 25 °C. El estudio se realizó por triplicado.

Se incluyó como control negativo jamón no inoculado y como control positivo jamón inoculado con *Leuconostoc mesenteroides*.

V.3.2. Análisis de las muestras

Al inicio del estudio (día 0) y al observarse los primeros signos de deterioro en el JCR (durante el almacenamiento) se realizaron recuentos de las BAL en las muestras de JCR inoculado. A cada muestra se le agregaron 90 ml de diluyente de peptona y se homogenizó mecánicamente utilizando un *stomacher* (velocidad alta por 120 segundos); se prepararon diluciones decimales y se realizó el recuento de las BAL en agar MRS mediante la técnica de extensión por superficie. Las placas se incubaron a 30 °C por 48 horas.

Adicionalmente se observó y se registró la aparición de signos de deterioro en el JRC inoculado con las BAL. Las muestras de JRC inoculadas se compararon visualmente con el jamón sin inocular (control negativo) para determinar si la muestra sería aceptada por el consumidor. La comparación de las muestras almacenadas a 4 °C se llevó a cabo en los días 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40, mientras que a 25 °C, se evaluó cada 24 horas durante 7 días.

Al final del experimento se seleccionaron las cepas que mostraron mayor capacidad deterioradora (las que deterioraron el JCR en el menor tiempo).

V.4. Determinación de la capacidad de formación de biopelículas

Se utilizó una microplaca de 100 pozos, y a cada pozo se le añadieron 180 µl de caldo MRS con 20 µl de un cultivo de BAL (concentración aproximada de 10⁵ UFC/ml) en caldo MRS. La microplaca se incubó a 4 y 25 °C por 7 días y 48 horas, respectivamente. Transcurrido ese tiempo, se removió el contenido decantando la microplaca y cada pozo se lavó tres veces con 250 µl de solución salina fisiológica (SSF) al finalizar los lavados se llenaron los pozos con 250 µl de metanol al 99% y

se dejó reposar 15 min para después vaciar y dejar secar. Una vez seco el pozo se realizó la tinción con 200 µl de cristal violeta de Hucker 2 % y después de cinco minutos se lavaron los pozos con 250 µl de agua destilada, se decantó la microplaca para dejarla secar. El material adherido se resuspendió con 160 µl de ácido acético glacial y se leyó a 490 nm en un lector de microplacas de ELISA (Spectra Max).

Al final del experimento se seleccionaron las cepas que mostraron la mayor capacidad para formar biopelículas.

V.5. Identificación bioquímica

Cada cepa seleccionada como BAL, se inoculó en agar MRS y se incubaron a 30°C por 48 horas. Posteriormente se cosecharon las células utilizando un hisopo estéril tomando una colonia y realizando el pase de cada cepa al fluido de inoculación (fluido C, BIOLOG), y se midieron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm. Cuando alcanzó una transmitancia de 96 - 98 %, se tomaron 100 µl de la suspensión de cada cepa para inocular cada uno de los pocillos de la microplaca para BIOLOG. Las microplacas se incubaron a 30°C por 48 horas y finalmente se efectuó la lectura en el equipo BIOLOG a 595 nm. El procedimiento de la técnica se ilustra en la Figura 3.



Figura 3. Procedimiento para la identificación bioquímica mediante el sistema BIOLOG.

V.6. Identificación molecular

V.6.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN de las BAL seleccionadas se efectuó a partir de 3 ml de un cultivo puro previamente incubado en caldo MRS a 30°C por 48 horas, utilizando en kit de Tissue and Blood de Qiagen® con algunas modificaciones. La purificación se realizó utilizando el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification de GE®. Se realizó la verificación de la integridad del ADN obtenido mediante un gel de agarosa al 1% y corriendo en una cámara de electroforesis a 90 V durante 40 minutos, además de la cuantificación del ADN obtenido utilizando el equipo nanodrop.

V.6.2. Secuenciación por 16S rDNA

Cada ADN purificado de las cepas se amplificó por PCR utilizando el segmento de su gen 16S rDNA. Los iniciadores que se utilizaron fueron el FD1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y RD1 (AAGGAGGTGATCCAGCC) empleando la mezcla de reacción descrita en la Cuadro 4.

Cuadro 4. Mezcla de reacción para la reacción de PCR

Reactivos	Concentración (µl)
Agua	16.05
Buffer 10 X	2.50
MgCl ₂ 50 mM	0.75
d NTP's 10 mM	1.00
Primer forward	1.25
Primer reverse	1.25
Taq polimerasa	0.20
ADN	2.00

Glicerol	1.25
TOTAL	25.00

V.6.3. Análisis de datos e identificación de las especies

Las secuencias de nucleótidos del gen 16S rDNA de todas las cepas fueron analizadas por el programa BLAST de la página del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

V.7. Interacción entre bacterias deterioradoras y *L. monocytogenes*

V.7.1. Interacción entre células planctónicas (en suspensión).

Las cepas seleccionadas como deterioradoras así como una cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (resistente a rifampicina) se reactivaron inoculando cada una de ellas, individualmente 40 µl en 3 ml de caldo MRS para bacterias deterioradoras y caldo soya tripticasa para *L. monocytogenes*; los tubos se incubaron 24 horas a 30 y 35 °C, respectivamente. Posteriormente, se centrifugaron a 4,500 rpm por 15 minutos, se retiró el sobrenadante y se re-suspendió en 3 ml de SSI. Este procedimiento se realizó dos veces más para cada una de las cepas deterioradoras y *L. monocytogenes*.

Tubos con 25 ml de CST y una suspensión de jamón 10 % (peso/volumen) se inocularon de manera simultánea con 250 µl de un cultivo (~10³ UFC/ml) de las BAL deterioradoras seleccionadas y *L. monocytogenes* y se almacenaron a 25 y a 4 °C. Se realizaron recuentos de los microorganismos a las 4, 8, 12, 24 y 48 horas en las muestras almacenadas a 25 °C; y cada 24 horas durante 5 días en las muestras almacenadas a 4 °C. Los recuentos de las poblaciones se llevaron a cabo mediante vaciado en placa en MRS y AST adicionado con rifampicina a 200 ppm para BAL y de *L. monocytogenes*, respectivamente. Las placas de MRS se incubaron a 30 °C/48 horas y las de AST a 35 °C/24 horas.

Para ambas condiciones de almacenamiento y tipos de sustrato se utilizaron controles positivos en los cuales uno de los tubos sólo contenía el inóculo con *L. monocytogenes* y otro únicamente la mezcla de BAL. Los controles negativos consistieron en CST y extracto de jamón sin inocular.

V.7.2. Interacción en acero inoxidable

Se procedió a reactivar las cepas de BAL seleccionadas como deterioradoras, así como la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19115. Esta reactivación se llevó a cabo inoculando por separado 40 µl de cada cepa (mantenida en congelación desde su selección) a 3 ml de caldo MRS para BAL y CST para *L. monocytogenes*; los tubos se incubaron a 30 y 35 °C, respectivamente, por 24 horas. Posteriormente, se centrifugaron a 4,500 rpm por 15 minutos, se retiró el sobrenadante y se re-suspendió en 3 ml de SSI. Este procedimiento se realizó dos veces más para cada una de las cepas deterioradoras y *L. monocytogenes*.

Placas de acero inoxidable de aproximadamente 5 cm² fueron sumergidas en 25 ml de dos medios de cultivo (CST y extracto de jamón al 10%) previamente inoculado de manera simultánea con una mezcla de las cepas de BAL seleccionadas y *L. monocytogenes* a una concentración de 10³ UFC/ml. También se utilizaron controles positivos que consistieron en tubos inoculados sólo con la mezcla de BAL y otro inoculado sólo con la cepa de *L. monocytogenes*. Los tubos se incubaron a 30°C por 48 horas, para propiciar la formación de biopelículas. Periódicamente se retiraron placas de acero para cuantificar las células adheridas.

Para desprender las células adheridas a la biopelícula se realizaron tres lavados mediante pases sucesivos de la placa a tubos con 20 ml de SSF estéril y finalmente la placa se transfirió a un cuarto tubo el cual se agitó en un Vortex (3,000 rpm/6 min) para remover las células que se encontraban inmersas en una biopelícula. A partir de éstas suspensiones celulares se realizaron recuentos de las poblaciones de BAL y *L. monocytogenes* cada 4, 8, 12, 24 y 48 horas para las

placas de acero inoxidable almacenadas a 25°C y cada 24 horas por 5 días para las almacenadas a 4°C. El recuento de BAL se llevó a cabo mediante la técnica de extensión por superficie en agar MRS incubando las placas a 30°C/ 48 horas, mientras que el conteo de las poblaciones de *L. monocytogenes* se efectuó por extensión en superficie en AST con rifampicina (200 ppm); las placas a 35°C/ 24 horas. En los tiempos señalados de manera simultánea se cuantificó la formación de biopelículas en ambos medios (CST y extracto de jamón) mediante el método previamente descrito en el apartado V.2.2.

V.9. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y en cada ocasión se analizaron tres muestras de cada tratamiento. Se llevó a cabo un análisis de varianza y comparación de medias de Tukey utilizando el programa estadístico JMP versión 8.0.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Identificación y selección de BAL

Del aislamiento de bacterias a partir de JCR puede obtenerse una gran variedad de géneros, pero es bien sabido que el deterioro es sólo propiciado por la presencia de una pequeña fracción de éstas, las cuáles son denominadas “microorganismos deterioradores específicos” (SSOs, por sus siglas en inglés) o “microorganismos deterioradores efímeros” (ESO’s, por sus siglas en inglés). Todas ellas pertenecientes al grupo de BAL (Nychas *et al.*, 2008).

La primera parte del proyecto de investigación consistió en seleccionar a partir de 131 cepas aisladas durante el proceso de elaboración de JCR tipo virginia (combinación pavo-cerdo) así como de producto que se encontraba deteriorado, las cepas de BAL que pudieran ser usadas a lo largo de este trabajo. Después de realizar la tinción de Gram y la prueba de catalasa solamente 32 cepas se identificaron presuntamente como BAL; el resto de las cepas pertenecían al género *Bacillus* y algunas de ellas resultaron ser levaduras. En el Cuadro 5, se muestran en color rojo las cepas que cumplieron con las características esperadas para BAL: catalasa negativo, Gram positivas, además de mostrar la típica morfología microscópica bacilar (Figura 4).

Cuadro 5. Pruebas de identificación de cepas BAL.

Núm de cepa	Catalasa	Gram	Núm de cepa	Catalasa	Gram	Núm de cepa	Catalasa	Gram	Núm de cepa	Catalasa	Gram
1	+	L	38	-	+	73	+	+	111	+	+
2	+	L	41	-	-	74	-	+	112	+	+
3	+	L	42	-	+	75	-	+	114	+	+
4	+	L	44	-	+	77	+	+	115	-	+
5	+	L	45	-	+	78	+	+	116	-	+
6	+	L	46	-	+	81	+	+	117	-	+
8	+	L	47	-	+	82	+	+	118	-	+
10	+	L	48	-	+	83	+	+	119	-	+

11	+	L	52	-	+	84	+	+	120	+	+
12	+	L	55	-	-	85	+	+	121	-	+
13	+	L	56	-	+	86	+	+	122	-	+
17	+	L	57	-	+	87	-	+	123	-	+
18	+	L	59	-	+	88	+	+	124	-	-
19	+	L	60	-	-	93	+	+	125	+	-
24	+	L	63	+	-	94	+	+	126	+	+
26	-	+	64	+	+	95	+	-	127	+	+
28	+	+	67	-	+	97	+	-	128	+	+
31	-	+	68	-	+	101	+	+	129	+	+
32	-	+	69	-	-	102	+	+	130	+	+
33	-	+	70*	-	+	103	+	-	131	+	-
34	-	+	71	+	+	104	+	+			
37	-	+	72	-	+	110	+	+			

L=levaduras

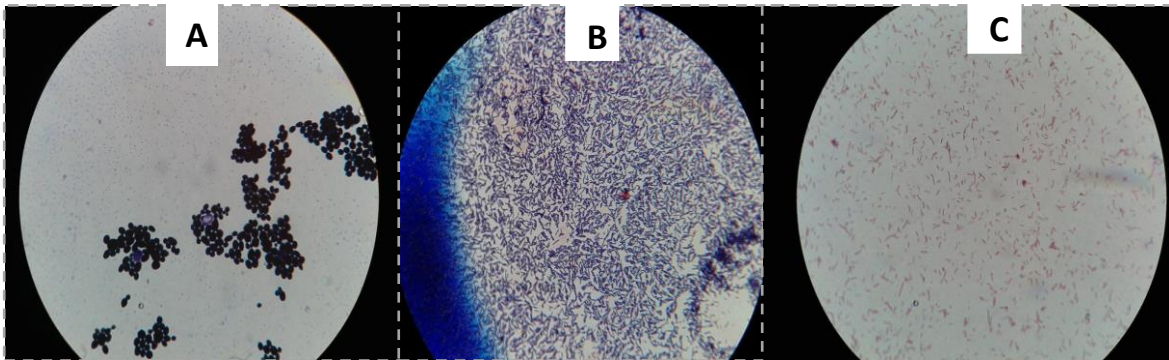


Figura 4. Morfología microscópica de cepas de microorganismos aisladas durante el procesamiento de JCR. A) Frotis de levaduras, B) Frotis con bacilos Gram positivos, C) Frotis de bacilos Gram negativos.

Como se mencionó las BAL son los principales microorganismos implicados en el deterioro de jamón. El evidente dominio de la presencia de BAL puede explicarse debido a la relativa ausencia de oxígeno y a la alta concentración de dióxido de carbono usada dentro del paquete de JCR (80% de N₂, 20% CO₂), lo que elimina o reduce la presencia de microorganismos aerobios estrictos. El dominio de las BAL puede también deberse a la presencia de nitrito, el cual inhibe a la mayoría de las bacterias (Kreyenschmidt *et al.*, 2009).

VI.2 Caracterización fenotípica de las cepas de BAL

VI.2.1 Determinación de la capacidad deterioradora

Las 32 cepas de BAL se sometieron a estudios para conocer si tenían o no la capacidad para deteriorar JCR. Para ello se almacenaron paquetes de JCR pasteurizado inoculados con cada una de las cepas de BAL y se almacenaron a 4 y 25 °C. Cabe mencionar que el nivel de BAL en el JCR pasteurizado previamente antes de ser inoculados, estuvo por debajo del límite de detección (>100 UFC/g) en la mayoría de los casos (Apéndice A).

En los paquetes de JCR almacenados a 4 °C a los 35 días, 14 cepas presentaron signos de deterioro (presencia de líquido viscoso y lechoso, principalmente). En contraste, en los paquetes almacenados a 25 °C solamente seis cepas ocasionaron signos de deterioro visibles a partir de los 3 días (Cuadro 6, Figura 5). Las cepas con la mayor capacidad deterioradora observada en ambas temperaturas fueron la 34, 37, 119, 121, 122 y 123. Estas seis cepas se emplearon para los experimentos sucesivos.

Cuadro 6. Presencia de deterioro (días) en JCR inoculado con BAL almacenado a 25 y 4 °C.

Cepa	Aparición de deterioro (días)		Cepa	Aparición de deterioro (días)	
	25 °C	4 °C		25 °C	4 °C
31	7	50	68	5	50
32	5	50	70	5	40
33	4	50	72	7	35
34*	3	35	74	5	40
37	3	35	75	4	40
38	5	40	87	5	35
42	4	35	115	5	35

44	3	50	116	5	35
45	5	35	117	7	40
46	5	35	118	5	40
48	4	40	119	4	35
52	5	35	121	3	35
56	4	40	122	3	35
59	5	50	123	3	35
67	6	40			

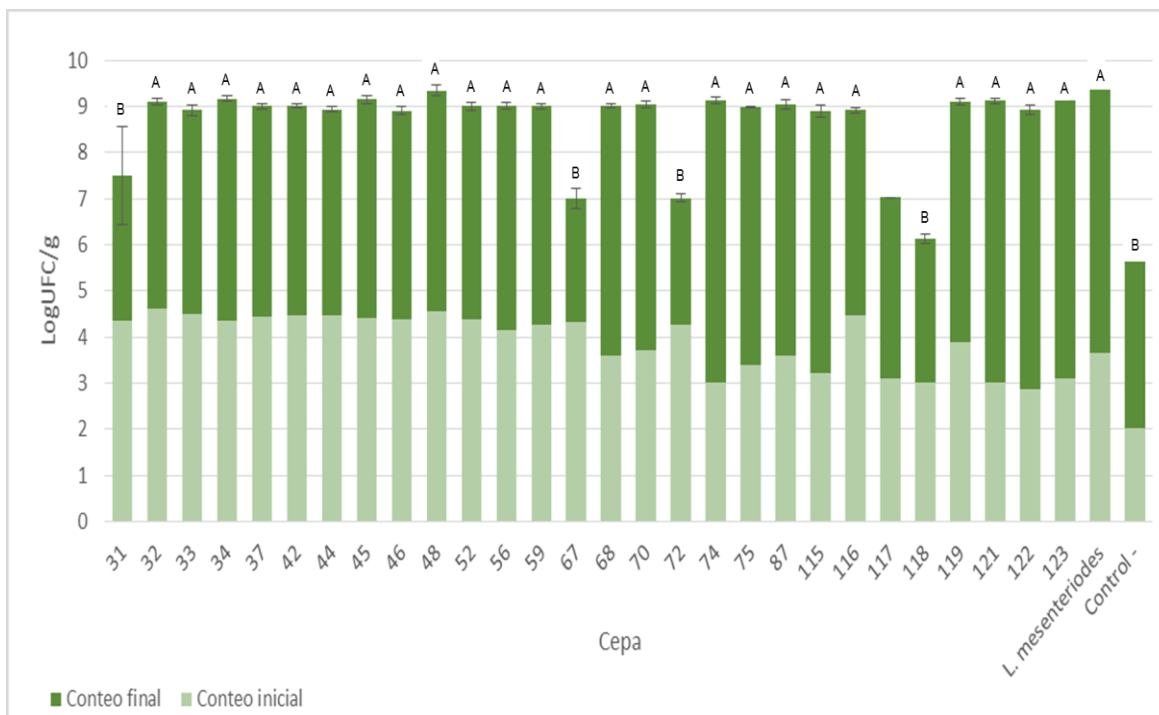
*Las cepas marcadas en azul, presentaron la mayor capacidad de deterioro en menor tiempo.

En la Figura 5 se muestran ejemplos del deterioro provocado por algunas cepas.



Figura 5. Signos de deterioro observado en las muestras de JCR inoculadas con BAL. A) Cambios de coloración; B) Producción de líquido lechoso; C) Producción de gas.

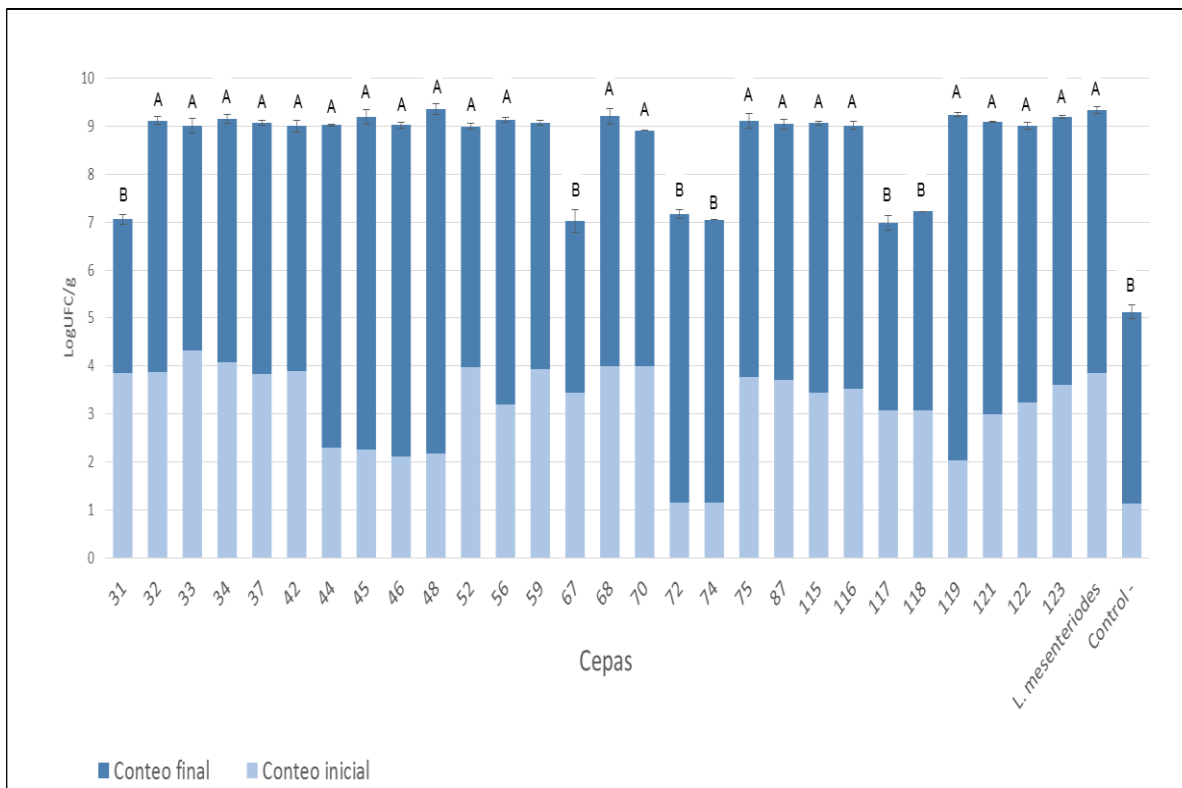
Las poblaciones de BAL se cuantificaron en el JCR al inicio del estudio y una vez que los paquetes presentaban signos de deterioro. En términos generales en los paquetes almacenados a 25 °C el contenido de BAL al final del estudio osciló entre 7.5 y 9.5 Log UFC/g (Figura 6).



Los valores representan la media de tres valores \pm error estándar. Los valores que no están identificados con la misma letra son significativamente diferentes.

Figura 6. Contenido de BAL en JCR almacenado a 25 °C con signos de deterioro.

Para el JCR almacenado a 4 °C y que presentaba signos de deterioro, se observaron recuentos similares que van de 6.8 a 9.1 Log UFC/g (Figura 7). Se puede apreciar que independientemente del proceso de deterioro que puede observarse en el paquete, el alto contenido de BAL no necesariamente se asocia con la aparición de signos de deterioro del producto. Esto puede atribuirse a que el proceso de deterioro del JCR aunque es causado mayormente por el crecimiento microbiano, es particularmente la acumulación de metabolitos excretados al medio por las BAL lo que lo determina (Nychas *et al.*, 2007).



Los valores representan la media de tres valores \pm error estándar. Los valores que no están identificados con la misma letra son significativamente diferentes.

Figura 7. Contenido de BAL en JCR almacenado a 4 °C con signos de deterioro.

En todas las muestras de JCR pasteurizado que se empleó para llevar a cabo los estudios de deterioro (tanto a 25 como a 4 °C), el contenido inicial de BAL oscilo entre 1.2 y 4.5 Log UFC/g. Cabe señalar que aunque todos los paquetes de JCR fueron pasteurizadas al inicio del estudio, la carga microbiana inicial pudo ser mayor o menor dependiendo del lote de producción y esto provocara una diferencia entre poblaciones iniciales de BAL de los paquetes durante el experimento (Figuras 6 y 7).

Se realizó un análisis de correlación entre el incremento en el contenido de cada una de las cepas de BAL (recuento inicial al inicio del almacenamiento menos el recuento final al observar deterioro en la muestra de jamón) y la presencia de deterioro. En la Figura 8 se puede observar que no existe una correlación entre el incremento en el contenido de BAL y la rapidez con la que

aparecieron los signos de deterioro en el JCR almacenado a 25 °C. Por ejemplo, la cepa 121 tuvo un incremento de BAL de 3 Log UFC/g y la cepa 119 de más de 6 Log UFC/g, y ambas deterioraron el producto a los 3 días de almacenamiento.

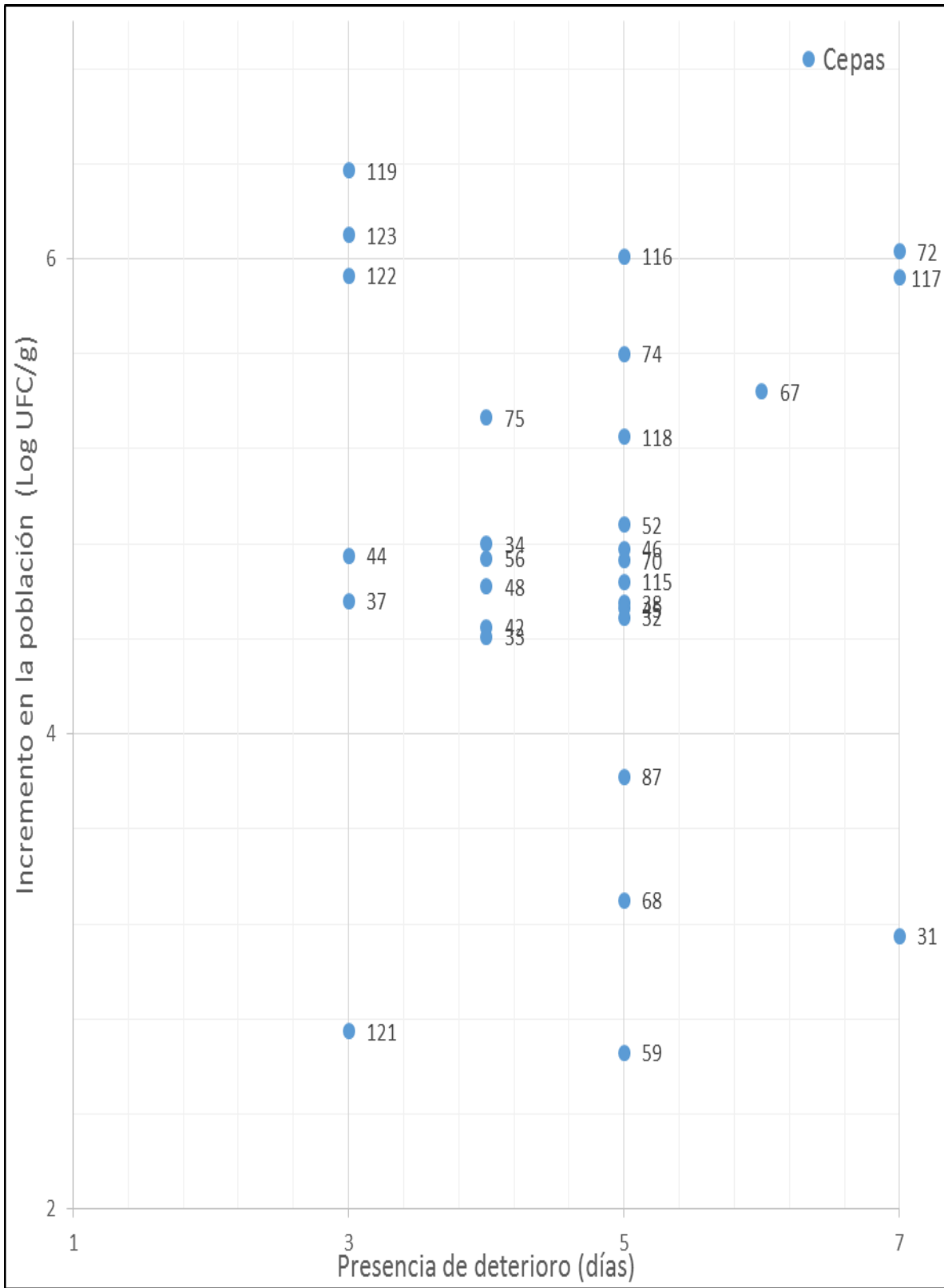


Figura 8. Correlación entre el incremento en las poblaciones de BAL y la presencia de deterioro en JCR almacenado a 25 °C.

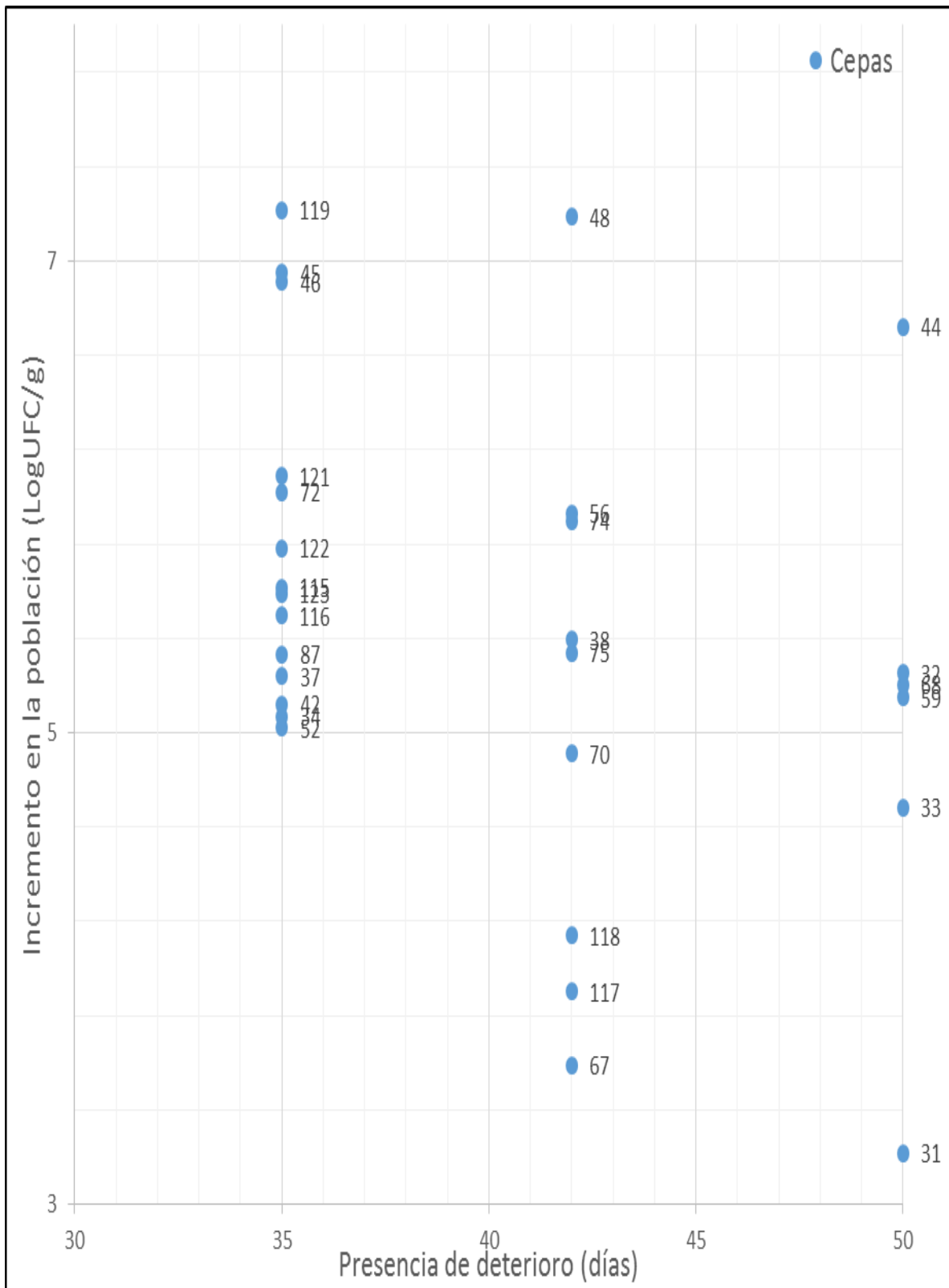


Figura 9. Correlación entre el incremento de BAL y la presencia de deterioro en JCR almacenado a 4 °C.

En las Figura 9 se muestra la correlación entre la presencia de deterioro durante el almacenamiento a 4 °C y el incremento en la población de BAL. De manera similar a lo que se observó a 25 °C, durante el almacenamiento en refrigeración las cepas que lograron deteriorar el jamón en menor tiempo (35 días) mostraron distintos niveles de crecimiento que van de 5 a 7 Log UFC/g. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos para ambas temperaturas de almacenamiento se pudiera sugerir que el incremento en la población microbiana dentro de la matriz alimenticia (JCR) es independiente a la presencia de cambios visuales en la muestra.

VI.2.2 Determinación de la capacidad de formación de biopelículas

En la naturaleza muy pocos microorganismos prosperan de forma planctónica, la mayoría de los microorganismos lo hacen en grupos de aglomerados, que se adhieren a una superficie y permanecen conformando una biopelícula, la formación de estos biopolímeros provoca la resistencia al estrés ambiental (Kubota *et al.*, 2008).

A pesar de que las biopelículas pueden estar formadas por una o más especies de diferentes géneros, los mismos presentan similitudes en relación a las características estructurales y al comportamiento resultante. Por ejemplo, el tipo de estructuras observadas por las microcolonias de biopelículas maduras son similares para comunidades de una o más especies que crecen en diferentes tipos de ambientes (Lawrence *et al.*, 1991).

Es importante destacar que pueden encontrarse biopelículas en la presencia de microorganismos, un medio hidratado y una mínima cantidad de nutrientes, ya que pueden desarrollarse en una amplia cantidad de superficies. Por lo que representa un problema importante, particularmente en el sector industrial alimenticio (contaminación consecutiva de los productos) (Dunne, 2002).

Con la finalidad de conocer si las 32 cepas de BAL seleccionadas tenían la capacidad de formar biopelículas, se inocularon tubos que contenían caldo MRS y extracto de jamón y se incubaron a 4 y 25 °C. Los tratamientos estudiados fueron:

1. Caldo MRS almacenado a 25 °C
2. Caldo MRS almacenado a 4 °C
3. Extracto de jamón almacenado a 25 °C
4. Extracto de jamón almacenado a 4 °C

Previo a la cuantificación de las biopelículas se comprobó que ambos sustratos propiciaron el desarrollo de las BAL (Apéndice B). En ambos medios se observó la formación de biopelículas.

En el Cuadro 7 se muestran los valores de densidad óptica obtenida para cada una de las cepas en ambos sustratos y temperaturas de almacenamiento.

De acuerdo al análisis estadístico la cepa 118 cultivada en extracto de jamón a 25 °C fue la que obtuvo la mayor concentración de biopolímeros (DO=0.438) y es significativamente mayor a las otras cepas de BAL; caso contrario se presenta con la cepa 46 que en el mismo sustrato y temperatura de almacenamiento fue la que menos biopolímeros sintetizó (DO= 0.00058). Para las otras cepas independientemente del sustrato y la temperatura de almacenamiento no se observaron diferencias significativas entre ellas.

Cuadro 7. Valores de densidad óptica obtenida por cada cepa de BAL asociados a la producción de biopolímeros en caldo MRS y extracto de jamón.

CEPA	MRS		Extracto de jamón al 10%	
	Absorbancia*		Absorbancia	
	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C
31	0.025±0.005 ^{pqrst}	0.071±0.105 ^{klmnopqrst}	0.050±0.014 ^{nopqrst}	0.047±0.017 ^{nopqrst}
32	0.043±0.027 ^{nopqrst}	0.050±0.025 ^{nopqrst}	0.037±0.026 ^{nopqrst}	0.035±0.007 ^{nopqrst}

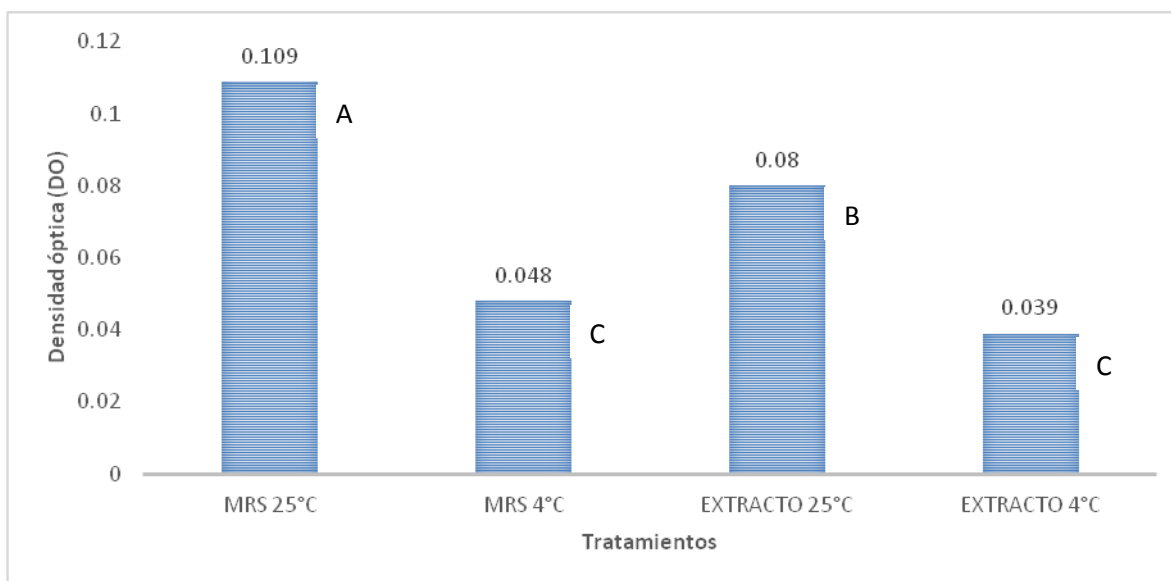
33	0.053±0.028 nopqrst	0.250±0.073 bcd	0.027±0.018 pqrst	0.078±0.026 jklmnopqrst
34	0.089±0.039 hijklmnopqrst	0.093±0.088 ghijklmnopqrs	0.038±0.042 nopqrst	0.072±0.006 klmnopqrst
37	0.0485±0.027 nopqrst	0.192±0.027 cdef	0.042±0.026 nopqrst	0.039±0.015 nopqrst
38	0.081±0.027 jklmnopqrst	0.181±0.063 defgh	0.039±0.016 nopqrst	0.077±0.053 jklmnopqrst
42	0.036±0.006 nopqrst	0.029±0.009 pqrst	0.032±0.014 nopqrst	0.012±0.008 qrst
44	0.067±0.025 lmnopqrst	0.165±0.047 defghij	0.052±0.028 nopqrst	0.108±0.028 fghijklmnop
45	0.017±0.007 pqrst	0.070±0.031 lmnopqrst	0.023±0.014 pqrst	0.039±0.020 nopqrst
46	0.031±0.021 nopqrst	0.044±0.025 nopqrst	0.022±0.013 pqrst	0.00058±0.007 ^t
48	0.048±0.032 nopqrst	0.122±0.018 efghijklmno	0.044±0.023 nopqrst	0.029±0.020 pqrst
52	0.028±0.008 pqrst	0.025±0.017 pqrst	0.055±0.029 mnopqrst	0.074±0.051 jklmnopqrst
56	0.069±0.026 lmnopqrst	0.037±0.015 nopqrst	0.047±0.023 nopqrst	0.033±0.011 nopqrst
59	0.038±0.015 nopqrst	0.002±0.006 st	0.062±0.027 lmnopqrst	0.086±0.028 ijklmnopqrst
67	0.083±0.041 ijklmnopqrst	0.085±0.069 ijklmnopqrst	0.022±0.012 pqrst	0.017±0.015 pqrst
68	0.086±0.036 ijklmnopqrst	0.204±0.094 cde	0.049±0.047 nopqrst	0.095±0.044 ghijklmnopqrs
70	0.061±0.027 mnopqrst	0.0373±0.037 nopqrst	0.018±0.013 pqrst	0.011±0.017 qrst
72	0.053±0.009 nopqrst	0.063±0.021 lmnopqrst	0.059±0.030 mnopqrst	0.154±0.038 efghijkl
74	0.050±0.020 nopqrst	0.012±0.013 qrst	0.032±0.009 nopqrst	0.009±0.007 qrst
75	0.003±0.001 st	0.329±0.019 ^b	0.057±0.028 mnopqrst	0.123±0.049 efghijklmn
87	0.006±0.003 ^{rst}	0.009±0.019 qrst	0.036±0.023 nopqrst	0.064±0.061 lmnopqrst
115	0.003±0.003 st	0.026±0.035 pqrst	0.037±0.021 nopqrst	0.024±0.015 pqrst
116	0.027±0.016 pqrst	0.0559±0.036 mnopqrst	0.021±0.018 pqrst	0.029±0.061 pqrst
117	0.022±0.008 pqrst	0.372±0.095 ^b	0.024±0.012 pqrst	0.034±0.015 nopqrst
118	0.039±0.013 nopqrst	0.077±0.052 jklmnopqrst	0.046±0.017 nopqrst	0.438±0.097 ^a
119	0.045±0.013 nopqrst	0.065±0.008 lmnopqrst	0.030±0.010 opqrst	0.096±0.039 ghijklmnopqr
121	0.099±0.035 ghijklmnopq	0.275±0.124 ^{bc}	0.052±0.021 nopqrst	0.147±0.013 efghijklm
122	0.052±0.024 nopqrst	0.082±0.052 ijklmnopqrst	0.055±0.003 mnopqrst	0.163±0.034 defghijk
123	0.074±0.030 jklmnopqrst	0.174±0.057 defghi	0.015±0.003 qrst	0.182±0.043 defg

* Los datos representan la media de 3 valores ± desviación estandar. Los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente significativos (P < 0.05).

La mayor producción de biopolímeros se propició a temperatura ambiente (25 °C) y en caldo MRS que representan las condiciones óptimas para el crecimiento de BAL (Figura 10)

En términos generales a temperatura de refrigeración (4 °C) no se observó diferencia significativa entre el caldo MRS y el extracto de jamón. Los valores de densidad óptica que representan la cantidad de biopolímeros formados a 25°C osciló entre 0.08 y 0.109, mientras que a 4°C entre 0.039 y 0.048.

Aunque el extracto de jamón no resultó ser el mejor sustrato para la formación de las biopelículas, es importante resaltar que si se produjeron aun cuando el contenido de nutrientes es poco (10% peso/volumen). El uso del extracto del jamón simula las condiciones que eventualmente pueden ocurrir dentro de la planta procesadora, ya que eventualmente pueden encontrarse residuos del alimento sobre la superficie de equipos, bandas transportadoras u otras superficies, y detonarse el desarrollo microbiano y la eventual formación de biopelículas si éstos permanecen el tiempo requerido.

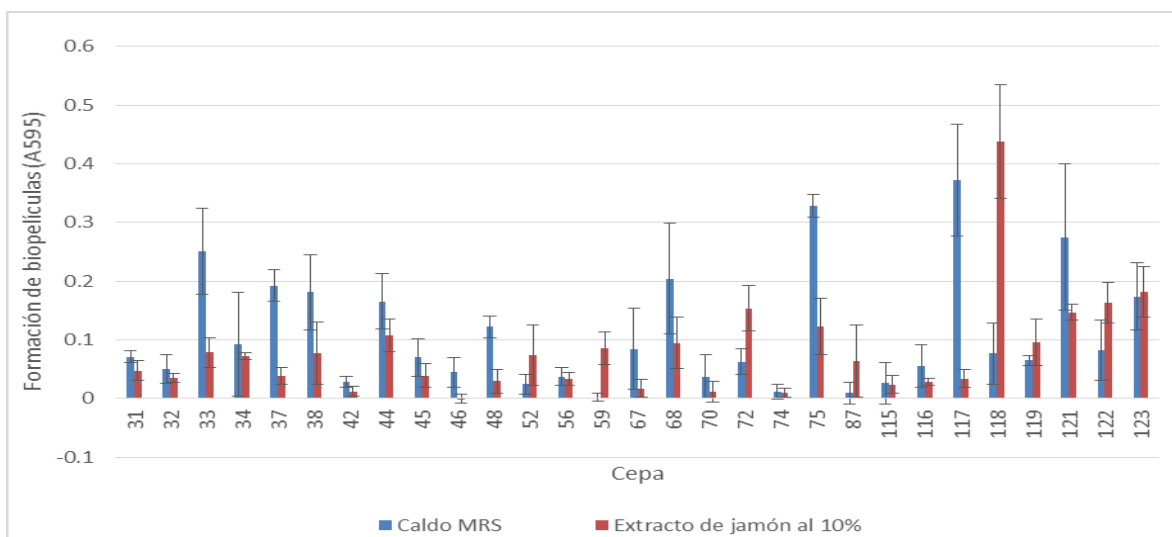


Barras con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

Figura 10. Formación de biopelículas por BAL en medio MRS y extracto de jamón a 25 y 4 °C.

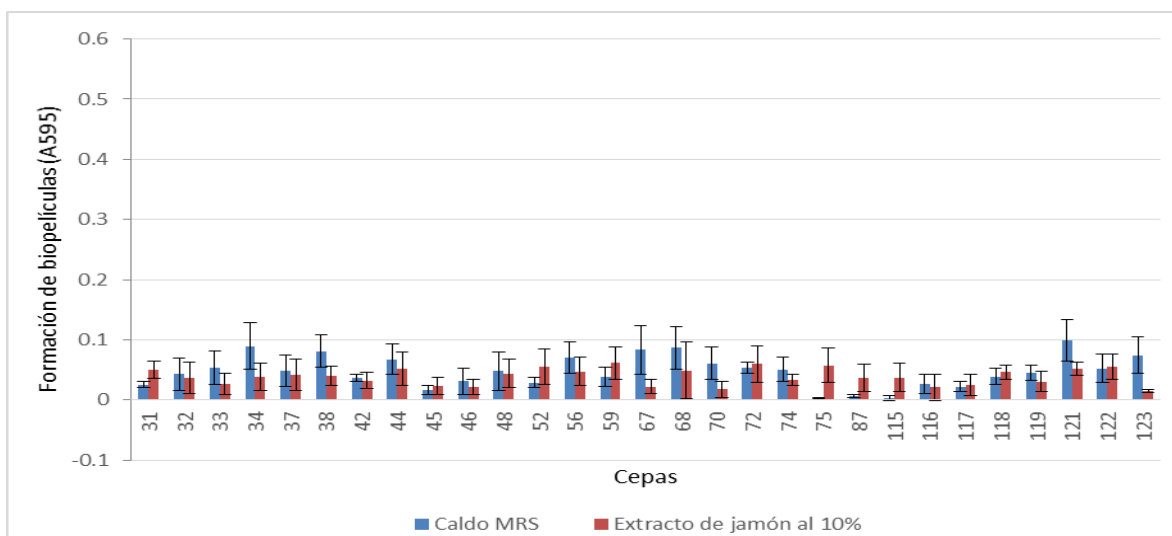
AL observar la producción de biopelículas en cada una de las cepas de BAL a 25 °C, nuevamente en caldo MRS ocurrió la mayor producción de biopelículas en la mayoría de las cepas. Sin embargo, se observó que algunas

cepas produjeron más cantidad de biopolímeros cuando se encontraban en el extracto de jamón al 10% (52, 59, 72, 87, 118, 119, 122 y 123). Este comportamiento resulta interesante y podría estar asociado a su historia previa, ya que al haber sido aisladas de la planta procesadora, éstas se encuentran adaptadas al sustrato (JCR).



Las barras representan la media de 3 datos \pm desviaciones estándar (barras de error) de tres experimentos.

Figura 11. Formación de biopelículas por BAL en caldo MRS y extracto de jamón al 10% almacenado a 25 °C.



Las barras representan la media de los datos \pm desviaciones estándar (barras de error) de tres experimentos.

Figura 12. Formación de biopelículas en caldo MRS y extracto de Jamón (10 %) a 4 °C.

En las Figuras 11 y 12 se muestra la formación de biopelículas por cada una de las cepa durante la incubación a 25 y a 4 °C, respectivamente. La producción de polímeros a temperatura ambiente en ambos substratos fue mayor aunque heterogénea, mientras que en refrigeración fue menor y más uniforme.

Estos resultados concuerdan con lo reportado con Bonaventura *et al.*, (2007) donde estudiaron la influencia de la temperatura en la formación de biopelículas por cepas de *L. monocytogenes*, donde reportan que existió un incremento significativo en la hidrofobicidad de la membrana de la célula conforme aumentaba la temperatura de incubación, lo que se relaciona con la formación de biopelículas al provocar una mayor adherencia de las células a las superficies, parte importante para el establecimiento de la biopelícula en su fase reversible.

Otro estudio que confirma este comportamiento es el de Malheiros *et al.* (2010) donde realizaron ensayos de adherencia con cepas de *Staphylococcus aureus* sobre placas de polietileno y acero inoxidable observaron que cuando eran incubadas a 20 °C encontraban un incremento en los recuentos de las células adheridas para ambas superficies en comparación con las temperaturas de incubación más bajas (7 y 10 °C). Cabe señalar que es importante considerar que aunado a la adhesión a la superficie el desarrollo de microorganismos a bajas temperaturas reduce de manera considerable su metabolismo, duración de fase lag, tasa de desarrollo y por consiguiente la producción de biopolímeros, ya que todas las reacciones biológicas fundamentales son dependientes de la temperatura y su influencia es más inmediata e intensa que los observados por otros factores (Composición de la atmósfera, humedad relativa, etc) (Fernández, 2008).

La técnica espectrofométrica empleada para la cuantificación de las biopelículas presenta variabilidad, sin embargo permite hacer una estimación en términos generales de la cantidad de biopolímeros formados alrededor o en el fondo de los pozos de la microplaca, una de sus ventajas es que permite el

estudio de la formación de biopolímeros en mezcla de cepas y en diferentes estados de crecimiento. Además de la facilidad, bajo costo y flexibilidad del ensayo lo ha convertido en una herramienta fundamental para el estudio de biopelículas (O'Toole, 2011).

Selección de las BAL.

Para conocer si existía asociación entre la capacidad para deteriorar el JCR y para formar biopelículas en cada una de las cepas de BAL se realizó un análisis de correlación. En la Figura 13 se muestra la correlación para el almacenamiento a 25 °C. Se puede apreciar que las cepas seleccionadas dentro del óvalo rojo (121, 122, 123, 44, 34 y 37) deterioraron el JCR a los 3 días de almacenamiento además de mostrar una buena formación de biopolímeros.

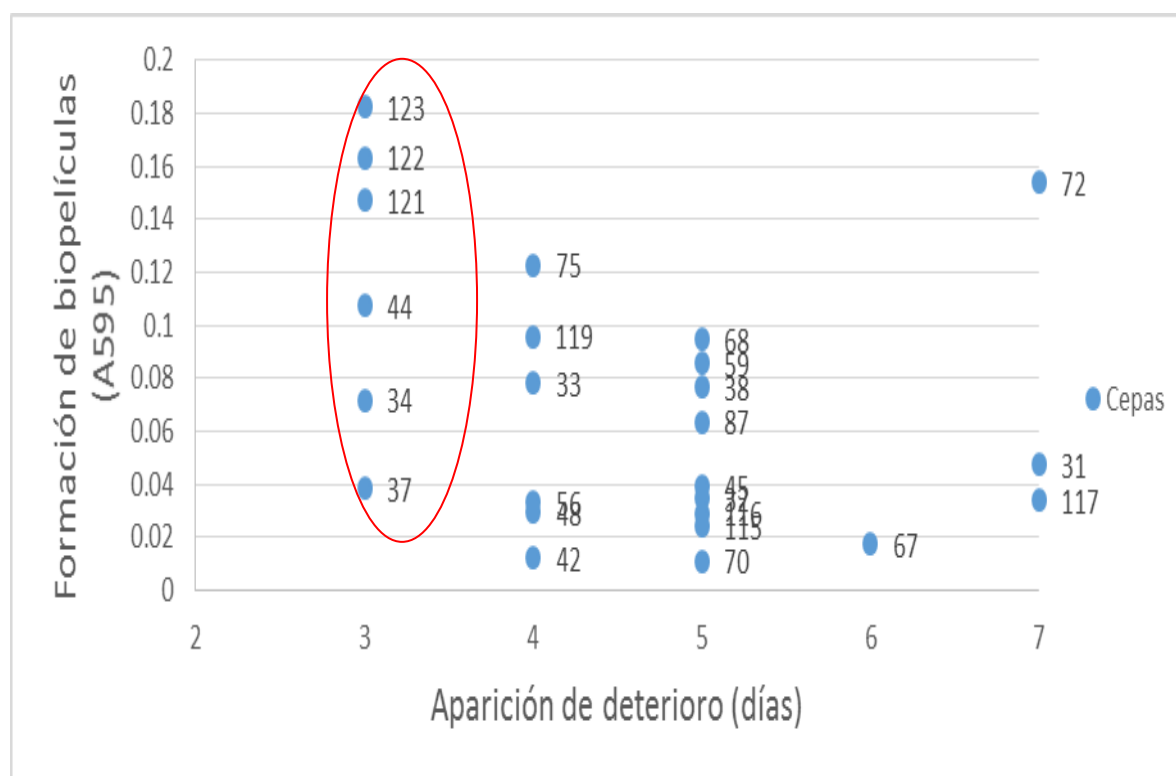


Figura 13. Análisis de correlación entre la capacidad de deterioro de JCR y la formación de biopelículas de BAL a 25 °C.

En los estudios realizados a 4 °C (Figura 14) 11 de las 32 cepas estudiadas (marcadas con un óvalo rojo) deterioraron el JCR a los 35 días de almacenamiento en refrigeración; dentro de éste grupo las cepas 72, 121 y 122 también mostraron una buena formación de biopolímeros.

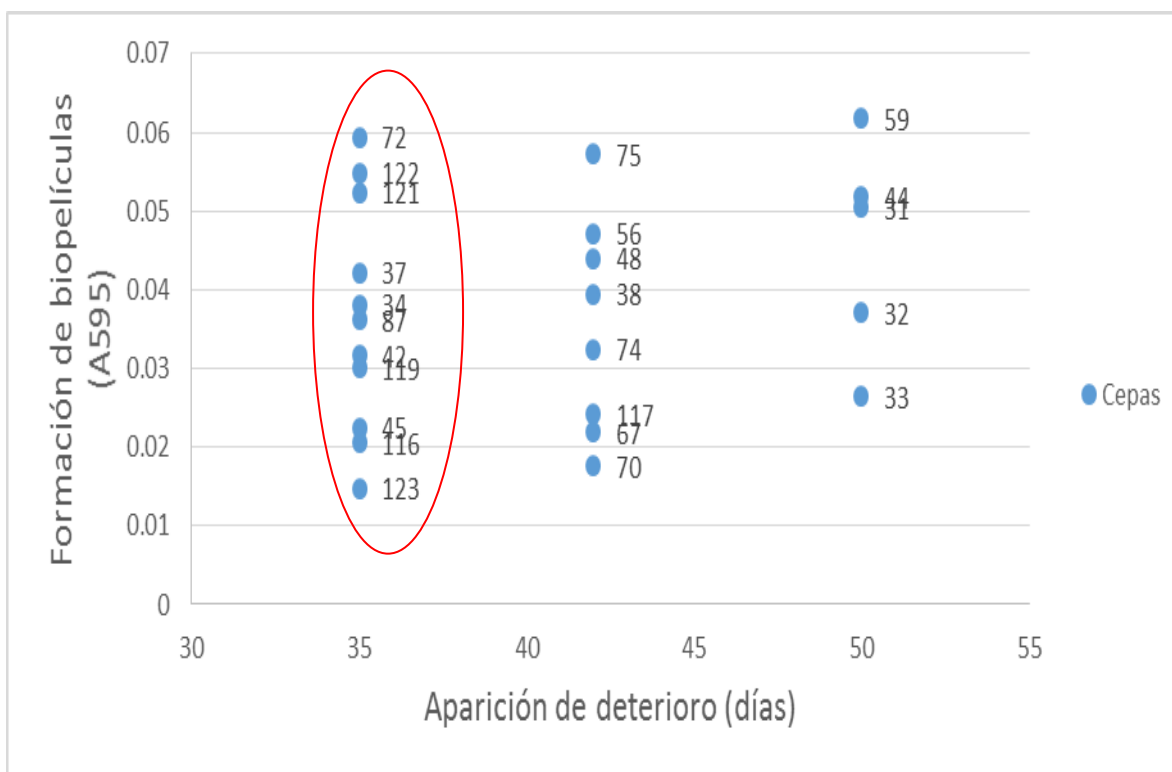


Figura 14. Análisis de correlación entre la capacidad de deterioro de JCR y la formación de biopolímeros de BAL a 4 °C.

Tomando en consideración la información obtenida con el análisis de correlación se empleó como criterio de selección para las BAL, el hecho de que en ambas temperaturas de almacenamiento coincidieran con propiciar el deterioro del jamón en los primeros días y de mostrar la capacidad de formar biopolímeros. Por lo tanto las cepas que contaban con las características antes mencionadas fueron las cepas 34, 37, 121, 122 y 123.

VI.3 Identificación de las BAL seleccionadas.

Las cepas de BAL 34, 37, 121, 122 y 123 seleccionadas por su capacidad deterioradora de JCR y de formar biopolímeros se identificaron bioquímicamente mediante el sistema BIOLOG el cual emplea 96 pruebas bioquímicas miniaturizadas (Cuadro 8).

Cuadro 8. Identificación bioquímica de cepas de BAL seleccionadas.

Cepa	Microorganismo	Similitud	Distancia genética
34	<i>Lactobacillus mali</i>	0.63	5.36
37	<i>Leuconostoc citreum</i>	0.63	5.39
121	<i>Streptococcus citratus</i>	0.76	4.04
122	<i>Streptococcus citratus</i>	0.76	3.45
123	<i>Streptococcus citratus</i>	0.72	4.05

Se obtuvieron bajos porcentajes de similitud (con respecto al porcentaje esperado mayor a 0.9) entre la base de datos del programa de BIOLOG y el perfil bioquímico de las BAL seleccionadas, lo que no permite una identificación confiable de los microorganismos.

Los microorganismos identificados de acuerdo a la literatura pueden estar presentes en productos curados deteriorados. Blickstad (1983) aisló a *Lactobacillus mali* de carne curada de cerdo y pudo determinar que esta especie podía resistir bajos niveles de pH pero que comparada con otras especies de BAL (*Lactobacillus viridescens* y *Brochothrix thermosphacta*) era la más susceptible aún cuando era aislada de productos curados de cerdo empacados a vacío. A *Leuconostoc citreum* se le ha encontrado en alimentos fermentados especialmente

en el platillo coreano llamado Kimchi (Jihyun *et al.*, 2008). No existen reportes de aislamientos de *Streptococcus citratus* asociados al deterioro de JCR o a algún tipo de alimento.

Dado que el perfil bioquímico no resultó confiable, se realizó la identificación molecular de las cinco cepas. La identificación obtenida mediante el alineamiento en el GenBank y el número de acceso para cada una de las secuencias se muestran en la Cuadro 8. El porcentaje de identidad de las seis cepas osciló entre 92 y 99%.

Cuadro 9. Cepas identificadas por la secuenciación del gen 16S rDNA de cultivos puros de BAL seleccionadas.

Cepa	Secuencia con la mayor similitud	Identidad (%)	Número de acceso a GenBank
34	<i>Lactobacillus casei</i>	99	GQ289396.1
37	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99	JQ929648.1
121	<i>Lactobacillus graminis</i>	98	GU470987.1
122	<i>Lactobacillus sakei</i>	98	KC787547.1
123	<i>Lactobacillus curvatus</i>	99	JN811554.1

Los microorganismos identificados en este trabajo coinciden con los identificados por Hu *et al.* en el 2008 quienes realizaron un estudio enfocado a identificar bacterias causantes del deterioro de JCR. Éstos observaron un predominio del género *Lactobacillus* en comparación con *Leuconostoc*, y que específicamente *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus curvatus* eran las principales cepas aisladas del producto deteriorado. Estas dos especies predominaban desde el día 7 hasta el final del almacenamiento del alimento. Adicionalmente mencionan que el líquido viscoso generado por *Lactobacillus sakei* posee una fuerte actividad

competitiva (dependiente de la concentración de bacteriocinas generadas) y por ende el predominio de esta especie sobre las demás.

Otros microorganismos deterioradores importantes en el JCR son *Leuconosctoc mesenteroides*, *Leuconosctoc citreum*, así como *Carnobacterium* spp., *Enterococcus* spp. y *Pediococcus* spp (Kreyenschmidt *et al.*, 2009)

Es importante señalar que después del proceso de cocción del jamón llega a eliminarse la carga microbiana presente, sin embargo, después del rebanado el producto puede ser recontaminado por los géneros arriba mencionados. Y aunque el JCR contiene dentro de su formulación nitritos que llegan a inhibir a una gran cantidad de microorganismos, al suprimir el sistema de transporte de electrones en la cadena respiratoria. El crecimiento de las BAL no se ve afectado debido a que estas no poseen el sistema de transporte de electrones (Hamasaki *et al.*, 2003).

VI.4 Interacción entre BAL y *L. monocytogenes* en medio líquido y acero inoxidable

La dinámica de la flora bacteriana en los alimentos se caracteriza por cambios cualitativos y cuantitativos entre diferentes grupos de microorganismos. En relación con las BAL tres características las hacen particularmente interesantes: a) su efecto antagónico sobre bacterias patógenas taxonómicamente relacionadas, b) su efecto en el deterioro del alimento y c) las relaciones entre BAL (Fernández, 2008).

El desarrollo de BAL propicia un acentuado ambiente hostil para el crecimiento y aún la sobrevivencia de las bacterias patógenas. Los efectos inhibitorios y destructivos no son sólo resultado de una acidificación del medio; otros mecanismos pueden intervenir y entre ellos se cuentan la producción de agua oxigenada, antibióticos o de ácidos grasos volátiles, la secreción de bacteriocinas y el agotamiento de nutrientes por competencia (Samelis, 2008).

Primeramente se llevó a cabo el estudio de la interacción entre células en suspensión (planctónicas) de cultivos puros de las cepas de BAL seleccionadas (34, 37, 121, 122 y 123) y *L. monocytogenes* (ATCC 19115). El estudio se llevó a cabo mezclando cada una de las cepas de BAL con *L. monocytogenes* en CST y extracto de jamón; de manera simultánea se realizó el estudio de la mezcla de cepas junto al patógeno sobre una superficie inerte (acero inoxidable) a 25 y 4 °C.

En las mezclas de BAL/*L. monocytogenes* inoculados en CST a 25 °C, a las 96 horas de incubación el crecimiento de BAL y de *L. monocytogenes* fue menor en comparación con los controles en donde cada microorganismo se inoculó por separado (Figura 15). El comportamiento de las cinco cepas de BAL fue similar hasta las 24 horas, incrementándose la población en aproximadamente 2 Log, a partir de ese momento el comportamiento fue ligeramente diferente para cada cepa; a las 96 horas de incubación la diferencia en las poblaciones de BAL en cultivo puro (controles) y BAL en mezcla (con el patógeno) fue entre 1 y 2 Log UFC/ml.

Con respecto a los controles (cultivos puros), a excepción de la cepa 121, el resto de las cepas de BAL ocasionaron una disminución de aproximadamente 2 Log UFC/ml en el desarrollo de *L. monocytogenes* cuando ambos microorganismos se encontraban en mezcla. El efecto antagónico sobre el patógeno comienza a ser evidente a partir de las 24 horas de incubación. Esta disminución pudiera deberse que la presencia de la BAL en el medio propicia un ambiente hostil para el patógeno. Debido al potencial de producción de metabolitos por parte de las BAL con actividad antimicrobiana como ácidos orgánicos (ácido láctico y acético), peróxido de hidrógeno, enzimas antimicrobianas y bacteriocinas (De Martinis *et al.*, 2003).

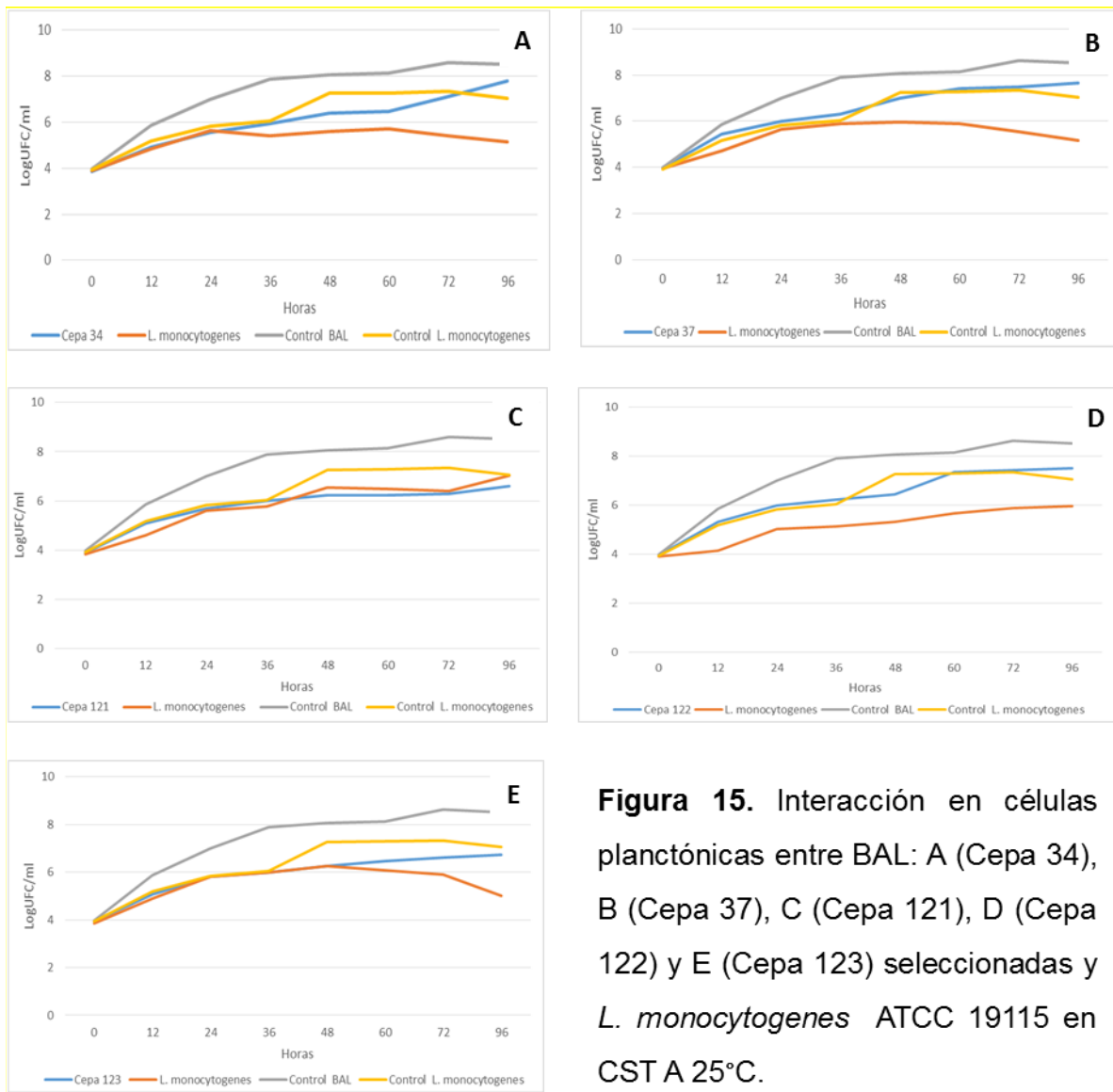


Figura 15. Interacción en células planctónicas entre BAL: A (Cepa 34), B (Cepa 37), C (Cepa 121), D (Cepa 122) y E (Cepa 123) seleccionadas y *L. monocytogenes* ATCC 19115 en CST A 25°C.

Control BAL: mezcla de BAL sin *L. monocytogenes*.

Control *L. monocytogenes*: cultivo inoculado únicamente con *L. monocytogenes*.

En las mezclas de BAL/*L. monocytogenes* inoculados en extracto de jamón al 10% a 25 °C, a partir de las 48 horas de incubación el crecimiento de BAL y de *L. monocytogenes* fue menor en comparación con los controles en donde cada microorganismo se inoculó por separado (Figura 16). A las 96 horas de incubación la diferencia en las poblaciones de BAL en cultivo puro (controles) y BAL en mezcla (con el patógeno) fue de 2 Log UFC/ml excepto la cepa 122 en la cual existió una diferencia de 1 Log UFC/ml.

Con respecto a los controles (cultivos puros), sólo las cepas 34 y 123 mostraron una disminución entre 1.5 y 2 Log UFC/ml en el desarrollo de *L. monocytogenes* cuando ambos microorganismos se encontraban en mezcla. El efecto antagónico sobre el patógeno comienza a ser evidente a partir de las 48 horas de incubación para estas cepas.

En general se observó que existieron diferencias en el comportamiento de las cepas al ser incubadas en los diferentes sustratos. Para CST, todas las cepas disminuyeron su crecimiento con respecto al control, al incubarse en este medio sólo una cepa no mostró un efecto antagónico sobre *L. monocytogenes*, para los que sí lo presentaron ocurrió a las 24 horas. Para el Extracto de Jamón al 10%, sólo dos cepas tuvieron un efecto antagónico ante *L. monocytogenes* después de 48 horas de incubación.

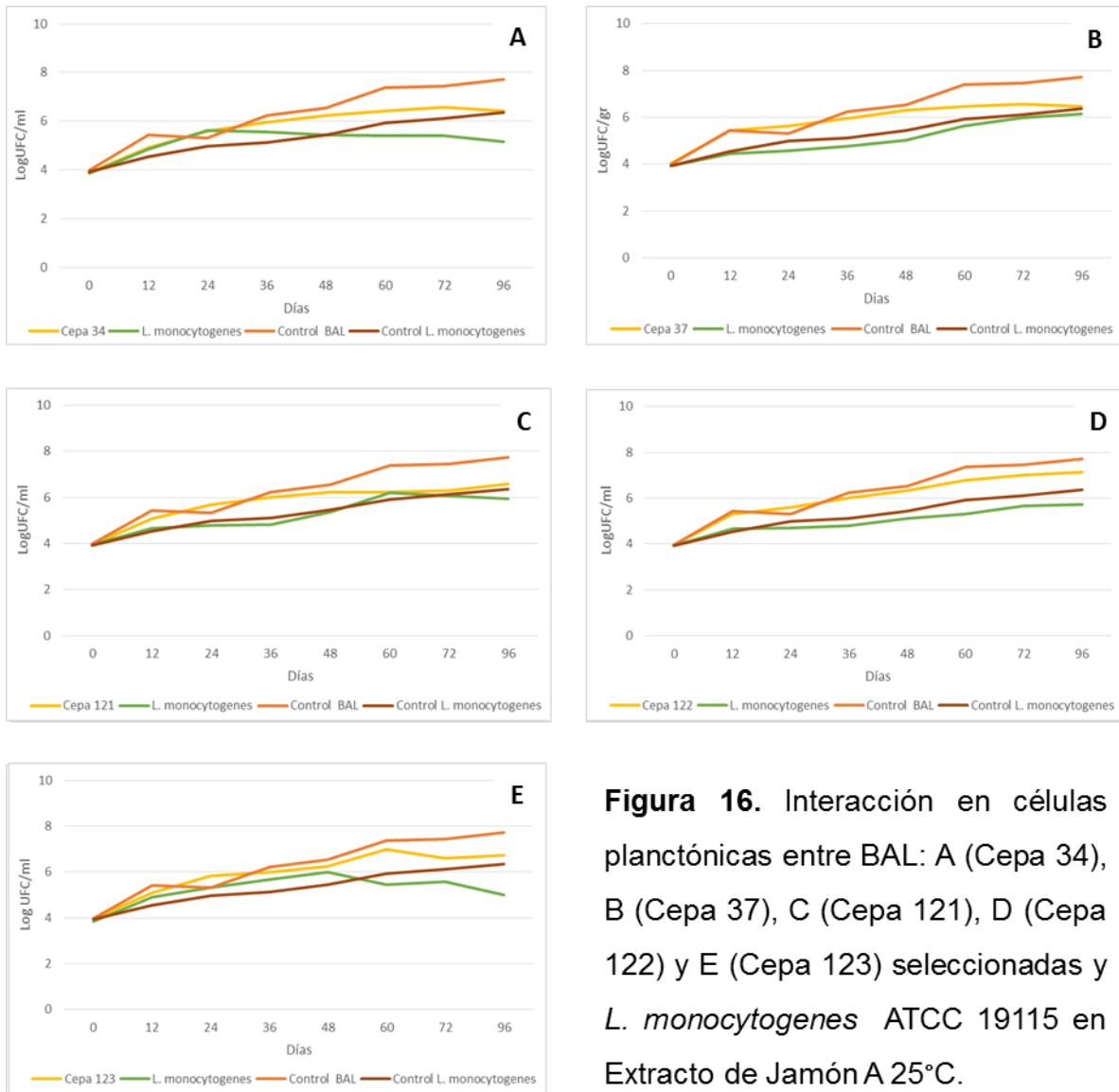


Figura 16. Interacción en células planctónicas entre BAL: A (Cepa 34), B (Cepa 37), C (Cepa 121), D (Cepa 122) y E (Cepa 123) seleccionadas y *L. monocytogenes* ATCC 19115 en Extracto de Jamón A 25°C.

Control BAL: Se refiere a la mezcla de BAL sin *L. monocytogenes* y Control *L. monocytogenes*: Es sólo *L. monocytogenes*.

En las mezclas de BAL/*L. monocytogenes* inoculados en CST a 4 °C (Figura 17). El comportamiento de las cinco cepas de BAL fue similar hasta el día 7 incrementándose la población en aproximadamente 2 Log; al día 7 de incubación la diferencia en las poblaciones de BAL en cultivo puro (controles) y BAL en mezcla (con el patógeno) fue menos de 1 Log UFC/ml.

Con respecto a los controles (cultivos puros), las cepas 34, 37 y 123 de BAL ocasionaron una disminución de aproximadamente 1 Log UFC/ml en el desarrollo

de *L. monocytogenes* cuando ambos microorganismos se encontraban en mezcla. El efecto antagonístico sobre el patógeno comienza a ser evidente a partir del día 5 de incubación. Esta disminución la disminución fue menos a lo observado por el mismo medio a 25 °C, por lo que pudiera deberse al efecto de la temperatura sobre el desarrollo de los microorganismos.

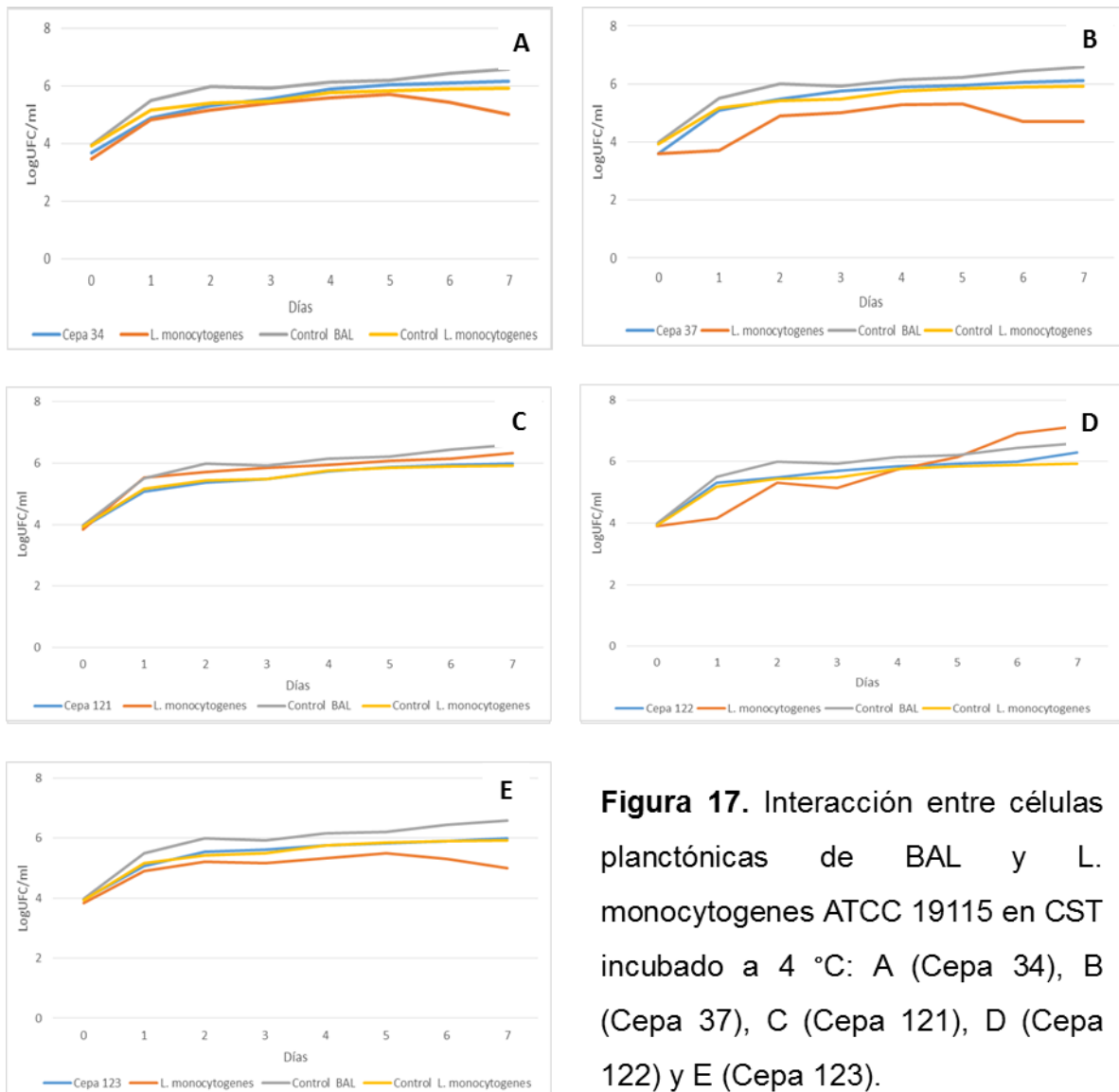


Figura 17. Interacción entre células planctónicas de BAL y *L. monocytogenes* ATCC 19115 en CST incubado a 4 °C: A (Cepa 34), B (Cepa 37), C (Cepa 121), D (Cepa 122) y E (Cepa 123).

Control BAL: Se refiere a la mezcla de BAL sin *L. monocytogenes* y Control *L. monocytogenes*: Es sólo *L. monocytogenes*.

En las mezclas de BAL/*L. monocytogenes* inoculados en extracto de jamón al 10% a 4 °C (Figura 18), el crecimiento de BAL en comparación a su control fue

muy similar y el crecimiento de *L. monocytogenes* fue menor a partir del día 5, sólo en la cepa 123 disminuyó al día 4 de incubación, en comparación con los controles en donde cada microorganismo se inoculó por separado (Figura 17). La mayor disminución para *L. monocytogenes* fue de 2 Log UFC/ml cuando se encontraba en mezcla con la cepa 121.

En general, existió diferencia entre el desarrollo de las cepas debido a la temperatura, se demostró la presencia de un efecto antagónico entre BAL/ *L. monocytogenes* a 25 °C en caldo MRS (para 4 cepas) y en Extracto de Jamón al 10%; sin embargo a 4 °C se observaron recuentos bajos de microorganismos y un efecto antagónico no significativo (menor a 1 Log UFC/ml). Dicho estudio demostró que a 25 °C hubo un crecimiento de 8 Log UFC/ml y para 4 °C de 6 Log UFC/ml.

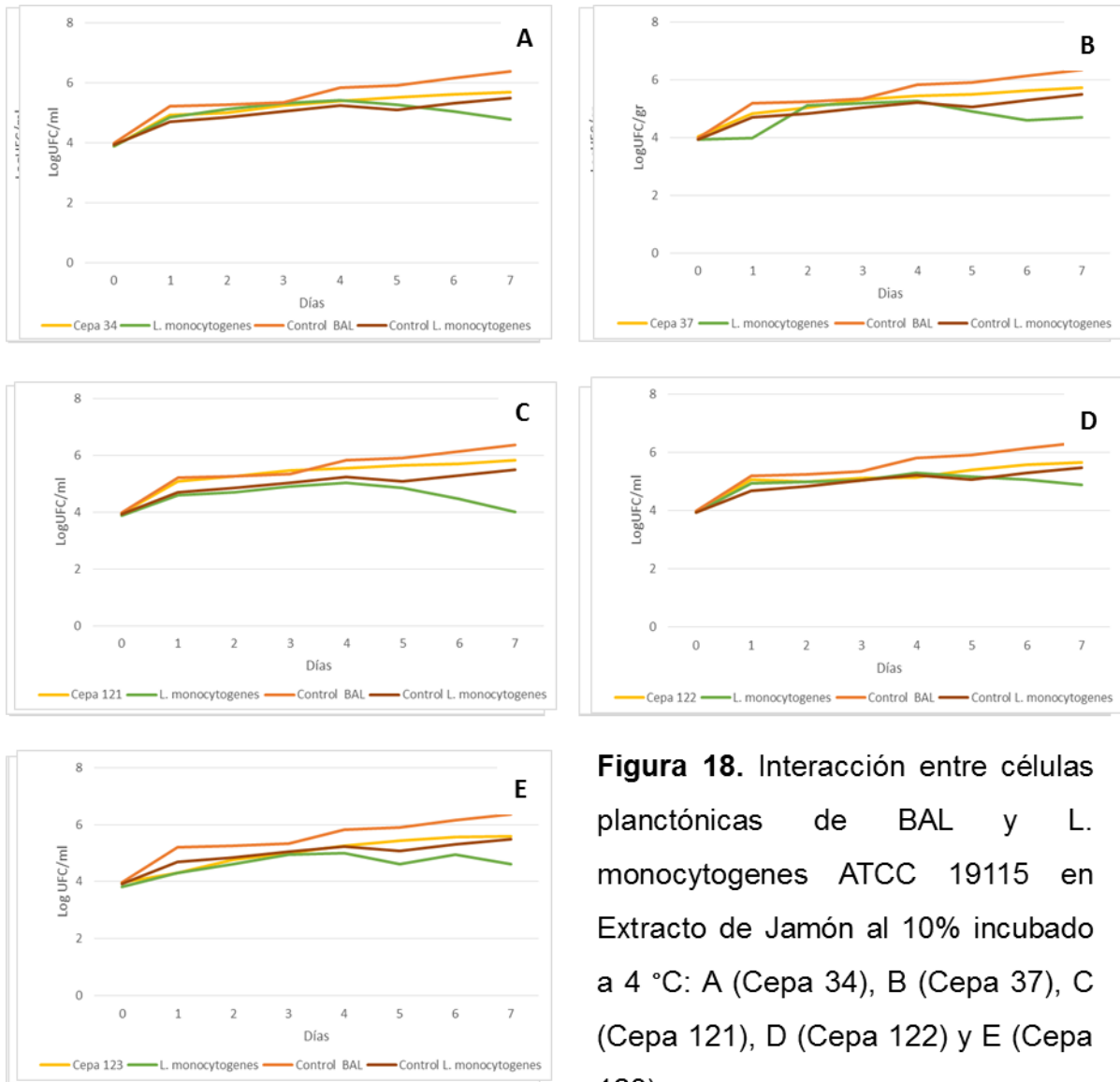


Figura 18. Interacción entre células planctónicas de BAL y *L. monocytogenes* ATCC 19115 en Extracto de Jamón al 10% incubado a 4 °C: A (Cepa 34), B (Cepa 37), C (Cepa 121), D (Cepa 122) y E (Cepa 123).

Control BAL: Se refiere a la mezcla de BAL sin *L. monocytogenes* y Control *L. monocytogenes*: Es sólo *L. monocytogenes*.

Finalmente se evaluó la capacidad de la mezcla de BAL y *L. monocytogenes* para formar biopelículas sobre acero inoxidable que es el material comúnmente usado en la industria de los alimentos. Se inocularon tubos de CST y extracto de jamón con una suspensión de la mezcla de bacterias (BAL y *L. monocytogenes*) y a cada tubo se agregó una placa de acero inoxidable; los tubos se incubaron a 25 y 4 °C. Periódicamente, se cuantificaron las células adheridas a

la superficie de la placa de acero y la cantidad de biopolímeros formados (mediante el método espectrofotométrico).

Para el CST a 25 °C se obtuvieron los siguientes resultados:

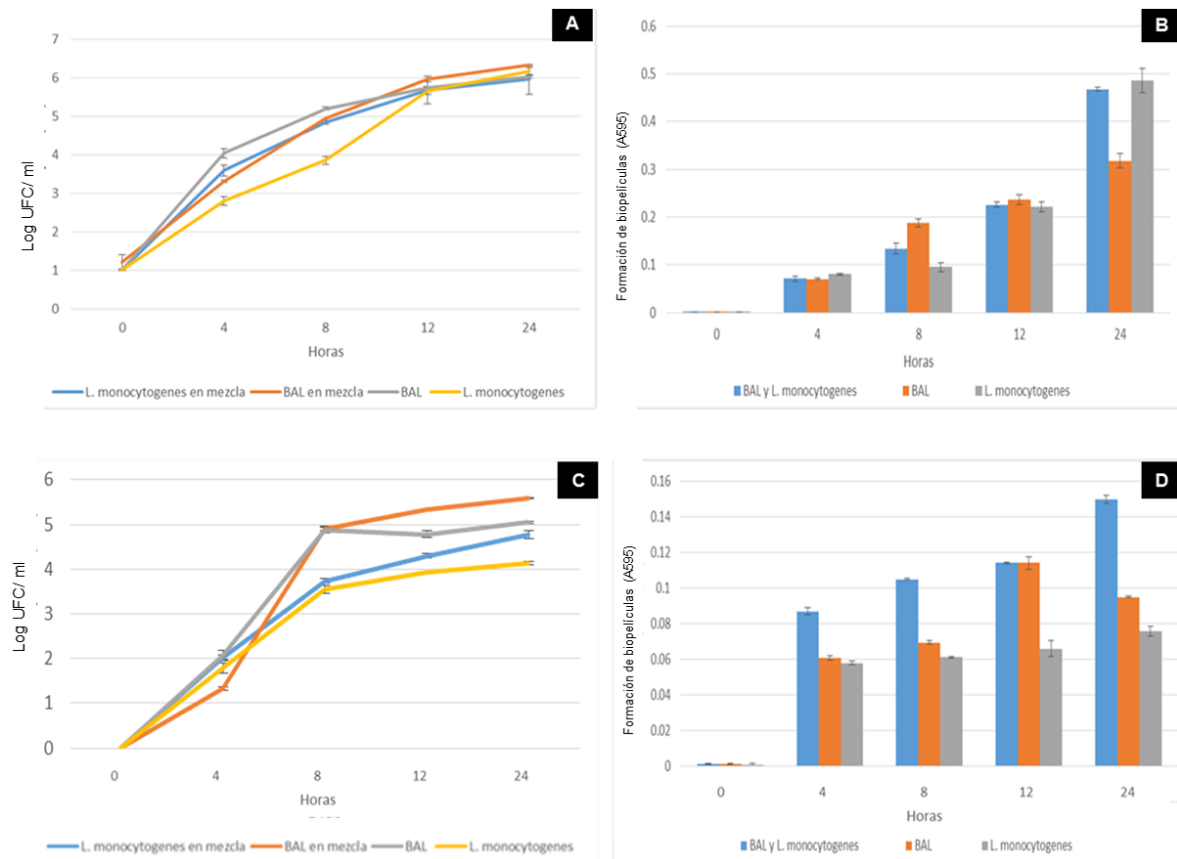


Figura 19. Crecimiento y formación de biopelículas en una mezcla de BAL y *L. monocytogenes* sobre placas de acero inoxidable inmersas en CST y extracto de jamón durante el almacenamiento a 25 °C. A) Poblaciones microbianas en CST; B) Cuantificación de biopelículas en CST; C) Poblaciones microbianas en extracto de jamón; B) Cuantificación de biopelículas en extracto de jamón.

En la Figura 19, inciso A, se muestra el recuento de las células adheridas a las placas de acero inmersas en CST e incubadas a 25 °C. No se observan diferencias significativas en el crecimiento de las cepas de BAL, *L. monocytogenes* y la mezcla de ambos tipos de microorganismos ya que transcurridas 24 horas se

obtuvo el mismo desarrollo para todos los tratamientos (aproximadamente 6 Log UFC/ml).

En la Figura 19, inciso B, se observa que a partir de las 4 horas de almacenamiento existe una producción gradual de biopolímeros para *L. monocytogenes* (control), la mezcla de BAL (control) y la mezcla BAL/patógeno. Sin embargo, es claro que bajo las condiciones del experimento la capacidad de *L. monocytogenes* para formar biopelículas es superior, ya que a las 24 horas se obtuvo una densidad óptica (0.312) parecida a las cepas en mezcla (BAL-patógeno), lo que hace suponer que el incremento en la densidad óptica de las 12 a las 24 horas fue ocasionado por los biopolímeros producidos principalmente por el patógeno.

El desarrollo de BAL, *L. monocytogenes* y la mezcla BAL-*L. monocytogenes* dentro de las biopelículas formadas en las placas de acero inoxidable a 4 °C en CST, fue similar (Figura 18, inciso C). Este hecho hace suponer que no existe un efecto inhibitorio de las BAL hacia el patógeno. La resistencia del patógeno una vez que se encuentra formando parte de una biopelícula puede ser explicado de acuerdo a lo estudiado por Kubota *et al* (2008) donde a partir de microscopía electrónica de barrido observaron células sobrevivientes que formaban parte de biopelículas al estar en contacto con distintos agentes antimicrobianos (ácidos, antimicrobianos, etc), donde sugieren que existen tres mecanismos que pudieran explicar la resistencia de las células estando dentro de la biopelícula: 1) La membrana celular se vuelve más resistente, 2) La película es constantemente reforzada con la producción de polímeros extracelulares y 3) La estructura tridimensional que posee la estructura de la biopelícula y que rodean a las células que la integran.

La formación de biopolímeros en la Figura 19, inciso D, se observa que existe una producción de biopolímeros gradual para *L. monocytogenes* (control), la mezcla de BAL (control) y la mezcla BAL-patógeno. A las 24 horas disminuye la

concentración de biopolímero formado por la mezcla de BAL. Pero cabe destacar que la mezcla BAL-Patógeno obtuvo una DO final de 0.202 lo que nos podría sugerir que en presencia de ambos grupos microbianos la producción de biopolímeros se ve promovida.

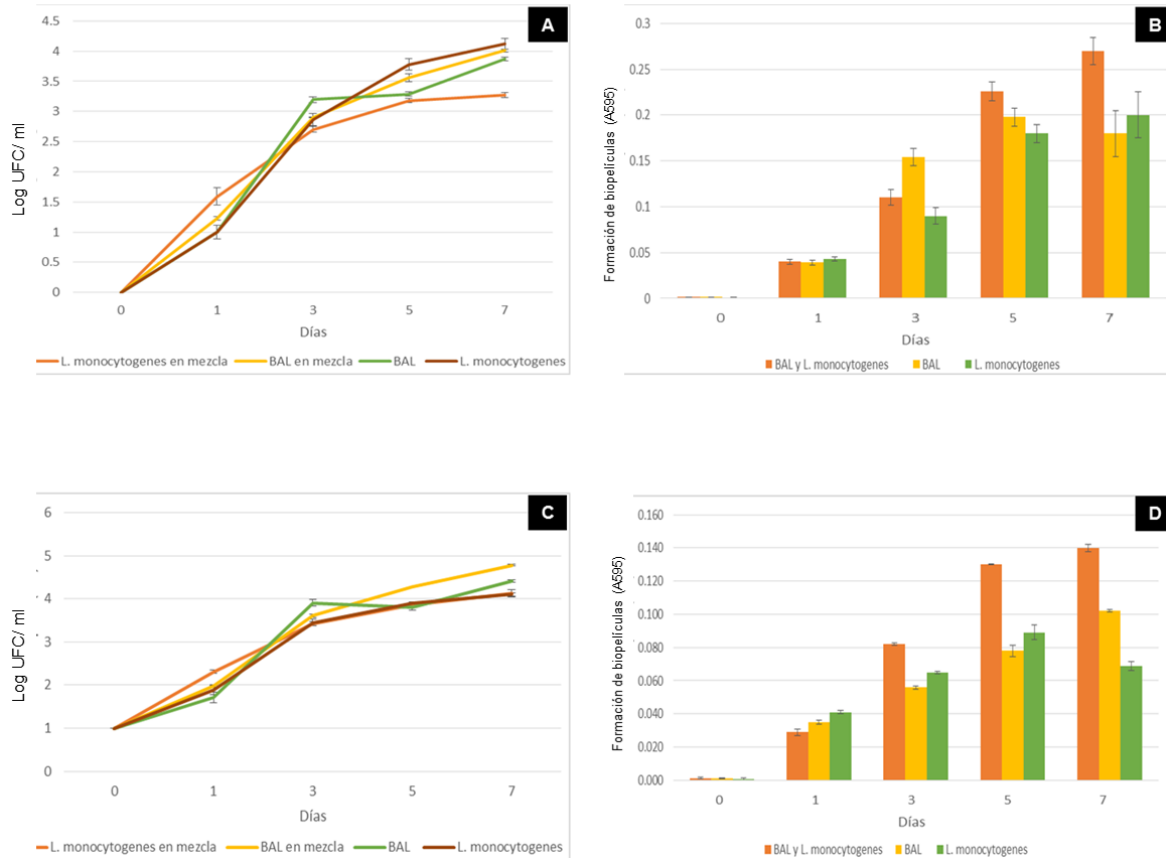


Figura 20. Crecimiento y formación de biopelículas en una mezcla de BAL y *L. monocytogenes* sobre placas de acero inoxidable inmersas en CST y extracto de jamón durante el almacenamiento a 4 °C. A) Poblaciones microbianas en CST; B) Cuantificación de biopelículas en CST; C) Poblaciones microbianas en extracto de jamón; B) Cuantificación de biopelículas en extracto de jamón.

En la Figura 20, inciso A, se muestra el recuento de las células adheridas a lasas de acero inmersas en CST e incubadas a 4 °C. No se observan diferencias significativas en el crecimiento de las cepas de BAL y la mezcla de ambos tipos de microorganismos (BAL y *L. monocytogenes*), sin embargo se observó una

disminución de 1 log UFC/ml de *L. monocytogenes* en mezcla con BAL con respecto al control del patógeno.

En la Figura 20, inciso B, se observa que a partir de los 3 días de almacenamiento existe una producción gradual de biopolímeros para *L. monocytogenes* (control), la mezcla de BAL (control) y la mezcla BAL/patógeno. Sin embargo, es claro que bajo las condiciones del experimento la mezcla BAL/patógeno fue la que presentó la mayor cuantificación de biopolímeros seguida de *L. monocytogenes* (control), para las BAL (control) se observó una disminución en la cantidad de biopolímeros del día 5 al 7 (de una DO de 0.2 a 0.18), por lo que se puede suponer que al igual que a 25 °C en CST la producción de biopolímeros para el último día de almacenamiento (7 días) es ocasionado principalmente por el patógeno.

El desarrollo de BAL, *L. monocytogenes* y la mezcla BAL-*L. monocytogenes* dentro de las biopelículas formadas en las placas de acero inoxidable a 4 °C en el Extracto de Jamón al 10%, fue similar (Figura 20, inciso C). Este hecho hace suponer que no existe un efecto inhibitorio de las BAL hacia el patógeno, similar a lo observado para el almacenamiento a la misma temperatura pero en CST.

La formación de biopolímeros en la Figura 20, inciso D, se observa que existe una producción de biopolímeros gradual para *L. monocytogenes* (control), la mezcla de BAL (control) y la mezcla BAL-patógeno. Sin embargo para el día 7 disminuye la concentración de biopolímero formado por *L. monocytogenes* (control) de 0.092 a 0.067. En estas condiciones es importante destacar que la producción de biopolímeros es determinada principalmente por las BAL ya que al día 7 obtuvieron una DO de 0.100, comparada con la mezcla BAL/patógeno (DO 0.140).

De acuerdo a los datos obtenidos en cuanto a la formación de biopelículas existen estudios (Siragusa *et al.* (2005) demostraron que la

producción de biopelículas por *L. monocytogenes* es muy variada cuando éstas se cultivan en CST, y concluyeron que el desarrollo microbiano no necesariamente es un indicativo de una alta o baja producción de biopolímeros por la cepa.

Folsom *et al.* (2006), demostraron que algunas bacterias tienen una mayor capacidad de adherencia y que una vez adheridas no necesariamente seguirán produciendo biopolímeros. Lo que ayudaría a entender el comportamiento de algunas cepas de BAL que empleamos en nuestro estudio, quienes al último día de la medición existía una reducción en la DO por parte de *L. monocytogenes* en la placa incubada en extracto de jamón a 4°C. Cabe recordar que el proceso de formación de biopelículas no necesariamente se encuentra sincronizado a través de toda la superficie, sino que generalmente ocurre de manera tal que en cualquier momento, una región de las colonias está ocupada por biopelículas en distintos estadios del desarrollo (Hilbert, 2003).

De manera general se puede suponer que existe un incremento en la producción de biopolímeros en la presencia de las BAL y *L. monocytogenes*, además de que no se observó una reducción en el desarrollo del patógeno cuando éste se encuentra adherido a la superficie inerte (acero inoxidable), además de que al promover el desarrollo y producción de biopelículas utilizando al Extracto de Jamón al 10% como sustrato y demostrar que existe una adhesión, desarrollo de las BAL y de *L. monocytogenes* (controles y mezcla) y producción de biopolímeros en la superficie de la placa de acero inoxidable, nos ayuda a suponer que una vez establecida la biopelícula por parte de microorganismos deterioradores, la llegada de este patógeno a las superficies inertes que tienen contacto con el alimento dentro de la planta procesadora de jamón cocido rebanado puede favorecer su adhesión, colonización e incorporación a la biopelícula y por ende propiciar su persistencia dentro de la planta procesadora. Lo que repercutiría en la inocuidad de los alimentos elaborados por estas empresas, ya que no sólo existiría la frecuente contaminación por parte de microorganismos deterioradores sino una constante amenaza frente al establecimiento de patógenos dentro de la misma.

VII. CONCLUSIONES

De las 131 cepas aisladas del proceso de producción de Jamón cocido rebanado (JCR) 24.4% resultaron ser bacterias ácido lácticas (BAL).

Sólo 13 de cepas BAL presentaron la mayor capacidad para deteriorar JCR en menor tiempo (3 días a 25°C y 35 días a 4°C) y de formar biopolímeros bajo las condiciones de almacenamiento establecidas.

No se observó un efecto significativo entre el tipo de sustrato utilizado (CST o extracto de jamón) para la formación de biopelículas pero si existió un efecto de la temperatura; la mayor producción de biopolímeros ocurrió a 25°C.

De las 32 cepas de BAL sólo 6 (34, 37, 121, 122 y 123) mostraron la mayor capacidad deterioradora y de formación de biopelículas.

Para células planctónicas sólo dos cepas mostraron un efecto inhibitorio al ser incubadas en CST, no observándose lo mismo cuando eran incubadas en Extracto de Jamón al 10%.

De manera general se pudo observar que la producción de biopelículas favorecía la prevalencia de *L. monocytogenes*, ya que para ambos sustratos (Extracto de Jamón al 10% y CST) no se observó una reducción significativa de éste contra el control utilizado. Además de que al encontrarse en mezcla se veía favorecida la formación de biopelículas, dando como resultado mayores valores de DO para ambos sustratos y temperaturas (4 y 25°C).

La adherencia y la colonización al material estudiado (placas de acero inoxidable) favorece la sobrevivencia de las BAL y de *L. monocytogenes*, sometidas en condiciones óptimas de crecimiento (CST a 25°C) y las condiciones simuladas de la planta de producción (Extracto de Jamón a 4°C). Por lo que existe un peligro

inminente de que al favorecer el establecimiento de BAL dentro de la planta procesadora esto repercute en una posible adhesión y persistencia de un patógeno como *L. monocytogenes* al no observar ningún efecto antagónico al interactuar con las BAL dentro de la biopelícula (para las condiciones simuladas empleadas: Extracto de jamón al 10% a 4°C).

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aymerich, T., Jofré, A., Garriga, M., & Hugas, M. 2005. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. *Journal of Food Protection*. 68: 173-177.
2. Beume, R. R., te Giffel, M. C., de Boer, E. & Rombouts, F. M. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked meat products. *Food Microbiology*. 13: 333-340.
3. Bonaventura, G. D., Piccolomini, R., Paludi, V., D' Orio, V., Vergara, A., Conter, M & Ianieri, A. 2007. *Journal of Applied Microbiology*. 104: 1552-1561.
4. Borch, E., Kant-Muermans, M.L. and Blixt, Y. (1996) Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Journal of Food Microbiology* 33: 103–120.
5. Borch, E., & Molin, G. 1988. Numerical taxonomy of psychrotrophic lactic acid bacteria from prepacked meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek* 34: 301-323.
6. Blickstad, E. 1983. Growth and end product formation of two psychrotrophic *Lactobacillus* spp. and *Bochothrix thermosphacta* ATCC 11509 at different pH values and temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. 46: 1345-1350.
7. Carlier, V., Augustin, J. C. & Rozier, J. 1996. Destruction of *Listeria monocytogenes* during a ham cooking process. *Journal of Food Protection*. 59: 592-595.
8. Cintas, L. M., Cassaus, M. P., Herranz, I.F & Hernández, P. E. 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*. 7 (4): 281-305.
9. CDC. 2014. *Listeria monocytogenes*. Outbreaks. Centers for Disease Control and Prevention. Recuperado en Noviembre del 2014. Disponible en: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>

10. CFSAN/FDA. 2001. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Food and Drug Administration. Sanitizers and detergents by Surfaces of utensils and equipment contacting potentially hazardous food. Recuperado en Agosto del 2009.
Disponibile en <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/fc01-sup.html>
11. Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*. 284: 1318-1322.
12. De Martinis, E. C. P., & Freitas, F. Z. 2003. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. *Food Control*. 14: 197–200.
13. Donlan, R.M. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emergency Infectious Diseases*. 8: 881-890.
14. Dunne WM Jr. 2002. Review. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately?. *Clinical Microbiology*. 15:155-166.
15. Fernández Escartín, E. 2008. “Microbiología e inocuidad de los alimentos”, Universidad Autónoma de Querétaro, 534-539.
16. Ferreira, V., Wiedmann, m., Teixeira, P & Stasiewickz, M., J. 2014. Review. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection*. 77 (1): 150-170.
17. Folsom, J., Siragusa, G & Frank, J. 2006. Formation of biofilm at different nutrient levels by various genotypes of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 69:826-834.
18. Guilbaud, M., Coppet, P., Bourion, F., Rachman, C., Prévost, H & Dousset, X. 2005. Quantitative detection of *Listeria mnocytogenes* in biofilms by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (4): 2190-2194.
19. Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. 2002. Food spoilage- interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 78: 79-97.
20. Griethuysen, D., Clement, V & Marcel, J. 2001. Fabricación de jamón cocido. España. 2161749. (A23L 1/31, A23L 3/015, A23B 4/00). 1-7.

21. Hall, S & Stoodley, P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*. 11: 1034-1043.
22. Hicks A. Value-Added food products processing for micro-income generation of rural communities in Myanmar. *Agriculture and consumer protection*. FAO. Recuperado: Noviembre 2014. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/AD379E/AD379E02.htm#ch2.1>
23. Hilbert L. R., Bagge-Raun D., Kold J & Gram L. 2003. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 52: 175-185.
24. Instituto Politécnico Nacional. Academia del área de plantas piloto de alimentos. 2004. *Introducción a la tecnología de alimentos*. Limusa Noriega Editores (2da. Ed). México, D.F.
25. Jasso Hinojosa René, 2008. *Procedimientos Estándares Operacionales en la Industria Alimentaria*. Programa Universitario de Alimentos. UNAM.
26. Kawarai, T., Furukawa, S & Yamashi, M. 2007. Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeast. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (14): 4673-4676.
27. Korkeala, H., Alanko, T., Makela, P. & Lindroth, S. 1989. Shelf life of vacuum-packed cooked ring sausages at different chill temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. 9: 237-247.
28. Kotzekidou, P. & Bloukas, J. C. 1996. Effect of protective cultures and packaging film permeability on shelf-life of sliced vacuum-packed cooked ham. *Meat Science*. 42: 333-345.
29. Kreyenschmidt, J., Hübner, A., Beierle, E., Chonsch, L., Scherer, A & Petersen, B. 2009. Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. *Journal of Applied Microbiology*. 108: 510-520.
30. Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H & Uchiyama, H. 2008. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal Bioscience and Bioengineering*. 106: 381–386.

31. Latorre A. A., Van Kessel J. S., Zurakowski M. J., Predhan A. K., Boor K. J., Jayarao B. M., Houser B.A., Daugherty C.S & Schukken Y. H. 2010. Biofilm in milking equipment on dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. Journal of Dairy Science. 93: 2792-2802.
32. Lagares, J. 2014. Proceso de fabricación de productos cárnicos cocidos de músculo entero V: Cocción. Metalquimia. Recuperado en Noviembre de 2014. Disponible en:
<http://es.metalquimia.com/upload/document/article-es-13.pdf>
33. López, J. M., & Quiroga, G. 2004. Industrias cárnicas. Universidad Nacional de Colombia. Disponible en:
<http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2001819/index.html>.
34. Man, D. 2002. Food industry briefing series: shelf life. Blackwell Science (1era Ed). London. 3-4.
35. María Teresa Sánchez Pineda de las Infantas. 2003. Procesos de elaboración de alimentos y bebidas. Mundi Prensa. (1ra. Ed). Madrid, España.
36. Mora, S.L. 2010. Determinación de compuestos bioquímicos para el control de la calidad en la elaboración del jamón cocido y jamón curado. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.
37. Navarro, S. E. 1997. Manteniendo la Calidad en un Jamón Económico. CarneTec. 4: 36-38.
38. Nealson, K. H., Platt, T., & Hastings, J. W. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system, Journal of Bacteriology 104: 313-322.
39. Nychas, G.-J.E., Marshall, D. and Sofos, J. (2007) Meat poultry and seafood. In Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers 3rd edn ed. Doyle, M.P. and Beuchat, L.R. 105–140. Washington, DC: ASM press.
40. Nikmaram, P., Mohamad, S. Y., Zahra, E., & Hiva K, D. 2011. The effect of cooking methods on textural and microstructure proprieties of veal muscle (*Longissimus dorsi*). Global Veterinaria. 6 (2): 201-207.

41. Peck, M. W., & Stringer, S. C. 2005. The safety of pasteurized in-pack chilled meat products with respect to the foodborne botulism hazard. *Meat Science*, 70:461-475.
42. Ping, H., Zhou, G., Xu, X., Li, C & Han, Y. 2008. Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham base don 16S rDNA-DGGE. *Food Control*. 20: 99-104.
43. Pioselli, B., Paredi, G., & Mozzarelli, A. 2011. Proteomic analysis of pork meat in the production of cooked ham. *Molecular ByoSystems*. 7: 2252-2260.
44. Raab, V., Bruckner, S., Beierle, E., Kampmann, Y., Petersen, B & Kreyenschmidt, J. (2008) Generic model for the prediction of remaining shelf life in support of cold chain management in pork and poultry supply chains. *Journal Chain Network Science*. 8: 59–73.
45. Raso, J & Barbosa- Canovas, G. 2003. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43: 265-285.
46. Raventos, S. M. 2005. *Industria alimentaria: Tecnologías emergentes* (1ª. Ed) Barcelona: UPC.
47. Rondon, E., Delahaye, P. E., & Ortega, F. 2004. Estimación de la vida útil de un análogo comercial de mayonesa utilizando el factor de aceleración Q10. *Revista de la Facultad de Agronomía-LUZ*. 21: 68-83.
48. Samelis, J. 1998. Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 649-660.
49. Savitri, V., Nazli, A., Dood, R., Catherine, E., D & Waites, W. 1999. Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Applied and Enviromental Microbiology*. 66 (2): 860-863.
50. Sokunrotanak, S., Iqbal K & Sang-Do H. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*. 31: 572-585.

51. Storz, G & Hengge-Aronis, R. 2000. Preface, p. XII-XIV. In G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed). Bacterial stress responses. ASM Press, Washington, DC.
52. Thomas, J. G., & Nakaishi, L. A. 2006. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *Journal of the American Dental Association*. 137: 10-15.
53. Toldrá, F., Mora, L., & Flores, M. 2010. Cooked ham. *Handbook of Meat Processing* 301-311. Ames, Iowa, USA: Willey-Blackwell.
54. USDA. 2007. Inocuidad de la Carne de cerdo. Desde el criadero hasta la mesa del Consumidor. 1-7.
55. USDA. 2012. Jamón y la Inocuidad Alimentaria. Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos. 2-3.
56. Wesche, A. M., Gurtler, J. B., Marks, B. P., & Ryser, E. T. 2009. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogenst. *Journal of food Protection*. 72: 1121-1138.
57. Yousef, A. E., & Courtney, P. D. 2003. Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods, p. 1-30. In A. F. Yousef and V. J. Juneja (ed.). *Microbial stress adaptation and food safety*. CRC Press. Boca Rutsin, FL.
58. Zhao Q., Liu Y & Wang S. 2005. Surface modification of water treatment equipment for reducing CaSO₄ scale foration. *Desalination*. 180: 133-138.
59. Zhu, M., Takenaka S, Sato M & Hoshino E (2001) Influence of starvation and biofilm formation on acid resistance of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol*. 16: 24–27.

APÉNDICE A

Tratamiento de pasterización del JCR.

La preparación de las muestras se realizó conforme el procedimiento general V.2.1. Se realizó el recuento de la flora nativa (BAL y BMA) presentes en el JCR proveniente de la fábrica y el recuento después de haber aplicado el tratamiento térmico (75°C durante 50 min).

En la Figura 21 se muestran las comparaciones entre la concentración de BMA en JCR y la concentración final en las muestras de JCR pasteurizadas. En la Figura 19, se observan las comparaciones entre recuentos iniciales y finales para BAL.

Se observó que existía una disminución alrededor de 3 Log UFC/gr debida a la exposición al tratamiento térmico para BMA. Para BAL la disminución fue de alrededor de 4 Log UFC/g una vez expuesto el jamón rebanado al tratamiento térmico. Se puede suponer que la disminución es mayor en BAL debido a su carácter psicrótrofo y que éstas bacterias son mayormente vulnerables a morir al someterse a este tipo de tratamientos térmicos.

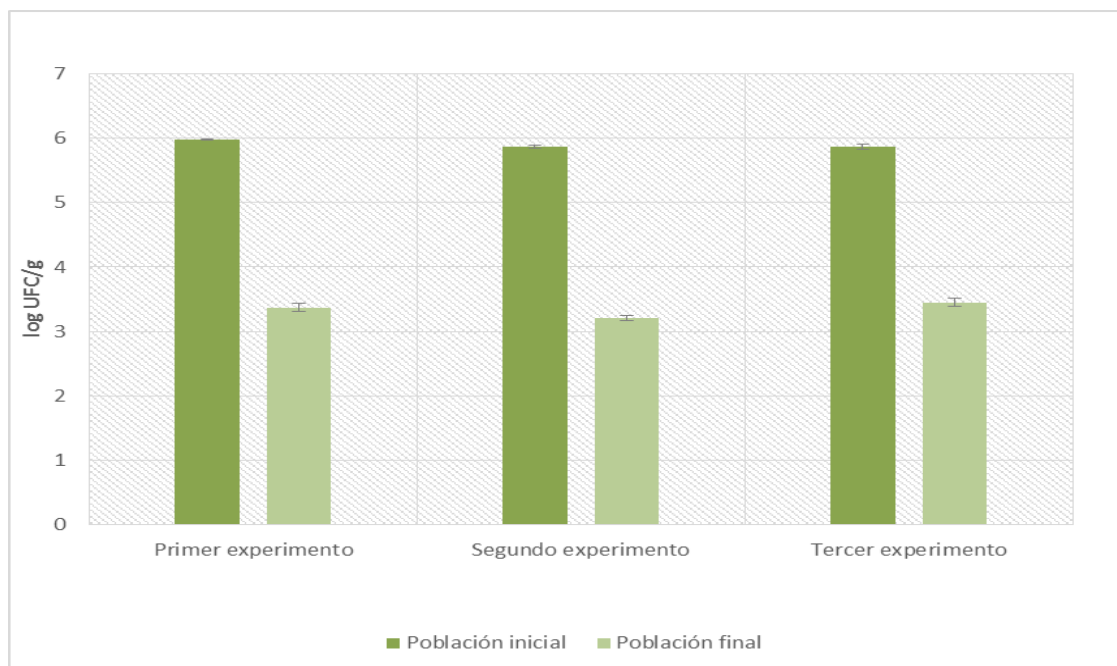


Figura 21. Contenido de BMA en JCR sin pasteurizar y pasteurizado.

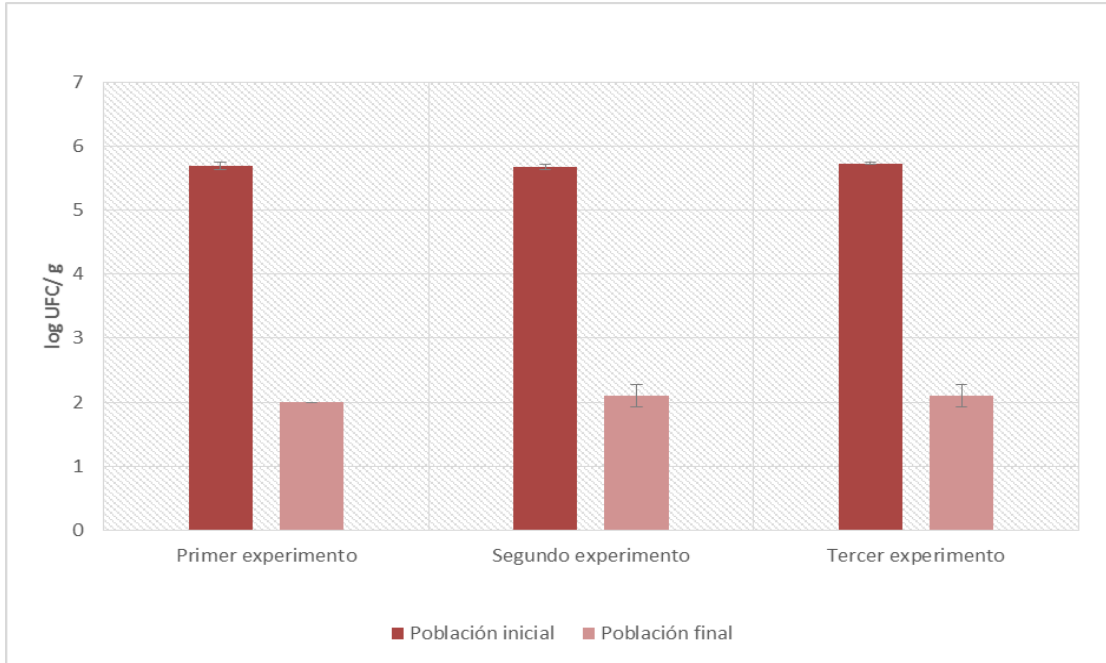


Figura 22. Contenido de BAL en JCR sin pasteurizar y pasteurizado.

APÉNDICE B

Evaluación del desarrollo de las BAL seleccionadas en extracto de jamón (10 %).

Se realizaron dinámicas de crecimiento en caldo MRS (condición óptima) y en extracto de jamón (10%) para simular una condición que eventualmente pudiera ocurrir en la planta procesadora, en caso de que hubiera residuos de alimento en los equipos y superficies. La finalidad de este estudio era comprobar que existiera crecimiento microbiano bajo estas condiciones. Se realizaron mediciones de la densidad óptica (DO) utilizando el equipo de Bioscreen. Posteriormente con los datos obtenidos se procedió a realizar el análisis de datos utilizando el programa DMFit.

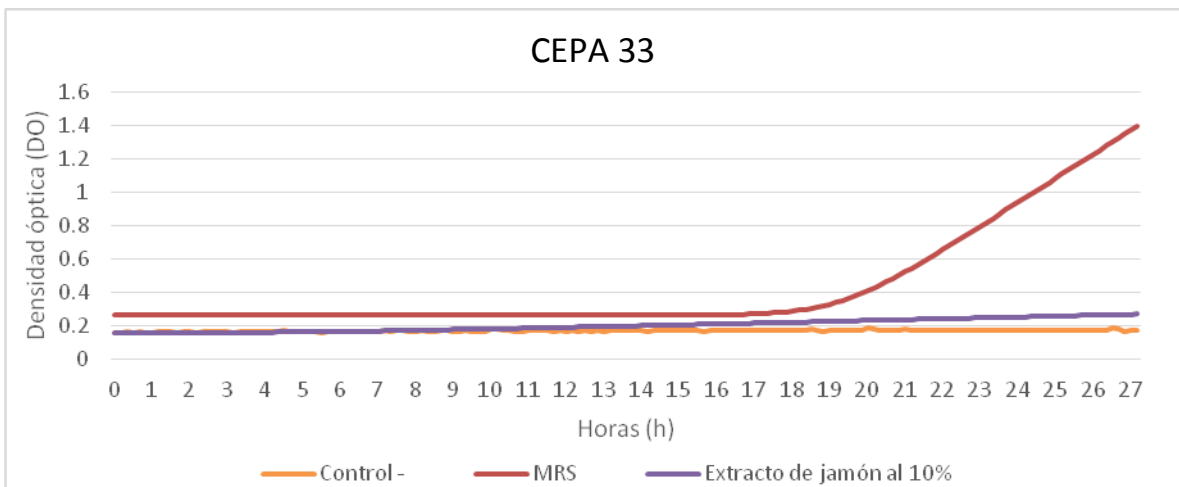
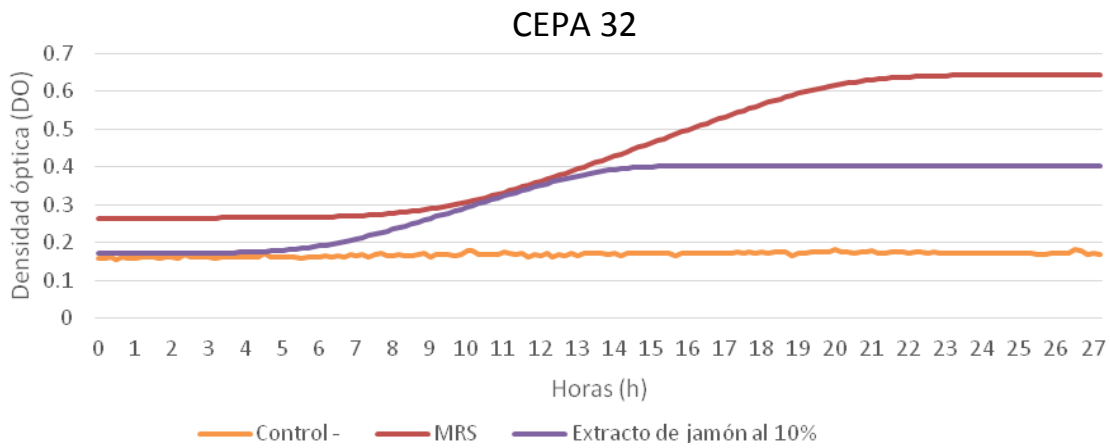
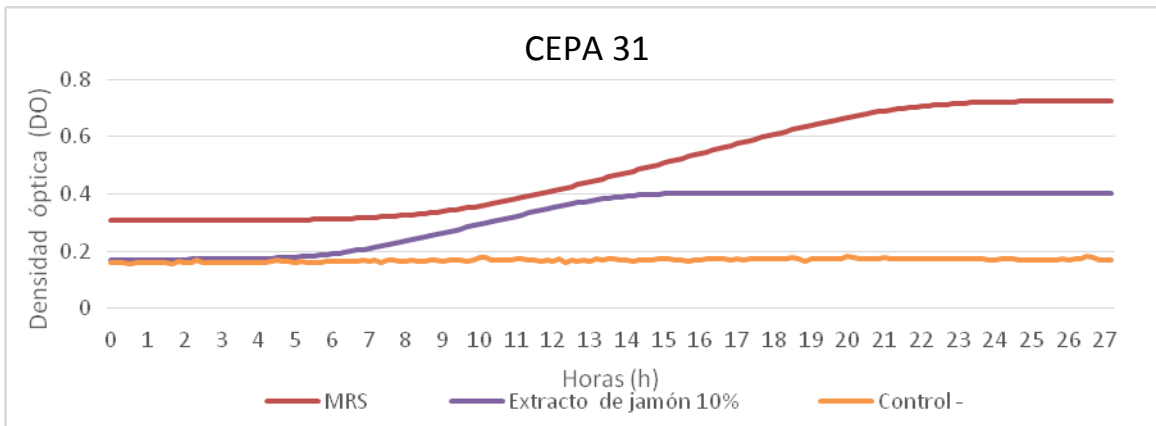
Se encontró que el extracto de jamón permitía el crecimiento de las BAL seleccionadas en el apartado VI.2.2 (Tabla 6, Figura 22). Al calcular los parámetros de desarrollo se observa una disminución en el tiempo de duración de la fase lag en el extracto de jamón y en la velocidad de desarrollo cuando se empleo como substrato el extracto de jamón. Estos resultados pueden deberse a la escasez de nutrientes o bien a la presencia de inhibidores en el extracto de jamón.

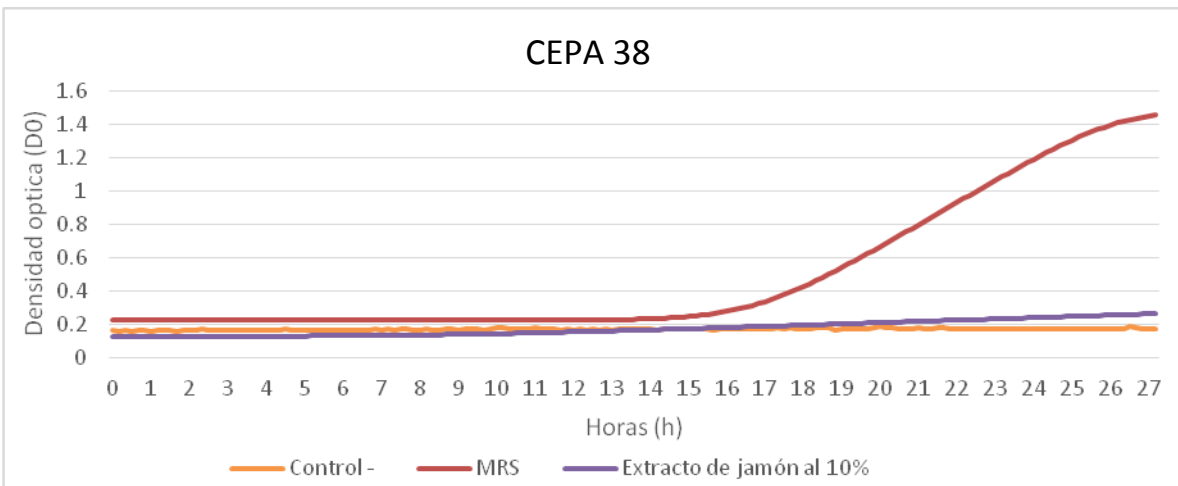
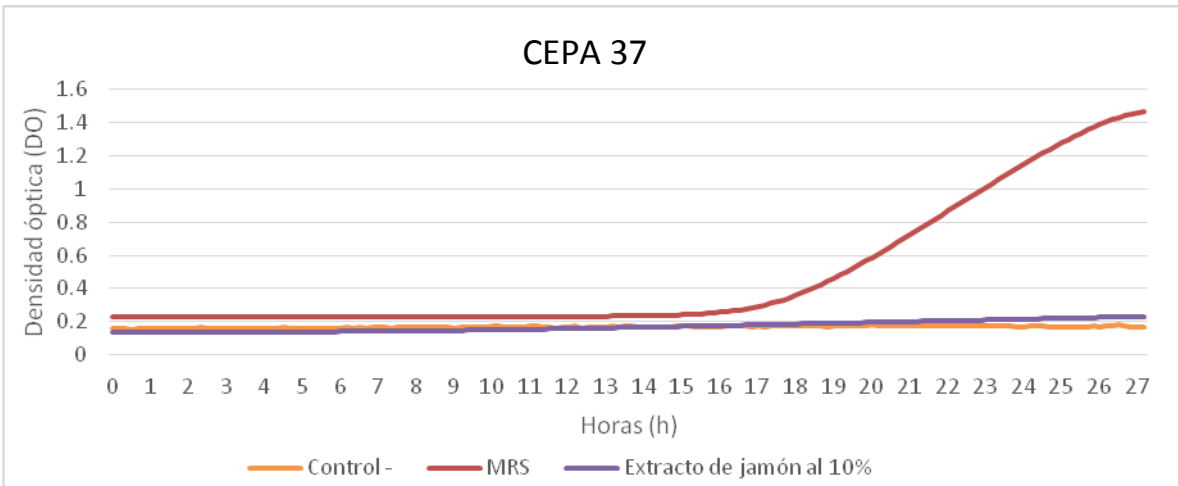
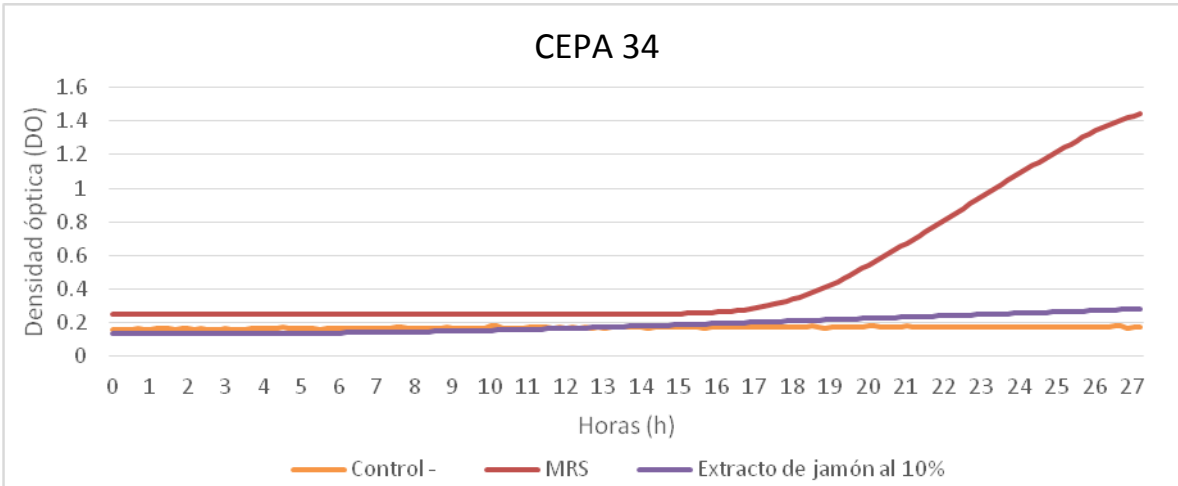
Cuadro 10. Parámetros de desarrollo de las BAL en caldo MRS y extracto de jamón (10 %).

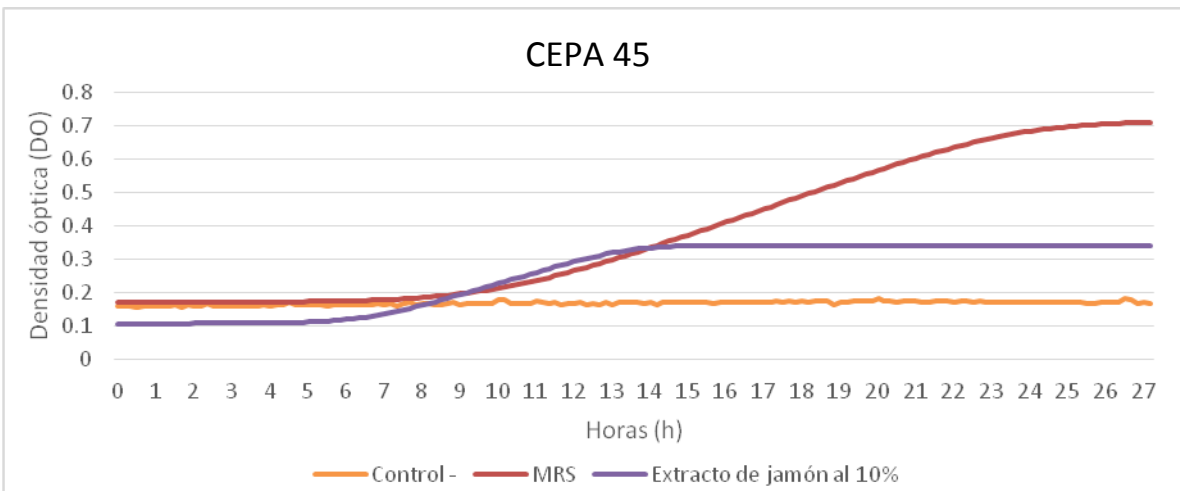
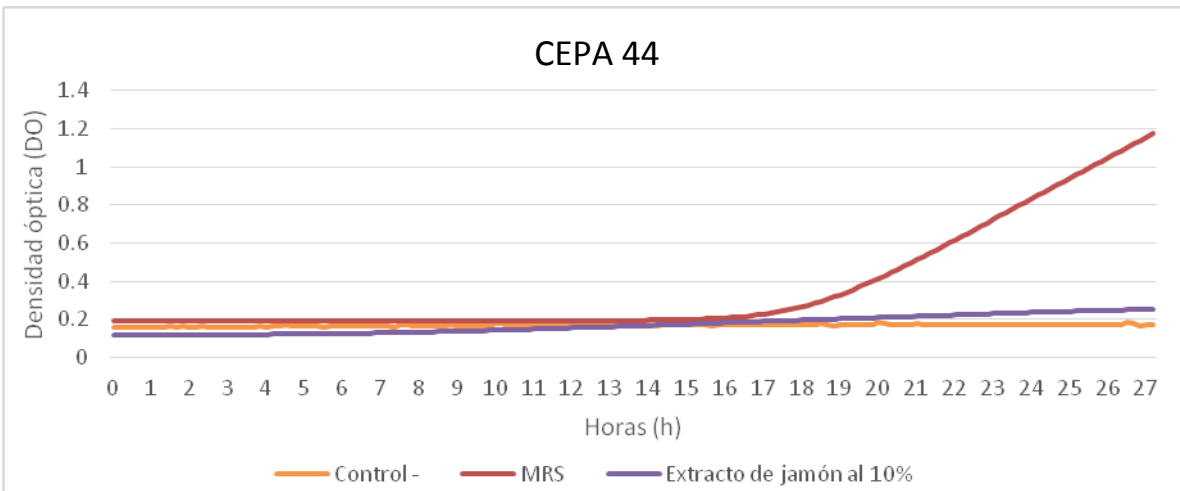
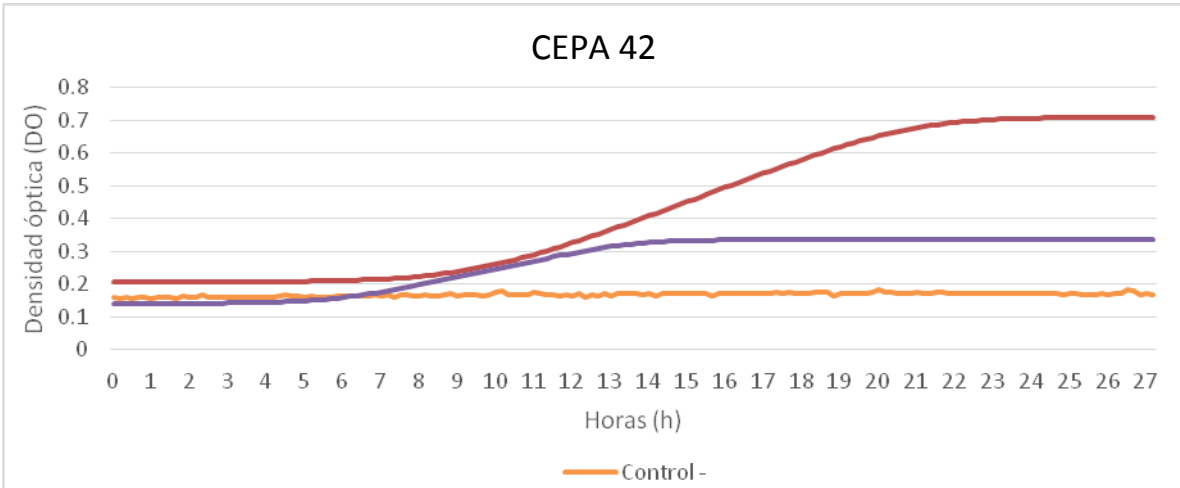
Cepas	Caldo MRS			Extracto de jamón (10%)		
	Velocidad de desarrollo (DO/h)	Fase Lag (h)	Abs máx. (crecimiento) (DO)	Velocidad de desarrollo (DO/h)	Fase Lag (h)	Abs máx. (crecimiento) (DO)
31	0.0006	550.12	0.753	0.0003	234.12	0.411
32	0.0006	566.01	0.664	0.0005	360.49	0.429
33	0.0024	1159.07	1.365	8.809E-05	335.32	0.281
34	0.0024	1081.33	1.437	0.0001	486.88	0.298
37	0.0024	1057.15	1.481	8.276E-05	476.61	0.249

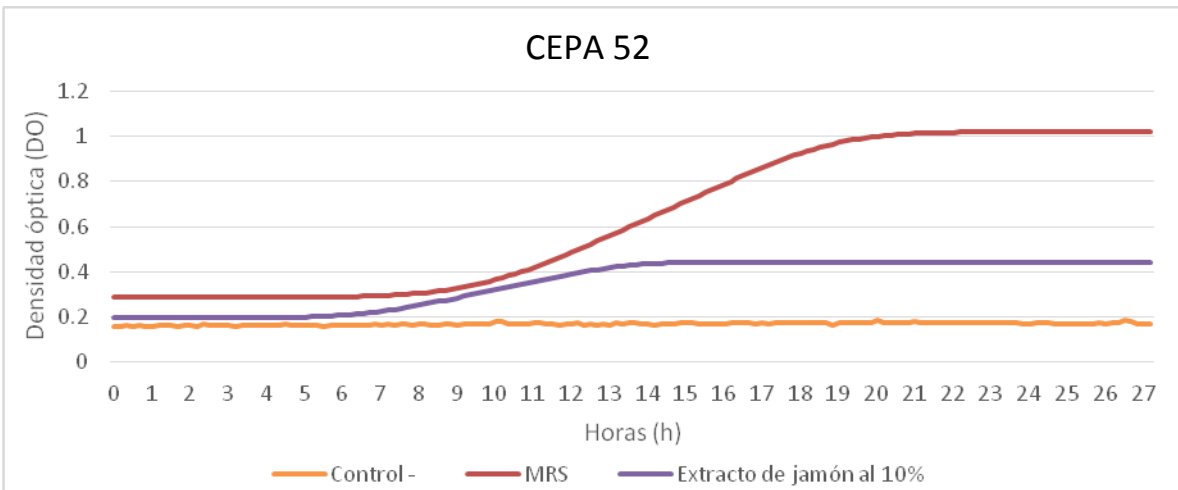
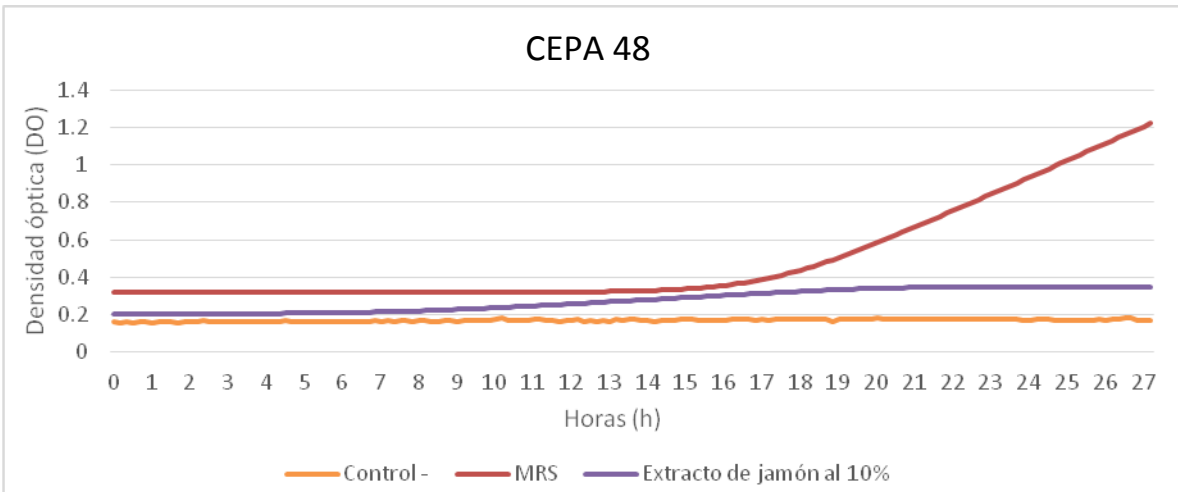
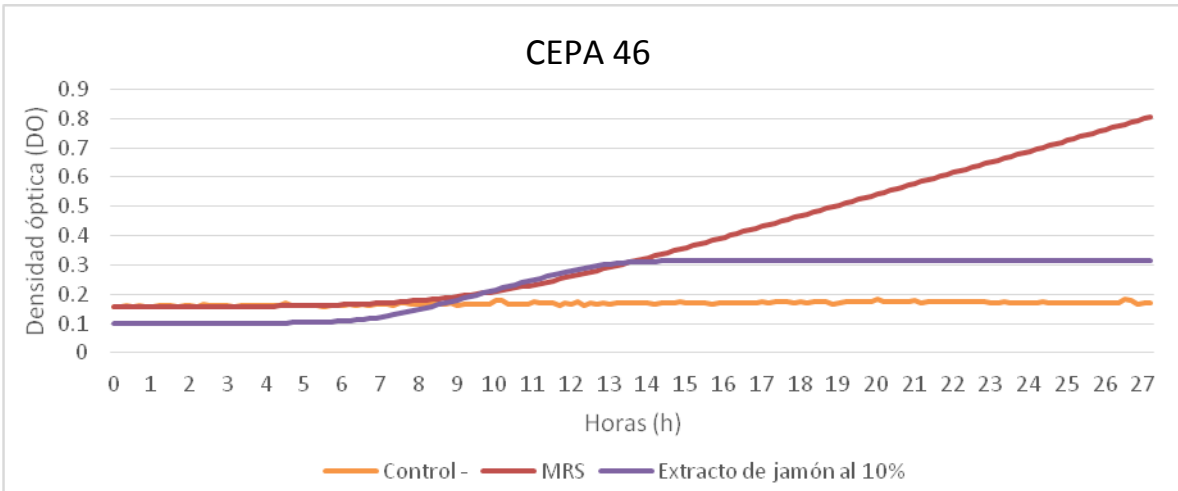
38	0.0023	1006.55	1.475	0.0001	540.33	0.28
42	0.0007	567.30	0.726	0.0004	352.45	0.351
44	0.0018	1086.22	1.193	0.0001	420.69	0.255
45	0.0007	599.70	0.715	0.0006	391.13	0.355
46	0.0006	572.90	0.745	0.0006	408.13	0.326
48	0.0015	1032.32	1.275	0.0002	462.12	0.366
52	0.0013	572.69	1.036	0.0006	394.91	0.463
56	0.0017	438.41	1.158	0.0007	341.92	0.476
59	0.0015	433.24	0.809	0.0011	325.87	0.426
67	0.0008	582.95	0.884	0.0004	472.34	0.429
68	0.0004	823.32	0.515	0.0004	446.14	0.417
70	0.0004	885.58	0.486	0.0005	520.82	0.427
72	0.0004	793.12	0.532	0.0005	423.99	0.554
74	1.849E-05		0.199	6.827E-05	631.62	0.152
75	0.0003	929.10	0.389	0.0005	453.85	0.551
87	0.0012	692.35	1.265	0.0005	567.28	0.52
115	0.0006	638.07	0.592	0.0004	464.05	0.425
116	0.0005	721.35	0.456	0.0003	446.99	0.353
117	0.0004	836.57	0.592	0.0005	452.33	0.618
118	0.0007	993.47	0.651	0.0009	460.65	0.555
119	0.0003	809.69	0.5	0.0007	589.95	0.618
121	0.0027	487.90	1.2	5.077E-05	304.54	0.225
122	5.169E-05	587.31	1.274	5.169E-05	198.60	0.192
123	0.0023	613.95	1.342	5.659E-05	200.60	0.21

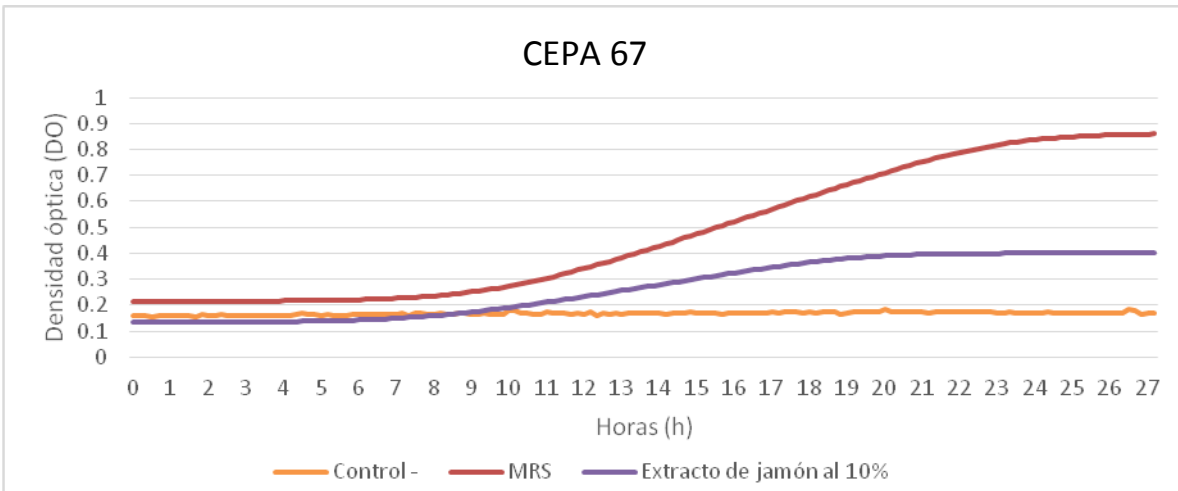
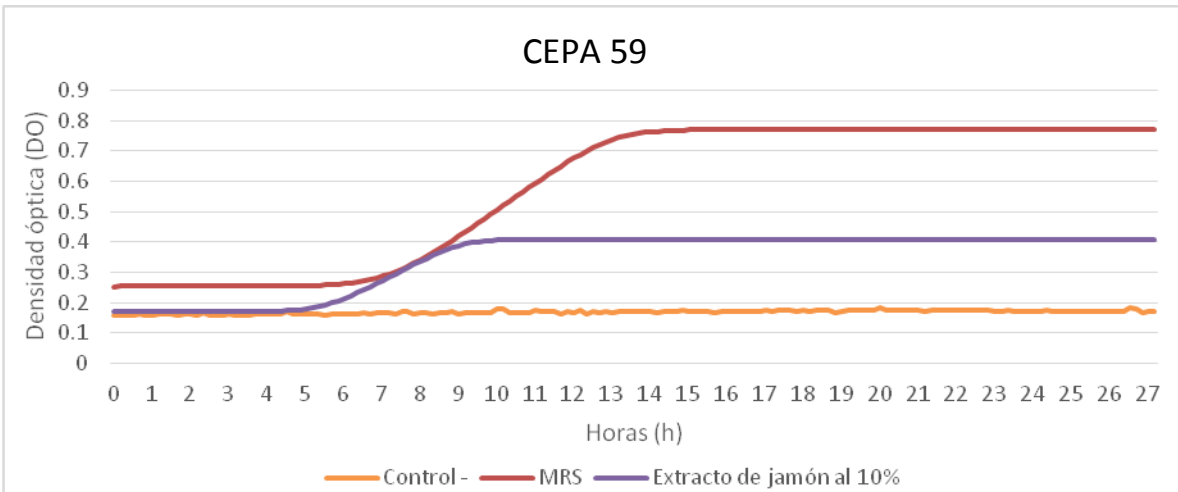
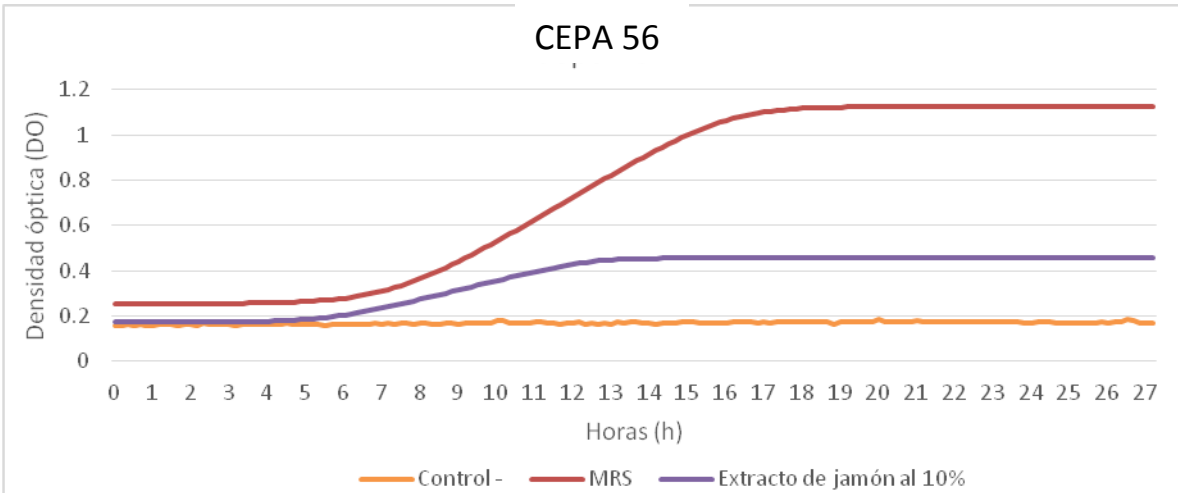
Figura 22. Ejemplos de la comparación del crecimiento observado en caldo MRS y extracto de jamón en las BAL seleccionadas.

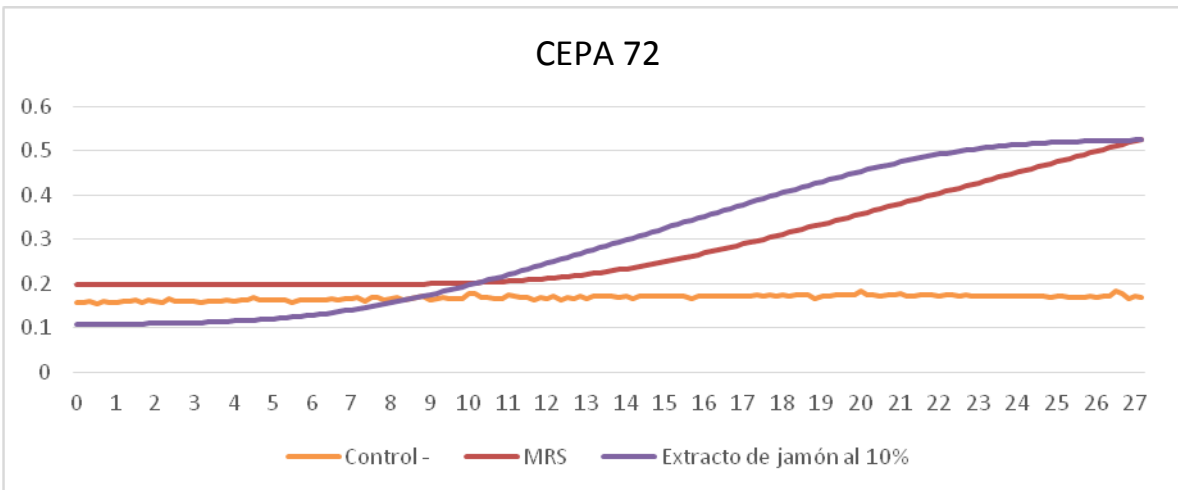
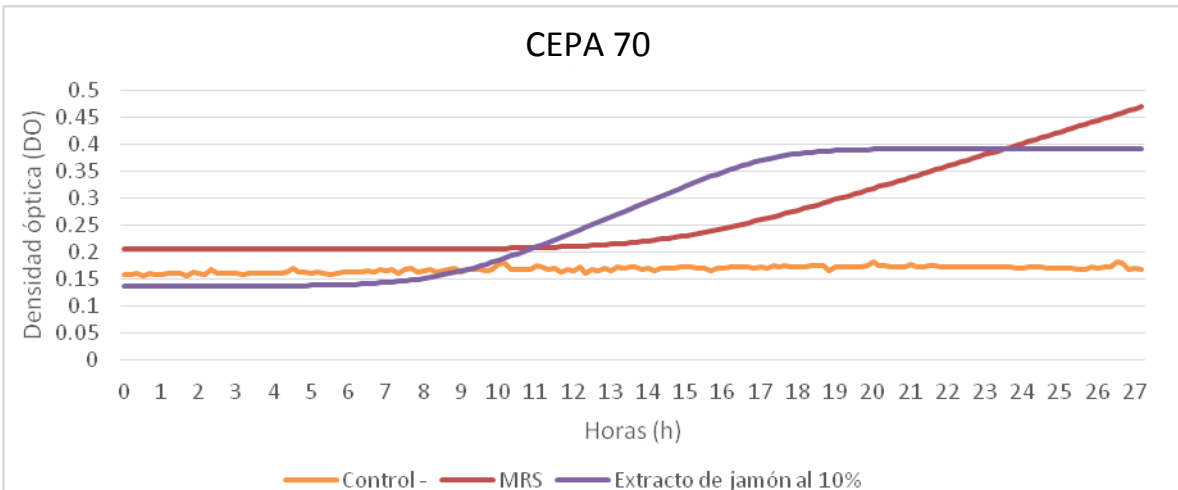
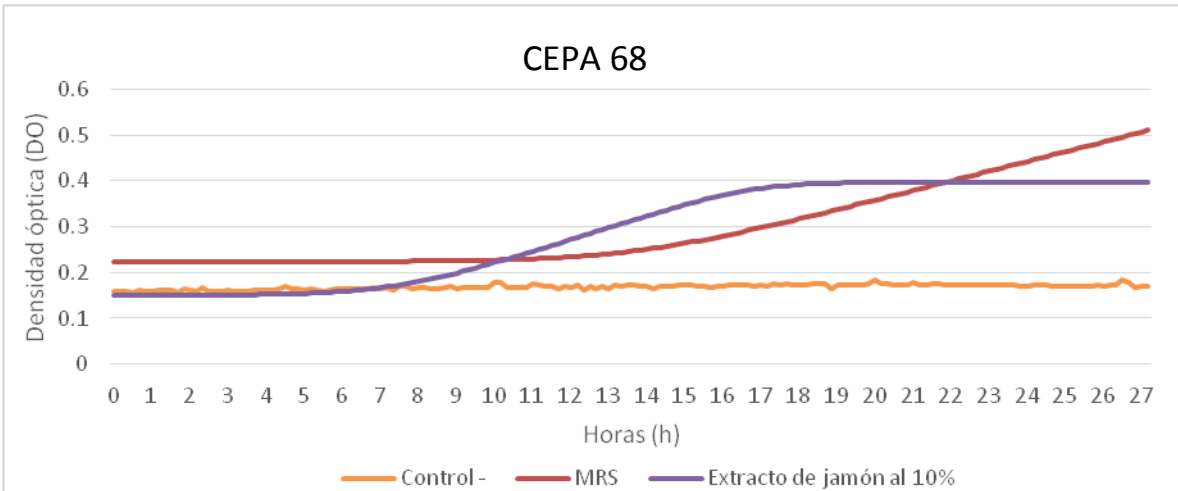




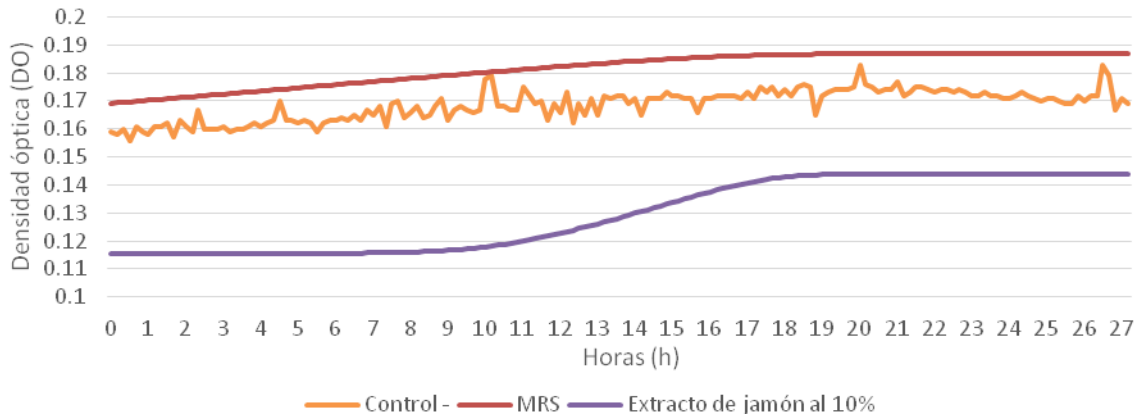




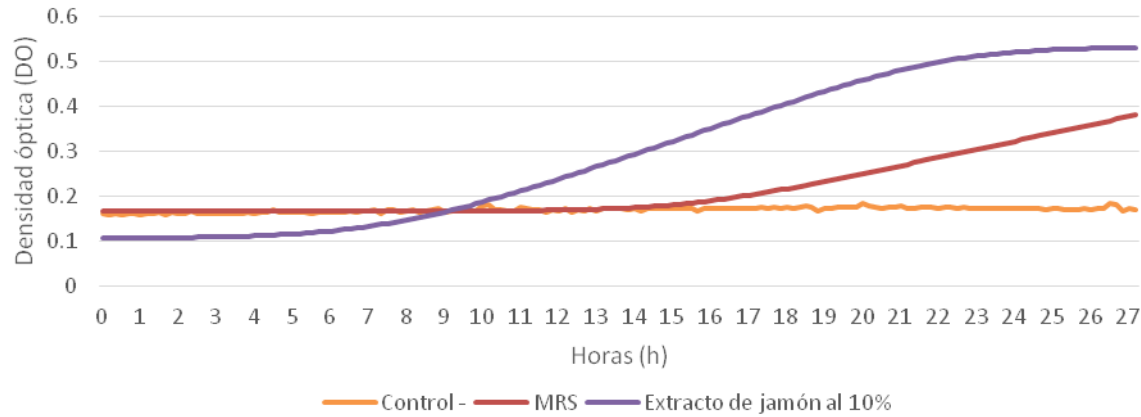




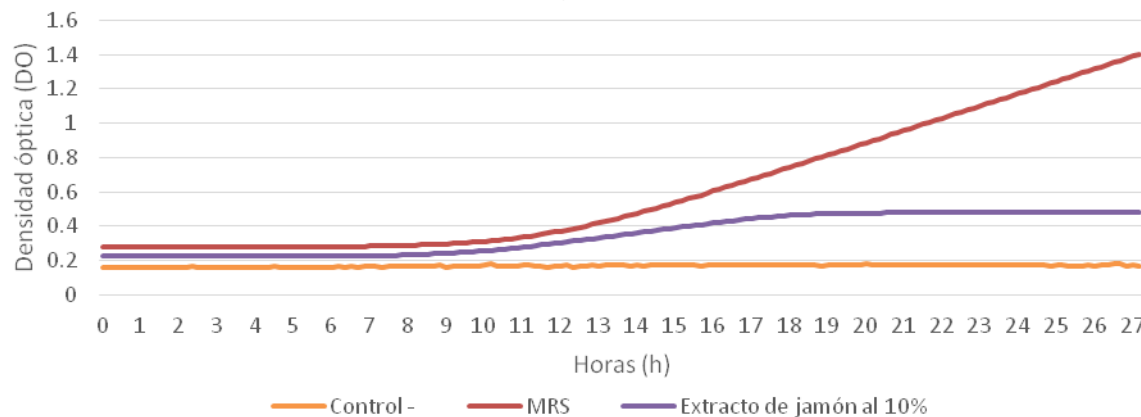
CEPA 74

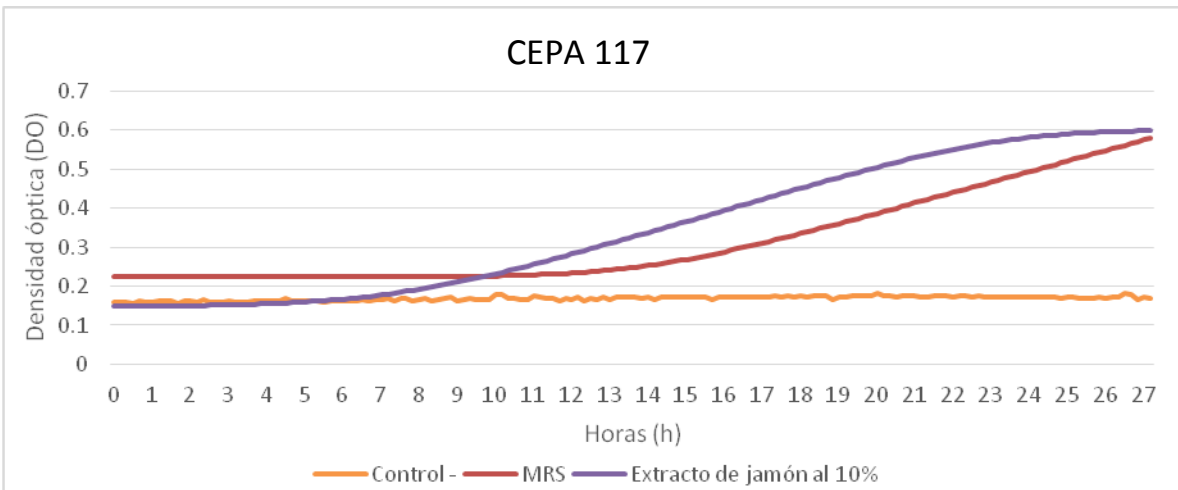
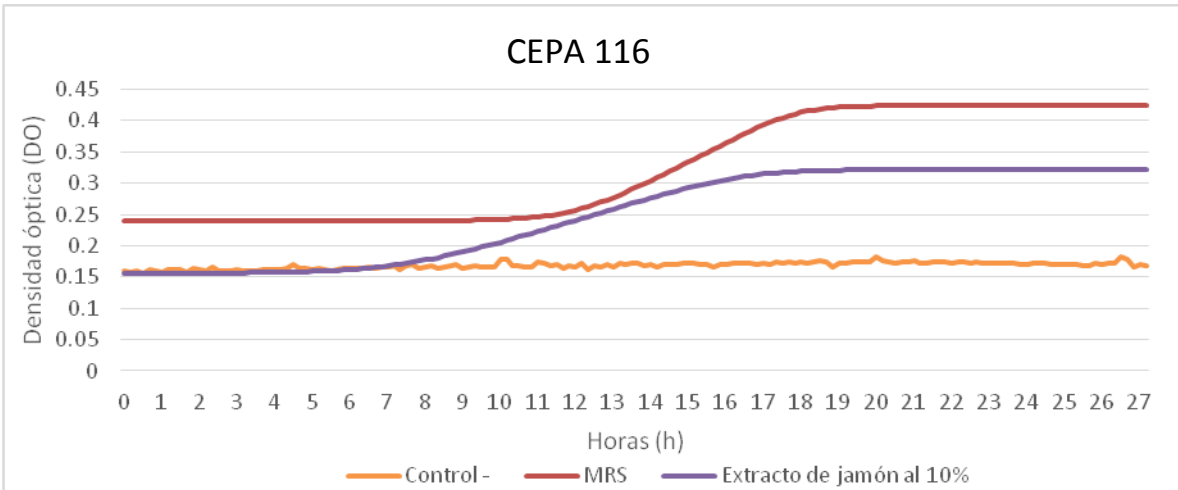
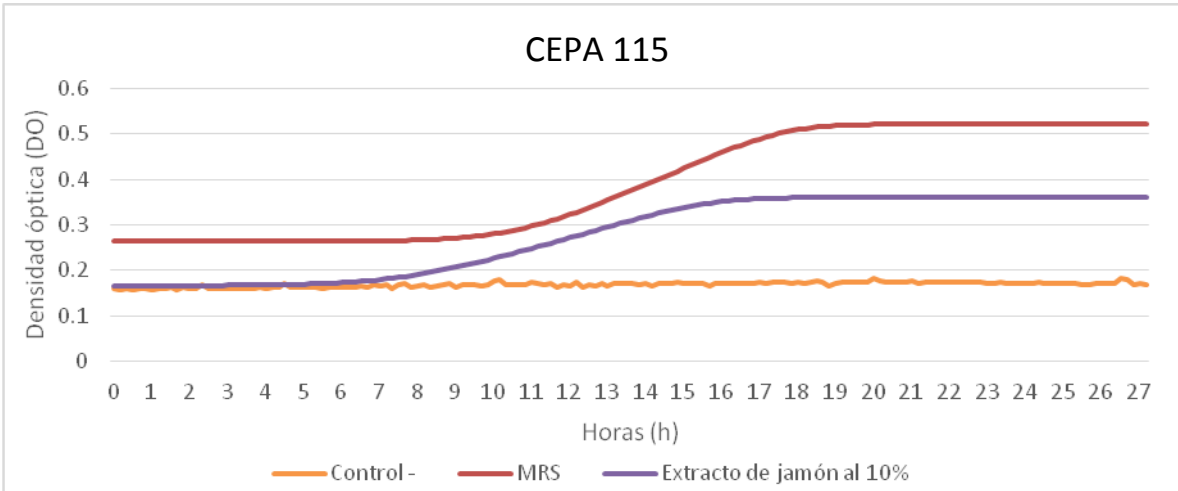


CEPA 75

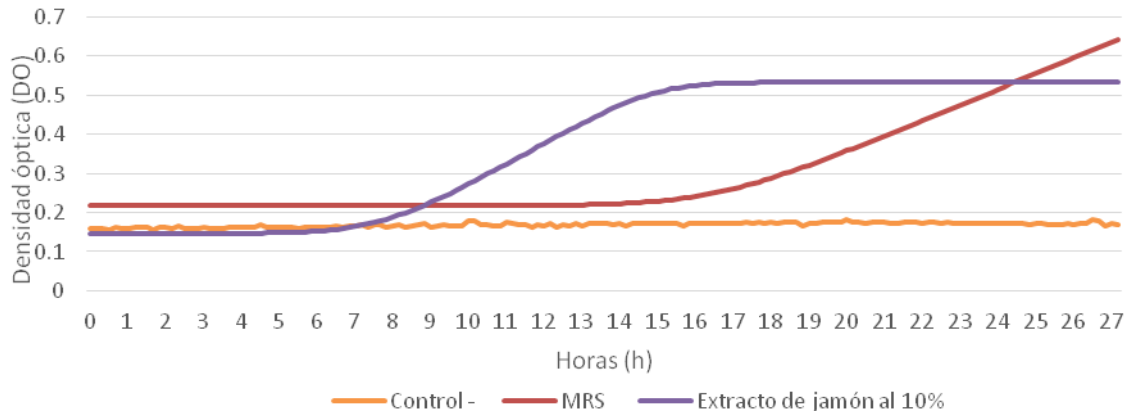


CEPA 87

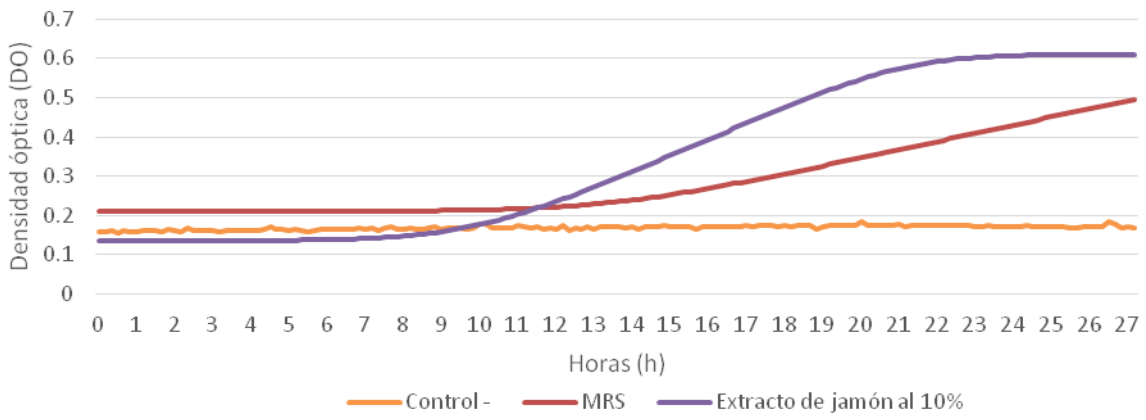




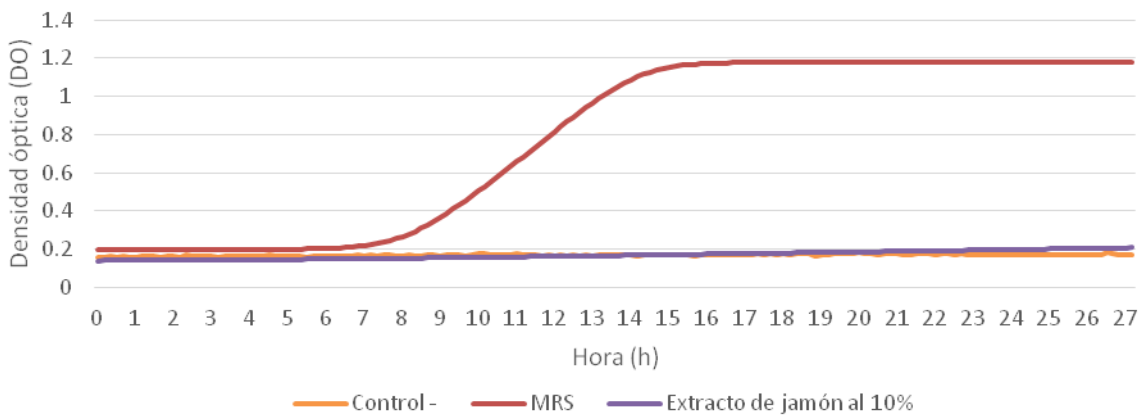
CEPA 118



CEPA 119



CEPA 121



APÉNDICE C

Evaluación de primers 16S rDNA para la secuenciación de las BAL seleccionadas por su alta capacidad de deterioro y formación de biopelículas.

Las cepas se activaron en caldo MRS incubándolas a 30°C por 48 horas. Después se tomó 1 ml para realizar la extracción de ADN utilizando el kit de Quiagen Tissue and blood.

Se realizó la cuantificación del ADN utilizando el equipo nanodrop y se realizó un gel para verificar la integridad del ADN obtenido (Figura 23).

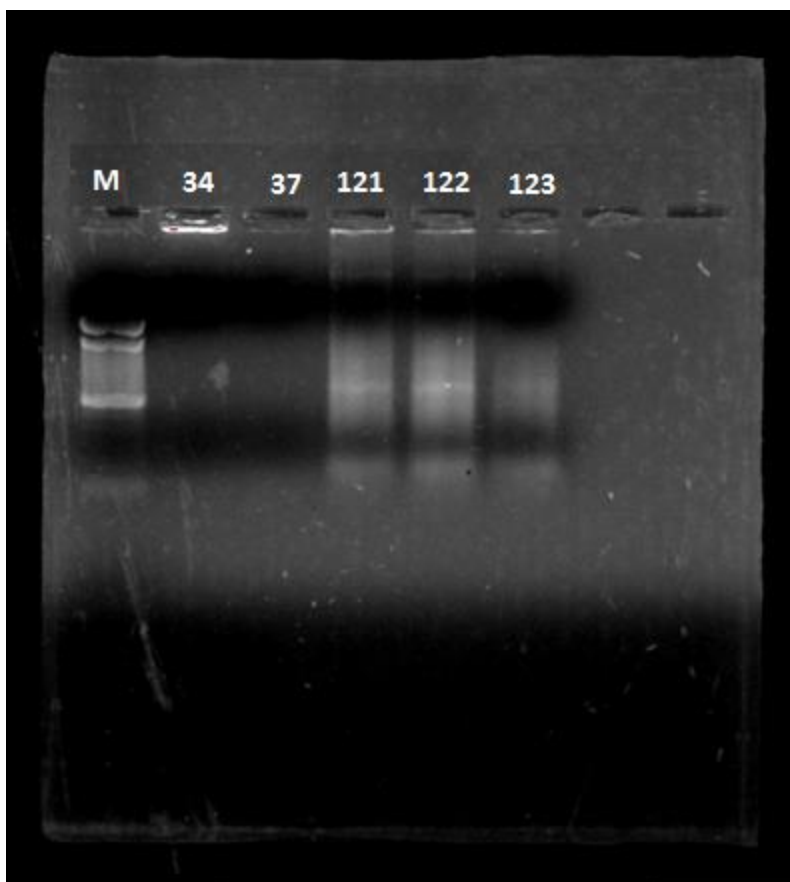


Figura 23. Gel de integridad de las BAL seleccionadas. M= marcador de peso molecular.

Una vez confirmada la integridad del ADN se realizó el PCR punto final para proceder con la purificación y posterior secuenciación de las cepas.

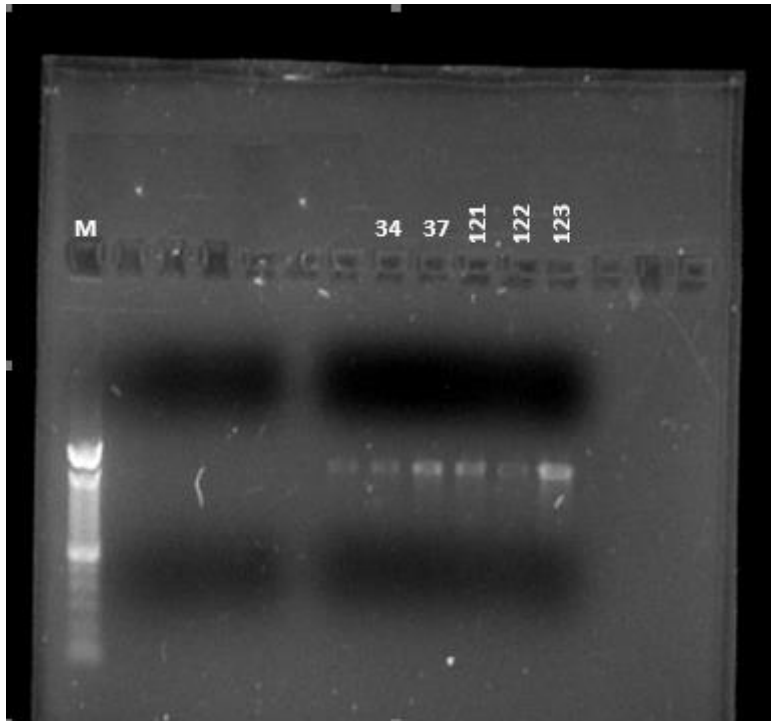


Figura 24. Gel de electroforesis de los productos de PCR obtenidos de las BAL seleccionadas. M= marcador de peso molecular

Después se procedió con el recorte de las bandas así como su purificación para ser enviadas al Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.

APÉNDICE D

Evaluación de la sonicación y del uso de vortex para el desprendimiento de células inmersas en biopelículas formadas sobre placas de acero inoxidable.

La preparación de las muestras se realizó conforme el procedimiento general V.7.2.

Se procedió a reactivar las cepas de BAL seleccionadas como deterioradoras. Esta reactivación fue inoculando por separado 40 μ l de cada cepa a 3 ml de caldo MRS y los tubos se incubaron a 30°C durante 24 horas. Posteriormente, se centrifugaron a 4,500 rpm por 15 minutos, se retiró el sobrenadante y se re-suspendió en 3 ml de SSI. Este procedimiento se realizó dos veces más para cada una de las cepas deterioradoras.

Placas de acero inoxidable de aproximadamente 5 cm² fueron sumergidas en 25 ml de caldo MRS previamente inoculado con la mezcla de las cepas de BAL seleccionadas a una concentración de 10³ UFC/ml. Los tubos se incubaron a 30°C por 48 horas, para propiciar la formación de biopelículas.

Para desprender las células adheridas a la biopelícula se estandarizó el número de lavados mediante pases sucesivos de la placa a tubos con 20 ml de SSF estéril. Los resultados se muestran en la Figura 25. Se observó que a partir del tercer lavado ya existían recuentos cercanos al límite de detección de la técnica empleada (1 Log UFC/ml debido a que se aumentó el inóculo a 250 μ l en cuatro cajas amentando el inóculo a 1 ml).

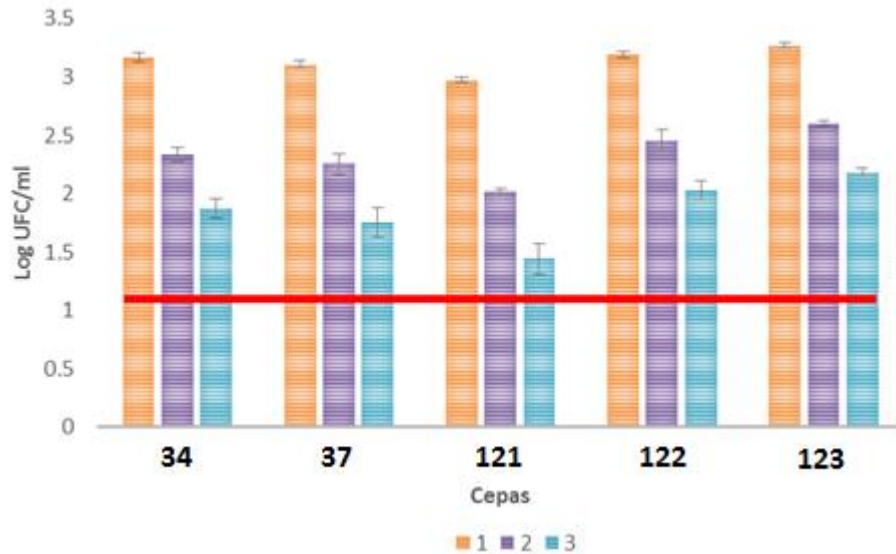


Figura 25. Recuento después de cada uno de los lavados de las placas de acero inoxidable con solución salina fisiológica (SSF). La línea roja representa el límite de detección de la técnica. Los números representan el número de lavados realizados.

Posteriormente la placa se transfirió a un cuarto tubo el cual se sometió al procedimiento de desprendimiento usando dos métodos: Mecánico (Vortex) y por sonicación, durante 6 minutos. A partir de estas suspensiones celulares se realizaron recuentos de las poblaciones. Los recuentos de BAL se llevaron a cabo en agar MRS incubando las placas a 30°C/ 48 horas.

Los resultados de la comparación de técnicas se muestran en la Figura 26.

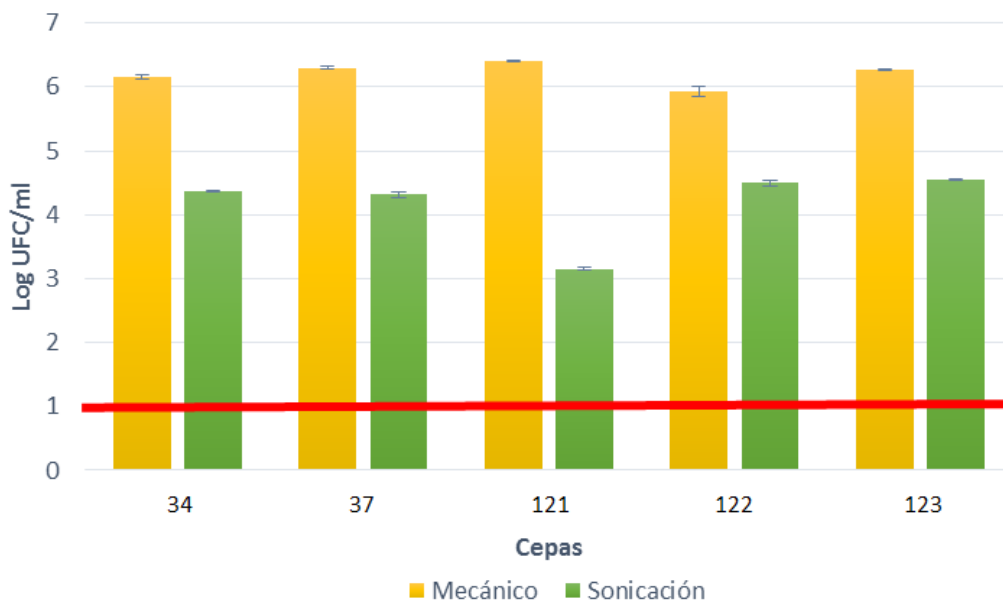


Figura 26. Recuperación de BAL después de someter las placas de acero inoxidable inmersas en SSF al tratamiento mecánico (vortex) y de sonicación. La línea roja representa el límite de detección de la técnica.

Se encontró que existía un mayor desprendimiento de células al utilizar el método mecánico (vortex) de aproximadamente 2 Log UFC/ml. Por lo que al final se decidió utilizar esta técnica para lograr el desprendimiento de los microorganismos adheridos a la placa de acero y la utilización de 4 lavados de solución salina fisiológica al 0.85%.