



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE
BACTERIAS LÁCTICAS EXPUESTAS A ESTRÉS Y
DURANTE SU DESARROLLO EN SALCHICHAS”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

IRAÍS ORTEGA OLGUÍN

DIRIGIDA POR

Dra. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, OCTUBRE 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE
BACTERIAS LÁCTICAS EXPUESTAS A ESTRÉS Y
DURANTE SU DESARROLLO EN SALCHICHAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

IRAÍS ORTEGA OLGUÍN

DIRIGIDA POR

Dra. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO

SINODALES

**Dra. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO
DIRECTOR**

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

**Dra. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA
SINODAL**

**Dra. SILVIA LORENA AMAYA LLANO
SINODAL**

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Bacterias lácticas	1
1.1.1. Características generales	1
1.1.2. Clasificación y géneros representativos de BAL	2
1.1.3. Uso de BAL en alimentos	3
1.1.3.1. Cultivos iniciadores	3
1.1.3.2. Probióticos	4
1.2. Importancia de BAL en productos cárnicos	4
1.2.1. Las BAL como deterioradoras de productos cárnicos	5
1.3. Factores de estrés microbiano	6
1.4. Métodos de recuento microbiano	7
1.4.1. Definición de métodos	8
1.4.1.1. Métodos de recuento tradicionales	9
1.4.1.2. Métodos de recuento alternativos	10
1.4.1.3. Métodos de cultivo modificados	11
1.4.1.4. Sistema Petrifilm™	11
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVOS	13
3.1. General	13
3.2. Específicos	13
4. METODOLOGÍA	14
4.1. Materiales	14
4.1.1. Medios de cultivo	14

4.1.2. Material biológico	15
4.2. Métodos	15
4.2.1. Procedimientos generales	15
4.2.1.1. Preparación del inóculo	15
4.2.2. Evaluación de tratamientos para generar estrés en BAL mediante calor y bajo pH.	15
4.2.3. Evaluación de la eficiencia de Petrifilm™ para cuantificar BAL con estrés por calor y bajo pH.	16
4.2.3.1. Estrés por calor	16
4.2.3.2. Estrés por pH	17
4.2.3.3. Cuantificación de BAL con estrés por calor y bajo pH mediante Petrifilm™ y cultivo tradicional.	17
4.2.4. Cuantificación del comportamiento de <i>Lc. mesenteroides</i> en salchichas empacadas al vacío y almacenadas a 19°C empleando agar MRS y Petrifilm™	17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1. Evaluación de la temperatura de tratamiento térmico y pH de tratamiento ácido para generar estrés microbiano	19
5.2. Evaluación de la capacidad de Petrifilm™ para cuantificar BAL con estrés por calor y bajo pH.	21
5.2.1. Evaluación de la capacidad de Petrifilm™ para cuantificar BAL con estrés por bajo pH.	23
5.2.2. Evaluación de la capacidad de Petrifilm™ para cuantificar BAL con estrés por calor.	25
5.3. Cuantificación del comportamiento de <i>Lc. mesenteroides</i> en salchichas empacadas al vacío y almacenadas a 19°C empleando agar MRS y Petrifilm™.	27
6. CONCLUSIONES	30
7. REFERENCIAS	31

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Géneros de BAL más representativos	2
2 Cepas utilizadas para la experimentación	15
3 ANOVA para los los recuentos en MRS y Petrifilm™ de BAL estresadas por calor y bajo pH	22
4 ANOVA para los los recuentos en MRS y Petrifilm™ de BAL estresadas por bajo pH	24
5 ANOVA para los recuentos en MRS y Petrifilm™ de BAL estresadas por calor	26
6 ANOVA de la correlación entre los recuentos de <i>Lc. mesenteroides</i> mediante MRS y Petrifilm™ en la cinética en las salchichas empacadas al vacío y almacenadas a 19°C	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Niveles de estrés para <i>Lc. mesenteroides</i> expuesta a diferentes niveles de pH.	20
2 Niveles de estrés para <i>Lc. mesenteroides</i> por aplicación de calor a diferentes niveles de temperatura y tiempo de exposición.	20
3 Correlación entre los recuentos en MRS y Petrifilm™ de BAL estresadas por calor y bajo pH	21
4 Gráfica de residuales para la correlación entre los recuentos en MRS y Petrifilm™ de BAL estresadas por calor y bajo pH	22
5 Correlación entre los recuentos en MRS y Petrifilm™ de BAL sometidas a estrés por bajo pH	23
6 Gráfica de residuales para los recuentos de BAL expuestas a estrés por bajo pH	25
7 Correlación entre los recuentos en MRS y Petrifilm de BAL sometidas a estrés por calor	26
8 Correlación de las técnicas de recuento de <i>Lc. mesenteroides</i> en la dinámica en salchichas empacadas al vacío almacenadas a 19°C	28
9 Gráfica de residuales para la correlación de las técnicas de recuento de <i>Lc. mesenteroides</i> en la dinámica en salchichas empacadas al vacío almacenadas a 19°C.	29

RESUMEN

Las bacterias lácticas (BAL) son microorganismos empleados para la fabricación y conservación de alimentos, siendo una de las principales aplicaciones la fermentación de alimentos como la leche, carne y vegetales para obtener nuevos productos. Este grupo microbiano también es relevante por su capacidad para deteriorar alimentos, entre ellos los productos cárnicos procesados. Con frecuencia se requiere cuantificar estos microorganismos, y cada vez más la industria busca alternativas analíticas que le permitan obtener resultados en el menor tiempo posible. Las placas Petrifilm™ se han consolidado como una de las principales herramientas que se aplican en la industria. Sin embargo, todo nuevo método necesita ser validado para aplicarse a los diferentes alimentos o condiciones que se requieran. El objetivo de este trabajo fue comparar dos métodos de recuento para BAL, placas de Petrifilm™ y recuento tradicional en agar MRS. Se cuantificaron cultivos puros de 6 cepas de los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus* expuestos a estrés por calor (54°C) y bajo pH (3.0). También se evaluó la correlación entre las técnicas en un estudio del comportamiento de *Lc. mesenteroides* durante su desarrollo en salchichas empacadas al vacío. El sistema Petrifilm™ mostró eficiencia similar a la técnica tradicional que emplea MRS en el recuento de cultivos de BAL estresadas por condiciones de bajo pH ($R^2=0.93$). Este desempeño no se obtuvo cuando se emplearon suspensiones de BAL estresadas por calor ($R^2=0.0371$). El uso del sistema Petrifilm™ durante la evaluación del desarrollo de *Lc. mesenteroides* en salchichas empacadas al vacío mostró un desempeño intermedio, con una buena correlación con la metodología tradicional en el 80% de los datos.

1. ANTECEDENTES

1.1 Bacterias lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) fueron descubiertas por Louis Pasteur siendo profesor de química y decano de ciencias en la universidad de Lille en Francia mientras realizaba estudios tras la consulta de los vinicultores de la región, acerca de la descomposición y acidificación del vino. En pocas semanas descubrió que la substancia que lo alteraba era el ácido láctico, producto de la fermentación láctica desencadenada por ciertos microorganismos. El término “Bacteriumacidilacti” se debe a Weigmamn que lo propuso en 1889 al definir las como bacterias que forman leche ácida a partir del azúcar de la leche (Fernández, 2000; Jay, 2000)

1.1.1 Características generales

Las BAL poseen características ecológicas y metabólicas de importancia económica y tecnológica en los alimentos. Su clasificación se basa en la morfología, la forma de fermentar la glucosa, su desarrollo a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad de crecer a altas concentraciones de sal, tolerancia a la alcalinidad y acidez (Axelsson, 2004).

En la actualidad, el grupo de las BAL está conformado por cocos, cocobacilos o bacilos Gram positivos, generalmente inmóviles y no esporulados, catalasa y oxidasa negativas, obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares produciendo ácido láctico como producto principal o único de su metabolismo, carecen de sistemas de transporte de electrones funcionales ligados al heme o de citocromos, y obtienen su energía por fosforilación a nivel del sustrato a la vez que oxidan carbohidratos; no tienen un ciclo de Krebs funcional. Todas estas bacterias son consideradas anaerobias aerotolerantes, y al contrario que las anaerobias estrictas, no son sensibles al oxígeno por lo que pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de él (Madigan y col., 2004).

La mayoría de las BAL son mesofílicas, aunque algunas son capaces de crecer a temperaturas de 5°C y otras a 45°C. Toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias (algunas pueden crecer a pH 3, otras entre 6 y 9, pero la mayoría crece a un pH entre 4 y 4.5) por lo que pueden desplazarlas de los hábitats que colonizan (Jay, 2000)

Los gérmenes del género *Lactobacillus* son bacterias con forma de varillas rectas o curvas, de 0.6-0.9x1.5-6µm, que se presentan aisladas, por parejas o en cadenas cortas. Inmóviles y aflagelados, Gram positivos, anaerobios o anaerobios facultativos, homofermentativos, metabolizan los carbohidratos dando como producto final ácido láctico. Crecen en superficie sobre medio sólido, favoreciéndose su crecimiento en anaerobiosis al 5-10% de CO₂. El intervalo de temperatura y de pH óptimo de crecimiento se sitúa entre 35-38°C y 5.5-5.8, respectivamente. Los lactobacilos tienen unas necesidades nutritivas complejas para su crecimiento: carbohidratos, nucleótidos, aminoácidos y vitaminas (Kandler y Weiss, 1992).

1.1.2 Clasificación y géneros representativos de BAL

El grupo de las BAL está comprendido por aproximadamente 20 géneros. Siendo los siguientes 12 los más representativos:

Cuadro 1. Géneros de BAL más representativos

<i>Carnobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactosphaera</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Tetragenococcus</i>	<i>Vagococcus</i>	<i>Weissella</i>

Aunque el grupo está definido con poca exactitud, todos los representantes comparten la propiedad de producir ácido láctico a partir de hexosas (Jay, 2000).

1.1.3 Uso de BAL en alimentos

Las BAL son microorganismos empleados para la fabricación y conservación de alimentos, siendo una de las principales aplicaciones la fermentación de alimentos como la leche, carne y vegetales para obtener productos como el yogurt, quesos, encurtidos, embutidos, ensilados, etc. Asimismo, las BAL son de gran utilidad en la producción de vinos y cerveza (Leveau y Bouix, 2000).

El desarrollo de la industria agroalimentaria y en particular la utilización de materias primas nuevas, así como la necesidad de crear nuevos productos explica el interés creciente hacia este grupo de bacterias.

1.1.3.1 Cultivos iniciadores

En la industria de los alimentos las BAL son empleadas como cultivos iniciadores para la elaboración de productos alimenticios fermentados como leches, yogurt, mantequilla, quesos madurados, embutidos (salami, peperoni y chorizo) y bebidas alcohólicas como la cerveza y la sidra, donde producen cambios específicos en el aroma, sabor, textura, cuerpo, acidez, humedad, digestibilidad y aspecto de los mismos (Amador y col., 1993; Hammes y Tichaczek, 1994; Leveau y Bouix, 2000).

En las dos últimas décadas las BAL han recibido mucha atención, particularmente los géneros utilizados como cultivos iniciadores debido a su gran importancia. Las investigaciones se enfocan en aislar nuevas cepas con el fin de estudiar sus potencialidades de cultivos iniciadores. Una fuente inagotable de cepas la constituyen los productos artesanales, en especial los quesos (Alvarado, 2000).

Las preparaciones usadas como cultivos iniciadores se pueden clasificar atendiendo a múltiples aspectos tecnológicos como velocidad de acidificación, proteólisis, composición y temperatura óptima de crecimiento, las clasificaciones más comunes son en base a los dos últimos aspectos (Mäyra-Mäkien y Briget, 1993).

1.1.3.2 Probióticos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) los han definido como organismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada confieren un beneficio saludable en el huésped (Castro y Restrepo, 2006).

Los microorganismos comúnmente utilizados como probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Sacharomyces*, los cuales ejercen su función de una manera directa o indirecta a través de la modificación de la flora entérica endógena, o bien realizando un efecto inmunomodulador. Estas bacterias se encuentran presentes en diversos medios y pueden realizar la transformación de numerosas fuentes de sustratos: lactosuero, ensilados, extractos vegetales, etc., con lo cual enriquecen el medio con vitaminas, aminoácidos o enzimas (β -galactosidasa) (Leveau y Bouix, 2000; Contardo y col., 2005).

Cada vez es mayor el interés en las BAL y su uso como probióticos, los cuales tienen las siguientes características: propiedades no patogénicas ni toxigénicas, resistencia a productos tecnológicos y viabilidad en productos comerciales, estabilidad en secreciones gástricas del estómago y biliares en el duodeno, capacidad de adhesión a células epiteliales del intestino, habilidad para adaptarse dentro del tracto gastrointestinal sin desplazar la microbiota nativa, producción de sustancias antimicrobianas, habilidad para modular el sistema inmune y para diversas actividades metabólicas. Además mejoran la flora nativa intestinal, protegen de infecciones gastrointestinales, aumentan el valor nutritivo de los alimentos, favorecen la tolerancia a la lactosa, reducen la acumulación de compuestos tóxicos o asociados a la generación de algunos tipos de cáncer, se ha observado también la disminución de los niveles de colesterol en sangre (Dunne y col., 2001; Young y Huffmans, 2003).

1.2 Importancia de BAL en productos cárnicos

Las BAL como cultivos iniciadores en la industria cárnica son empleados principalmente con fines tecnológicos más que biológicos, en este orden de ideas, las BAL originan cambios deseables en los embutidos durante el proceso de maduración, los cuales se manifiestan en un descenso rápido del pH de la carne, una desecación y concentración de sal, y por otra parte por la producción de sustancias antimicrobianas que contribuyen a la reducción de bacterias Gram negativas (principalmente *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*) (Larpen, 1995). Las especies de BAL más usadas en la industria cárnica pertenecen a los géneros *Lactobacillus* (*L. sakei*, *L. curvatus*, *L. pentosus*, *L. plantarum*) y *Pediococcus* (*P. cerevisiae*, *P. pentosaceus*, *P. acidilacti*).

La actividad de los cultivos en la industria cárnica se puede situar sobre tres niveles:

- a) Acción sobre otras bacterias contaminantes por acción de las bacteriocinas y descenso de pH provocado por la liberación de ácido láctico y otros ácidos.
- b) Acción sobre pH debido a la producción de ácido láctico a partir los glúcidos acelerando la acidificación el producto.
- c) Aroma, si los lactobacilos y pediococos intervienen en la maduración se originan productos volátiles aromáticos provenientes del metabolismo y la biosíntesis microbiana como resultado de la degradación de azúcares más que de proteínas y lípidos (Leroy y col., 2006).

1.2.1 Las BAL como deterioradoras de productos cárnicos

El deterioro de los alimentos es un tema complejo. Por organismo deteriorante específico nos referimos a aquel microorganismo que produce en un alimento cambios sensoriales típicos del deterioro. No todas las bacterias presentes en los alimentos deteriorados causan deterioro sensorial. Generalmente, el grupo microbiano mayoritario es el responsable, pero no siempre es así. Poco se conoce sobre las interacciones microbiológicas en un alimento en deterioro (Gram y col., 2002).

Las alteraciones generadas por ciertos microorganismos se enfatizan principalmente en las descomposiciones y la producción de gases como dióxido de carbono que alteran el empaque y al producto como tal, debido a la actividad glicolítica donde se genera abundante cantidad de ácidos como sulfhídrico, ácido láctico, variando el pH, el olor, estas alteraciones son consecuencias de una refrigeración insuficiente. Una vez que el pH disminuye, la flora acompañante que prevalece es la Gram positiva, imponiéndose microorganismos del género *Lactobacillus* y en ocasiones algunos Gram negativos como las enterobacterias.

En los alimentos cárnicos almacenados en ausencia de oxígeno, la microbiota alterante está dominada por las BAL. Sin embargo, si el pH del tejido muscular es alto o si hay cantidades residuales de oxígeno, otros microorganismos, como *Brochothrix thermosphacta* y *Staphylococcus putrefaciens* contribuyen sustancialmente a la alteración del producto (Ossa y col., 2010).

Leuconostoc mesenteroides una especie perteneciente al grupo de las BAL. Es un microorganismo deteriorador de productos embutidos tales como las salchichas. Esta bacteria contribuye a procesos de alteración de los alimentos por la vía fermentativa de azúcares, en consecuencia forma ácido láctico que causa una disminución en el pH, además de formación de líquido lechoso y CO₂ resultando en la aparición de olores y sabores extraños. Esto afecta la calidad sensorial del producto y la aceptabilidad del consumidor resultando en pérdidas económicas para la industria alimentaria (Pexara y col., 2002).

1.3 Factores de estrés microbiano

La inactivación de los microorganismos en un alimento se produce cuando éstos se exponen a factores que alteran de forma importante sus estructuras celulares y/o sus funciones fisiológicas. Los diversos tratamientos aplicados a los alimentos en algunos casos pueden causar daños subletales o estrés celular en lugar de la muerte del microorganismo.

El estrés se refiere a cualquier desviación de las condiciones óptimas con el potencial de disminuir el crecimiento microbiano, situaciones que inducen la expresión de genes que responden a determinadas condiciones ambientales (Storz y Hengge-Aronis, 2000).

El estrés microbiano se puede producir por factores ambientales adversos propios del alimento y por la deliberada aplicación de sistemas para conservar o producir éstas condiciones adversas tales como el tratamiento térmico, presión o adición de sustancias químicas. Los microorganismos contenidos en el alimento pueden sufrir estrés abruptamente o gradualmente dependiendo del tratamiento al que es sometido (Yousef y Juneja, 2003).

1.4 Métodos de recuento microbiano

El análisis microbiano de los alimentos es una parte integrada en la gestión de la inocuidad microbiana en la cadena alimenticia. Las autoridades de control de las empresas alimentarias utilizan el análisis microbiano con diversos objetivos como la vigilancia de la situación actual o el análisis de tendencias a fin de detectar riesgos emergentes. También para verificar las pruebas de cumplimiento de los criterios microbiológicos o procedimientos de evaluación para la actuación de estrategias de gestión basadas en el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP por sus siglas en inglés), el análisis microbiano es una herramienta valiosa, desarrollada históricamente basada en la experiencia y decididas por consenso internacional.

Estos métodos estandarizados de la cultura clásica se encuentran todavía en muchos laboratorios, sobre todo en las agencias reguladoras, porque son métodos armonizados, considerados como "estándares de oro" en el diagnóstico de alimentos y por lo tanto en general son bien aceptados. Un grave inconveniente es que, a pesar de que la demanda no es costosa en cuanto a la infraestructura y que son bastante baratos en consumibles, son laboriosos de realizar, y requieren el uso de grandes volúmenes de medios líquidos, sólidos y reactivos, y abarcan largos

procedimientos tanto en funcionamiento y recolección de datos. Durante las últimas décadas, el interés ha aumentado en el desarrollo de métodos más rápidos. Sobre la base de estas "normas de oro" un "método rápido" puede ser definida como cualquier método o sistema que reduce el tiempo necesario para obtener un resultado microbiológico de la prueba (Feng, 1996; Fung, 1994). Rápido puede interpretarse como un tiempo más corto para la detección, pero también puede referirse a un flujo mejor a través del manejo de muestras múltiples y por lo tanto se refieren a conveniencia y la automatización en el trabajo en el laboratorio. Como tales métodos rápidos puede ser mejor reemplazado por la terminología "métodos alternativos". Los métodos microbiológicos alternativos pueden ayudar a la industria a buscar nuevas formas de obtener resultados fiables de manera más eficiente para asegurar la inocuidad de los alimentos. En este momento todavía no es posible tomar rápidas acciones correctivas y, por lo tanto, imposibles de identificar de inmediato y controlar las causas de las no conformidades, porque todavía los análisis microbianos, cualquiera que sea, basados en los métodos tradicionales, toman demasiado tiempo para dar un resultado (Rosmini y col. 2004).

Numerosos y diversos métodos alternativos para el análisis microbiológico de los alimentos están actualmente introduciéndose en el mercado por varios proveedores en una variedad de formatos, como resultado de acontecimientos recientes, particularmente en el campo de la biotecnología, la microelectrónica y desarrollo de software relacionado. En general, la regla general es que organismos reguladores acepten el uso de métodos alternativos, siempre y cuando que hayan sido validados por un tercero con métodos de referencia estandarizados.

1.4.1 Definición de métodos

Los métodos para el análisis microbiano comprenden métodos para la enumeración (métodos cuantitativos) y los métodos de detección (métodos cualitativos). En muchas ocasiones, el método clásico (convencional) comprende métodos de cultivo (basado en la multiplicación de microorganismos diana en medios de caldo o agar a números visibles para el ojo desnudo como la turbidez, cambio de color o colonias)

que se conocen como métodos de referencia para el análisis microbiano. Sin embargo existen también otros métodos basados en otros principios de detección molecular que pueden ser reconocidos como métodos de referencia si se percibe como proporcionar un resultado más exacto. En microbiología, los métodos de referencia son comúnmente métodos de acceso abierto (no patentados) y han sido sometidos a algún tipo de estudio colaborativo o revisión de pares por expertos de laboratorios independientes para obtener una amplia aceptación de su rendimiento. Para el análisis oficial, con mayor frecuencia se recomiendan métodos de referencia, sin embargo, los métodos alternativos, generalmente pueden ser aceptados también si se ha demostrado que pueden proporcionar resultados equivalentes por medio de un estudio de validación (Jasson y col., 2010).

En el marco de aseguramiento de la inocuidad de los alimentos, a menudo la selección de los métodos sigue siendo una elección personal, pero la referencia sigue siendo clásica y de mayor uso.

1.4.1.1 Métodos de recuento tradicionales

Los métodos convencionales para la enumeración de bacterias en los alimentos son métodos de recuento de colonias. En el método de recuento de colonias el total del número de bacterias en un producto se puede determinar por ejemplo, mediante la inoculación de diluciones de las suspensiones de la muestra en un medio de cultivo sólido por el método de extensión en la superficie o mediante vaciado en placa. La enumeración se realiza después de la incubación durante periodos fijos a temperaturas que varían desde 7 hasta 55 °C en una atmósfera aerobia, micro-aerobia o anaerobia, dependiendo del microorganismo. Durante la incubación cada célula individual se multiplica en una colonia que es visible para el ojo desnudo. Los métodos clásicos de cultivo tienen un límite confiable de cuantificación de 4 UFC/ml para los alimentos líquidos o 40 UFC/g para los alimentos sólidos que corresponde a 4 colonias/placa si 1 ml de la suspensión primaria se utiliza en el análisis. Basado en ISO 7218:2007, la presencia de 1-3

colonias/placa sólo indica la detección del organismo objetivo y sólo debe ser reportado como números estimados (Jasson y col., 2010).

Si un bajo número de bacterias (aproximadamente $<50/g$) son sospechosas de estar presentes en las muestras de alimentos, los números se puede estimar por medio del método del número más probable (NMP) (Bell y col., 2005).

Con el método NMP las diluciones de muestras de alimentos se preparan como para el método de recuento en placa. Tres diluciones en serie se transfieren en 9 o 15 tubos de medio líquido apropiado por de tres o cinco tubos por método, respectivamente. Después de la incubación, el número de tubos positivos para cada dilución se confirma para el grupo microbiano de interés, y se cuenta utilizando la tabla de NMP teniendo en cuenta el factor de dilución. El NMP se basa en el análisis cualitativo y el uso de procedimientos estadísticos y, como tal, en el cálculo de las 3 o 5 repeticiones, el ajuste del resultado de la prueba es propenso a una incertidumbre mayor que el método de recuento de colonias y por eso este método es considerado como una estimación de la cantidad de microorganismos (Jasson y col., 2010).

1.4.1.2 Métodos de recuento alternativos

Son métodos de análisis para la detección o la estimación del mismo analito, en este caso un microorganismo o grupo microbiano, pero empleando una estrategia diferente al método referencia.

El método que puede ser patentado o no, cubre un procedimiento analítico, es decir, desde la preparación de las muestras hasta los resultados de la prueba puede incluir referencias a otros procedimientos con el fin de ser completa.

La exposición de atributos apropiados de los métodos alternativos se realiza de acuerdo a las necesidades del usuario, por ejemplo:

- * Velocidad de análisis y / o la respuesta

- * Facilidad de ejecución y / o la automatización
- * Propiedades del análisis (precisión, exactitud, límite de detección, etc.)
- * Reducción de costo

1.4.1.3 Métodos de cultivo modificados

Existe una variedad de métodos rápidos o alternativos que se han elaborado con el objetivo primordial de reducir la carga de trabajo y facilitar el flujo de trabajo mediante la reducción de las manipulaciones y/o la necesidad de una plena infraestructura de laboratorio, es importante recalcar que no necesariamente se acorta el tiempo de detección. Algunos de estos métodos de cultivo modificados se basan en el método de conteo de colonias, por ejemplo, Petrifilm™3M™.

1.4.1.4 Sistema Petrifilm™

La placa Petrifilm™3M™ es un sistema de siembra todo-en-uno. Los ingredientes varían de una placa a otra dependiendo de los microorganismos de interés. En lugar de una placa de Petri, Petrifilm™3M™ hace uso de película de plástico delgada como soporte del medio de cultivo, generalmente, comprende un agente gelificante soluble en agua fría, los nutrientes y los indicadores para la actividad y la enumeración. Una ventaja importante de la placa Petrifilm™3M™ es el hecho de que es muy delgada (una película) con el que se ahorra espacio en la incubadora. Después de la incubación, las colonias típicas se pueden contar ya sea manualmente (facilitado por la rejilla en el fondo de la película y de colonias de color característicos) o automáticamente (Nero y col., 2008; Nyachuba y Donnelly., 2007; Silva y col., 2005; Rosimini y col., 2004; Schmelder y col., 2000).

Las placas Petrifilm™ para recuento de aeróbios son comúnmente utilizadas para conteo de mesófilos aeróbios, pero también pueden ser utilizadas para un recuento de BAL, particularmente en productos fermentados (Nero y col., 2008).

2. HIPÓTESIS

La cuantificación de bacterias ácido lácticas mediante placas Petrifilm™ 3M™ está altamente correlacionada con los recuentos obtenidos por el método tradicional de cultivo empleando agar MRS.

3. OBJETIVOS

3.1 General

- * Comparar los métodos de conteo para bacterias lácticas, placas Petrifilm™ y recuento tradicional en agar MRS.

3.2 Específicos

- Definir un procedimiento para generar estrés en cultivos de bacterias lácticas (BAL) mediante calor y bajo pH.
- Evaluar la eficiencia de placas Petrifilm™ para cuantificar BAL con estrés por calor y bajo pH.
- Comparar la cuantificación en placas Petrifilm™ y agar MRS de *Leuconostoc* durante su desarrollo en salchicha empacada al vacío.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiales

- Agitador mecánico Vortex®, VelpScientifica®, ns/113123
- Autoclave eléctrica de mesa, Market-Forge®, Mod. 199-85
- Balanza analítica, sensibilidad 0.0001g Sartorius® y BL120S
- Balanza granataria, sensibilidad 0.1g OHAUS®, Mod. CT200-S
- Baño María con termostato, Arfrank®, Mod. 91
- Campana de flujo laminar, Alder®, Veco®.
- Cuenta colonias, Quebec® Reicher-Jung®
- Homogenizador Stomacher® Laboratory Blender®, Mod. 400 (BA 7021)
- Horno para esterilización, Shel-lab®
- Incubadora refrigerada (22, 30, 35°C), Precision Scientific®
- Micropipetas 1-1000 µl, Labsystems®, Brand®, Genex Beta®, Rainin®, Gilson®
- Olla de presión Presto Steele®, Mod. 21 Lts y 12 Lts
- Potenciómetro, Jenway®, 3510 pH Meter®
- Refrigerador OJEDA® Refrigeración
- Refrigerador REVCO®, Thermo Scientific®
- Ultracentrífuga Heraeus®, Biofugue *pico*®, *Kendro*®
- Material de uso común en el laboratorio de microbiología

4.1.1 Medios de cultivo.

- DP (Diluyente de peptona de caseína 0.1%, Difco)
- Agar MRS (Agar de Man, Rogosa y Sharpe, Difco)
- Caldo MRS (Caldo de Man, Rogosa y Sharpe, Difco)
- Placas Petrifilm™ 3M™ para el recuento de bacterias mesófilas aeróbias (BMA)
- Medio MRS 2x 3M™

4.1.2 Material biológico

Se emplearon las siguientes cepas de BAL

Cuadro 2. Cepas utilizadas para la experimentación

Cepa	Origen
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Aislada de salchichas
<i>Leuconostoc lactis</i>	Aislada de salchichas
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 7469
<i>Lactobacillus curvatus</i>	ATCC 25601
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Cepario del Laboratorio de Inocuidad Microbiana, UAQ
<i>Lactobacillus sakei</i>	ATCC 15521

4.2 Métodos

4.2.1 Procedimientos generales

4.2.1.1 Preparación del inóculo

Las cepas previamente aisladas y conservadas en CST con 15% de glicerol en congelación a -72°C, se reactivaron transfiriendo 40 µL a un tubo con 5 mL de caldo MRS, e incubaron a 30°C/24 h. Se realizaron tres transferencias sucesivas cada 24 h, y a las 18 h de incubación del último cultivo se cosecharon las células mediante centrifugación (4500 x g, 15 min.). Los paquetes celulares fueron lavados dos veces, con solución salina fisiológica (SSF, 0.85% NaCl). El recuento viable de la suspensión bacteriana se realizó en agar MRS, mediante la técnica de extensión por superficie en agar MRS, tras una incubación de 48 h a 30°C.

4.2.2 Evaluación de tratamientos para generar estrés en BAL mediante calor y bajo pH.

Se requerían tratamientos de exposición al calor y a bajo pH que de manera

independiente generaran una población con al menos 90% de células estresadas, pero que no disminuyera la viabilidad de las cepas por más de 1 logaritmo. Para realizar la evaluación se empleó una cepa de *Lc. mesenteroides* activada como se describe en 4.2.1.1.

En el caso del tratamiento térmico, se utilizaron dos niveles de temperatura: 50 y 54°C. Los tubos con suspensiones de la cepa se introdujeron de manera vertical en baño María, el cual fue ajustado previamente a la temperatura definida $\pm 0.2^\circ\text{C}$ de variación. Para las diferentes temperaturas se tomaron alícuotas a los 0, 30, 60 y 120 minutos. Al finalizar el tratamiento, los tubos se colocaron en hielo inmediatamente.

Para el caso del bajo pH, se evaluaron niveles de pH de 3.0, 3.5 y 4.0. La suspensión microbiana se centrifugó y se resuspendió en caldo MRS ajustado a los niveles de pH seleccionados y se incubaron a $35 \pm 0.2^\circ\text{C}$ por 1h.

Se realizaron las diluciones pertinentes en diluyente de peptona para las células expuestas a calor, y con una solución amortiguadora (pH 7.0, 0.1M) en caso de las células expuestas a bajo pH. En ambos casos se inocularon 100 μl por extensión por superficie en placas de agar MRS con y sin adición de sal (6%). Todas las placas se incubaron por 48 h a 30°C . El porcentaje de población estresada se calculó:

$$\text{Estrés}(\%) = \frac{\text{RecuentoMRS} - \text{RecuentoMRSsal}}{\text{RecuentoMRS}} \times 100$$

Una vez seleccionadas las condiciones para generar estrés en la cepa de *Lc. mesenteroides*, se evaluaron condiciones seleccionadas para el resto de las cepas de BAL utilizadas en este trabajo (Cuadro 2).

4.2.3 Evaluación de la eficiencia de placas de Petrifilm™ para cuantificar BAL con estrés por calor y bajo pH.

4.2.3.1 Estrés por calor

Para cada cepa se inocularon 500 µl de la cepa activada y lavada (4.2.1.1) en 3 ml de caldo MRS. Las cepas de *Leuconostoc* y *Lb. curvatus* se incubaron a 54°C durante 2 h. Las cepas *L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. sakei* se expusieron por 2.5 h a la misma temperatura.

4.2.3.2 Estrés por pH

Para cada cepa se inocularon 3 tubos que contenían 3 ml de caldo MRS a pH 3 con 400 µl de la cepa lavada. Las cepas de *Leuconostoc* y *Lb. curvatus* se incubaron a 35°C durante 1 h. Las cepas de las demás BAL se incubaron por 1.5 h a la misma temperatura.

4.2.3.3 Cuantificación de BAL con estrés por calor y bajo pH mediante Petrifilm™ y cultivo tradicional.

Se realizaron las diluciones pertinentes y se incubó a 30°C/48 h. Se realizó el recuento de BAL por la técnica de extensión en superficie en agar MRS empleando alícuotas de 100 µl. Se incubaron las placas a 30°C durante 48 h en condiciones de microaerofilia (O₂ 5%, CO₂ 10% y N₂ 85%).

También se efectuó el recuento empleando placas de Petrifilm™ a partir de las mismas diluciones usadas el recuento tradicional. Se utilizaron alícuotas de 500 µl de las suspensiones y 500 µl del medio MRS a doble concentración. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 h en condiciones de microaerofilia.

4.2.4 Cuantificación del comportamiento de *Lc. mesenteroides* en salchichas empacadas al vacío almacenadas a 19°C empleando agar MRS y Petrifilm™.

Se realizaron paquetes de 2 salchichas tipo Vienna, las cuales se inocularon con 0.1 mL de una mezcla de 5 cepas de *Lc. mesenteroides* resistentes a la rifampicina (~8 log UFC) en la zona donde se contactan y se empacaron al vacío. Como control se utilizaron paquetes sin inocular. Se incubaron a 19°C y periódicamente se tomaron por triplicado paquetes de salchichas para el recuento de *Leuconostoc*.

La superficie del empaque se desinfectó con alcohol al 70% y se abrió en una zona aséptica. Se homogenizaron porciones de 10 g de la superficie de las salchichas con 90 ml de diluyente de peptona (DP) en un hogeneizador automático (stomacher) durante 1 minuto. Se prepararon las diluciones apropiadas en DP y se realizó el recuento de *Lc. mesenteroides* por la técnica de extensión en superficie en agar MRS con rifampicina tomando alícuotas de 100 µl. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 h en condiciones de microaerofilia. También se efectuó el recuento empleando las placas de Petrifilm™ a partir de alícuotas de 500 µl de las suspensiones y 500 µl del medio MRS a doble concentración. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 ± 2 h en condiciones de microaerofilia.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Evaluación de la temperatura de tratamiento térmico y pH de tratamiento ácido para generar estrés microbiano.

El estrés se refiere a cualquier factor o condición perjudicial que afecta negativamente el crecimiento o la supervivencia de los microorganismos (Yousef y Juneja, 2003). Acorde a esta definición, diversos tratamientos para el procesamiento de los alimentos son considerados estresantes.

Para este experimento era necesario contar con una población estresada de los microorganismos de manera similar a como podrían encontrarse en un alimento después de ser procesado, ya que se pretende que ésta investigación sea aplicable a la industria alimentaria.

Se probaron diferentes niveles de pH para generar estrés en las bacterias. En la Figura 1 se muestra el porcentaje de estrés obtenido para *Lc. mesenteroides*. Dicha bacteria fue utilizada como modelo para poder seleccionar los parámetros a utilizar en las pruebas.

En base a los resultados se escogió realizar el tratamiento a un nivel de pH 3. Ya que se presentó un nivel de estrés del 99.99% y una disminución de células viables de 0.965 log UFC/ml.

Así mismo se probaron distintos tiempos de tratamiento, siendo escogidos 1 h para *Lc. mesenteroides*, *L. curvatus* y *Lc. lactis* y 1.5 h para *L. casei*, *L. sakei* y *L. rhamnosus*, que fue necesario para generar un porcentaje de estrés similar.

En cuanto al tratamiento de estrés por calor se aplicaron distintos tiempos y temperaturas a *Lc. mesenteroides*, observándose un mayor porcentaje de estrés (99%) para 54°C con 2 h de tratamiento y se produjo una disminución de células viables de 0.89 log UFC/ml (Figura 2).

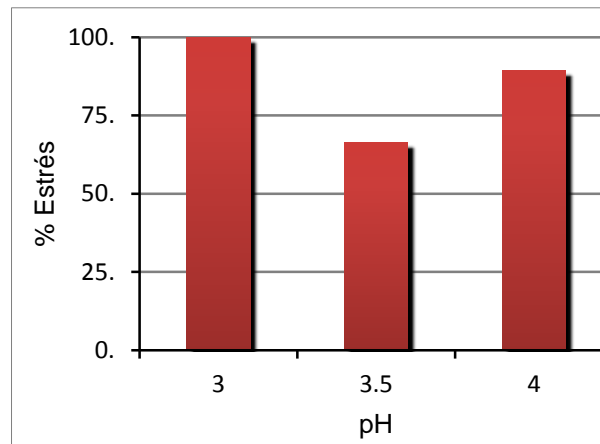


Figura 1. Niveles de estrés para *Lc. mesenteroides* expuesta a diferentes niveles de pH.

Igualmente, al someter las otras cepas a tratamiento se observó que dos de ellas (*L. curvatus* y *Lc. lactis*) conseguían un nivel similar de estrés con el mismo tratamiento aplicado a *Lc. mesenteroides*. Sin embargo, las otras tres cepas requirieron un tiempo de tratamiento de 2.5 h a la misma temperatura para lograr el mismo nivel de estrés en la población.

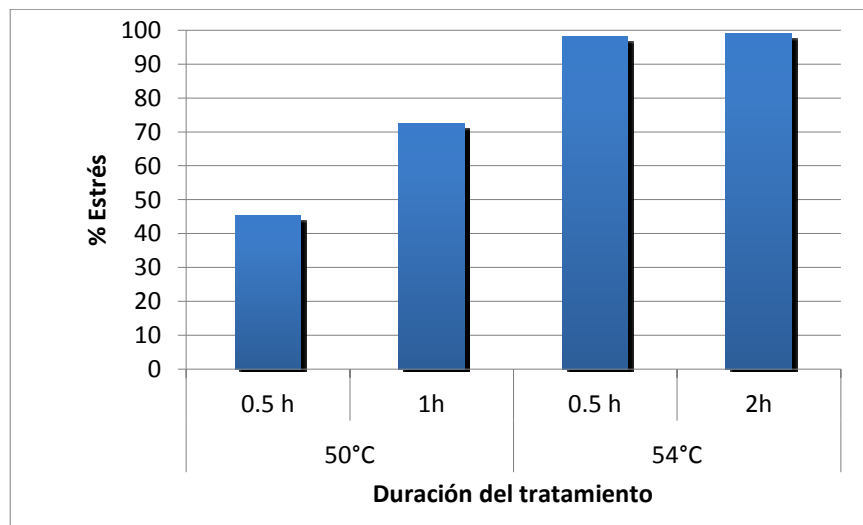


Figura 2. Niveles de estrés para *Lc. mesenteroides* por aplicación de calor a diferentes niveles de temperatura y tiempo de exposición.

5.2 Evaluación de la capacidad de Petrifilm™ para cuantificar BAL con estrés por calor y bajo pH.

Los productos envasados al vacío, tales como las carnes procesadas, deben controlar la presencia y concentración de BAL. Las BAL son los organismos con capacidad de mermar la calidad de los alimentos productos, deteriorarlos y acortar su vida útil. Es por ello que la industria alimentaria debe buscar una forma rápida y práctica de evaluar el contenido de estas bacterias, con la menor inversión de tiempo por parte del analista, y materiales pero sin menoscabo de la sensibilidad y precisión de la técnica.

La Figura 3 muestra que existe cierta correlación entre los datos obtenidos de los conteos de poblaciones de *Lc. mesenteroides*, *Lc. lactis*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. rhamnosus* y *L. sakei* estresadas por calor y pH entre las placas MRS y placas Petrifilm™. Sin embargo, se observa una gran dispersión y una tendencia a obtener menores recuentos en Petrifilm™ que en MRS.

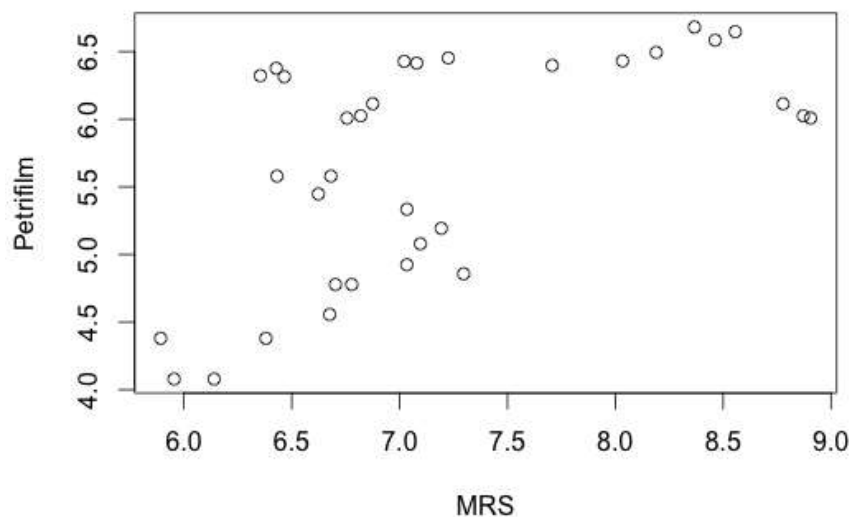


Figura 3. Correlación entre los recuentos en MRS y Petrifilm™ de BAL estresadas por calor y bajo pH.

Con los resultados obtenidos de ANOVA de los datos conjuntados para las BAL sometidas a estrés podemos señalar que efectivamente existe una correlación

entre ambas técnicas, sin embargo no es muy buena ya que sólo el Petrifilm™ reproduce el 30% de los datos con respecto al recuento tradicional.

Cuadro 3. ANOVA para los recuentos en MRS y Petrifilm™ de BAL estresadas por calor y bajo pH

	Estimado	Error estándar	Valor t	p
Intercepto	1.7109	0.9994	1.712	0.096880
MRS	0.5507	0.1383	3.982	0.000384 ***

Códigos: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 '.' 1

R²: 0.3385

En la Figura 4 se puede observar el comportamiento de los residuales de la correlación. Estos representan la distancia de cada dato con respecto al modelo (regresión). Aunque tienen como media el cero y se comportan de manera aleatoria, el valor de los residuales va de -1 a 1, es decir tenemos 2 log de incertidumbre alrededor de un dato. Lo que muestra las diferencias entre las dos técnicas.

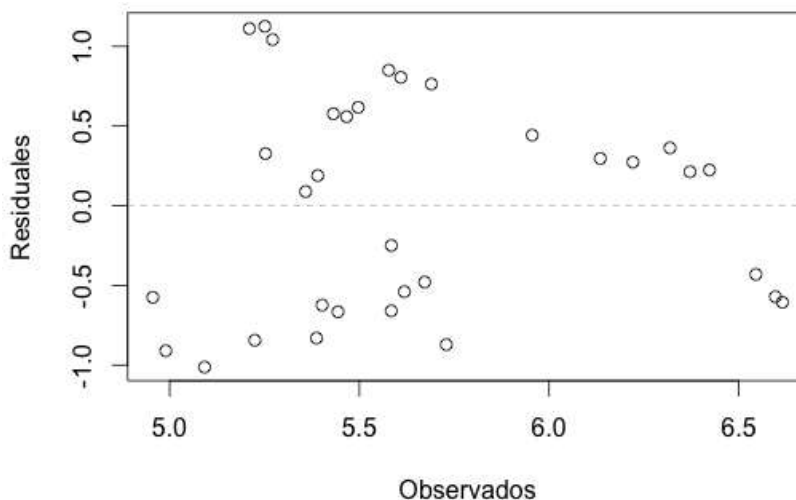


Figura 4. Gráfica de residuos para la correlación entre los recuentos en MRS y Petrifilm™ de BAL estresadas por calor y bajo pH.

Cabe remarcar que hay valores que salen del comportamiento global lo cual puede deberse a un error experimental o que esa alícuota era diferente al resto de la población. Hay que recordar que las bacterias fueron estresadas por calor o pH, estas desviaciones, podrían estar influenciadas por el estado fisiológico de las células en estas dos condiciones.

A continuación se muestran los resultados arrojados del ANOVA para poblaciones por tipo de estrés recibido.

5.2.1 Evaluación de la capacidad de Petrifilm™ para cuantificar BAL con estrés por bajo pH.

Niveles de pH bajo son comunes en alimentos que contienen BAL, como es el caso de leches fermentadas, algunos tipos de quesos o alimentos deteriorados por acción fermentadora de estas bacterias.

La Figura 5 muestra la correlación de los recuentos de las BAL estresadas por bajo pH realizados en Petrifilm™ y MRS. Se observa una mejor correlación que la observada en la gráfica anterior, cuando la población se expuso a calor.

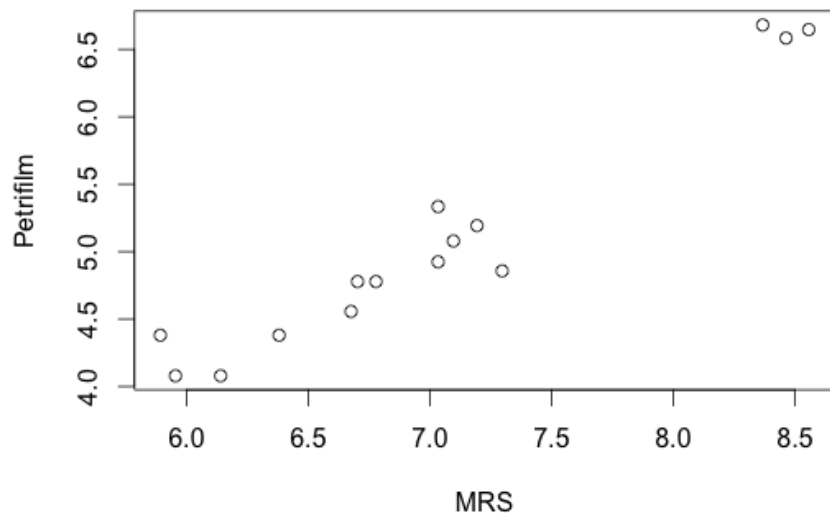


Figura 5. Correlación entre los recuentos en MRS y Petrifilm™ de BAL sometidas a estrés por bajo pH

El valor de p obtenido en el estudio ANOVA para los resultados recopilados de estrés por bajo pH (Cuadro 4) indica que existe una correlación bastante buena entre ambos métodos, por lo cual podemos decir que el recuento mediante las placas de Petrifilm™ podría proporcionar resultados certeros para alimentos con pH bajo como lo son leches o los quesos.

Nero y col. (2008) describieron un buen desempeño de las placas Petrifilm™ de BMA para ser usadas con caldo MRS para el recuento de *L. casei* enfocándose en las leches fermentadas. Los datos obtenidos en el presente estudio demuestran la viabilidad de que las placas Petrifilm™ pudieran funcionar para los recuentos de BAL en algunos otros alimentos de bajo pH como son los quesos madurados.

Será necesario un estudio de validación del recuento de BAL en alimentos fermentados para confirmar estas afirmaciones.

Cuadro 4. ANOVA para los recuentos en MRS y Petrifilm™ de BAL estresadas por bajo pH

	Estimado	Error estándar	Valor t	p
Intercepto	-1.94269	0.49737	-3.906	0.00181 **
MRS	0.99916	0.07019	14.234	2.63e-09 ***

Códigos: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R²: 0.9397

En la Figura 6 se puede apreciar que los residuales poseen un comportamiento cercano a lo ideal ya que se observa una distribución aleatoria, los datos más alejados del cero están representados con los números 12, 7 y 3 pero en sí el valor de los residuales va de -0.6 a 0.2 valores cercanos al ideal de cero.

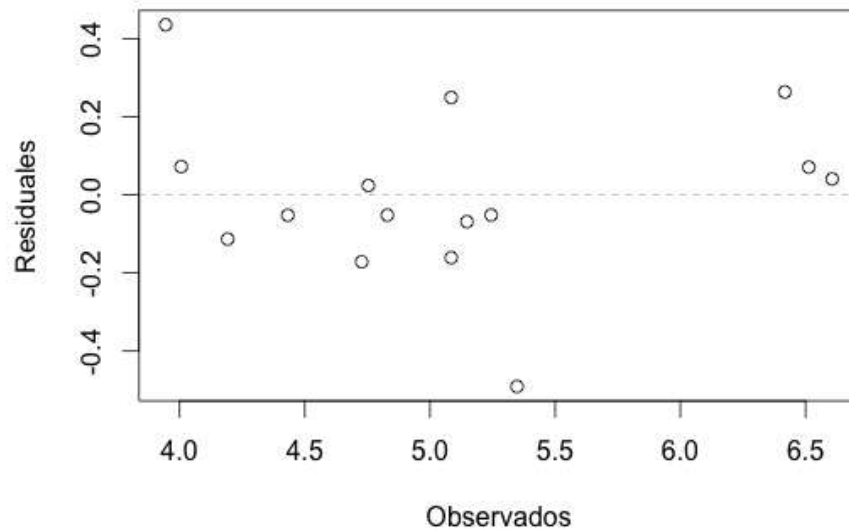


Figura 6. Gráfica de residuales para los recuentos de BAL expuestas a estrés por bajo pH

5.2.2 Evaluación de la capacidad de Petrifilm™ para cuantificar BAL con estrés por calor.

El calor es una de las estrategias de mayor uso para el control de los microorganismos en los alimentos por su efectividad principalmente, a pesar de los efectos negativos que conlleva, como la pérdida de nutrientes, la afectación de las características sensoriales y el costo (Hugas y col., 2002).

En el estudio se observa claramente que hay una gran dispersión entre los recuentos de las BAL estresadas por calor obtenidos por las dos técnicas (Figura 7). El estado fisiológico de las bacterias podría ser heterogéneo y generar diferencias en los recuentos entre alícuotas. Se reconoce que la aplicación de calor causa cambios en la integridad estructural y fisiológica de las células viables. Por lo tanto los medios utilizados para el recuento de sobrevivientes deben ser seleccionados de manera cuidadosa ya que se podría caer en una sobrevaloración del efecto del tratamiento térmico aplicado (Fernández, 2000).

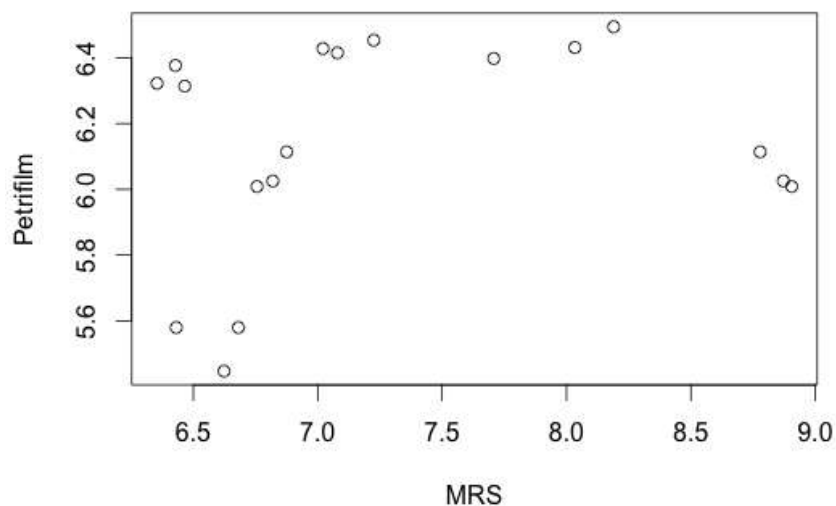


Figura 7. Correlación entre los recuentos en MRS y Petrifilm™ de BAL sometidas a estrés por calor.

Los resultados de ANOVA demuestran que no existe correlación entre los métodos de recuento MRS y Petrifilm™ cuando se parte de poblaciones estresadas por calor, ya que el valor obtenido de p es mayor a 0.05 y el valor de R^2 es muy cercano a cero (Cuadro 5).

Probablemente el estrés generado por el calor sea difícil de manejar para las BAL impidiendo su desarrollo en las placas Petrifilm™. Aún cuando se reconoce que algunas de ellas pueden ser termodúricas y sobrevivir a la pasteurización.

Cuadro 5. ANOVA para los recuentos en MRS y Petrifilm™ de BAL estresadas por calor.

	Estimado	Error estándar	Valor t	p
Intercepto	5.62497	0.66162	8.502	2.5e-07 ***
MRS	0.07075	0.09011	0.785	0.444

Códigos: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R^2 : 0.0371

Considerando lo anterior se puede decir que no se ajusta bien el modelo en los datos y que el método de Petrifilm™ como se empleó en este estudio podría tener problemas de estimar con certeza la población de BAL expuestas a un tratamiento térmico. Es factible sugerir que el uso de un caldo diferente al MRS, con menor cantidad de sustancias inhibidores pudiera tener un mejor desempeño en este tipo de población microbiana.

5.3 Cuantificación del comportamiento de *Lc. mesenteroides* en salchichas empacadas al vacío y almacenadas a 19°C empleando agar MRS y Petrifilm™.

Una información relevante para un productor de alimentos es conocer el comportamiento de microorganismos patógenos o deterioradores en su alimento. Las pruebas de reto se emplean con frecuencia para evaluar formulaciones, conservadores, cambios en el proceso, etc. En este trabajo se incluyó la evaluación del uso de Petrifilm™ en el estudio de una cinética de *Lc. mesenteroides* en salchicha cocida y empacada al vacío.

Se utilizó una mezcla de cepas de *Lc. mesenteroides* resistente a la rifampicina para evitar el sesgo de la flora asociada en el recuento y hacer el conteo exclusivamente del microorganismo inoculado.

Se inocularon salchichas con dos niveles de BAL y realizó un recuento periódico a las 8, 11, 14, 17, 20 y 28 h manteniendo el producto inoculado a 19°C

Se realizó la cinética del microorganismo a lo largo de 28 h almacenando las salchichas inoculadas a 19°C. Se emplearon dos niveles de inóculo para contar con datos de concentraciones diversas.

La Figura 8 muestra la comparación de los datos obtenidos de la cinética de desarrollo de *Leuconostoc* inoculado en dos niveles (2 y 3 log UFC/g). Se observa una buena tendencia, sin embargo existen algunos datos que sobresalen debido a que no siguen el comportamiento general. Hay que recordar que este alimento

contiene conservadores, que podrían estar heterogéneamente distribuido y esto puede inducir cierta variabilidad.

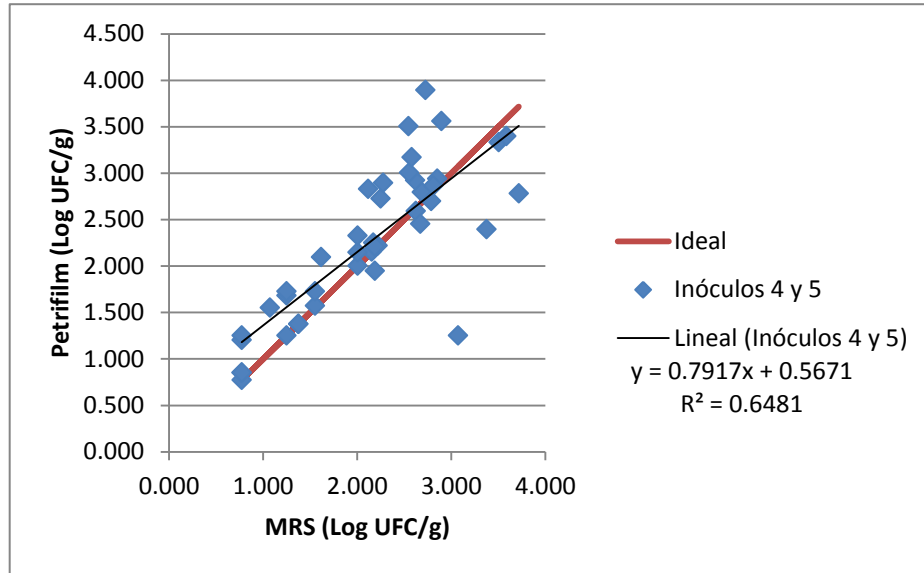


Figura 8. Correlación de las técnicas de recuento de *Lc. mesenteroides* en la dinámica en salchichas empacadas al vacío almacenadas a 19°C.

El ANOVA de esta correlación arrojó resultados que indican que la regresión puede explicar cerca del 65% de los datos (Cuadro 6). La pendiente de la regresión nos muestra que los recuentos en Petrifilm™ tienden a ser más bajos que los recuentos en MRS, en cerca del 20%.

Cuadro 6. ANOVA de la correlación entre los recuentos de *Lc. mesenteroides* mediante MRS y Petrifilm™ en la cinética en las salchichas empacadas al vacío y almacenadas a 19°C.

	Estimado	Error estándar	Valor t	p
Intercepto	0.56703	0.21004	2.700	0.0101 *
MRS	0.79172	0.09224	8.584	1.3e-10 ***

Códigos: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R²: 0.6481,

En la Figura 9 se muestra el comportamiento de los residuales. Se puede apreciar que existen datos que se alejan de la tendencia general, pero la mayoría de los residuales se encuentran alrededor de cero y dentro de los valores de -0.5 y 0.5.

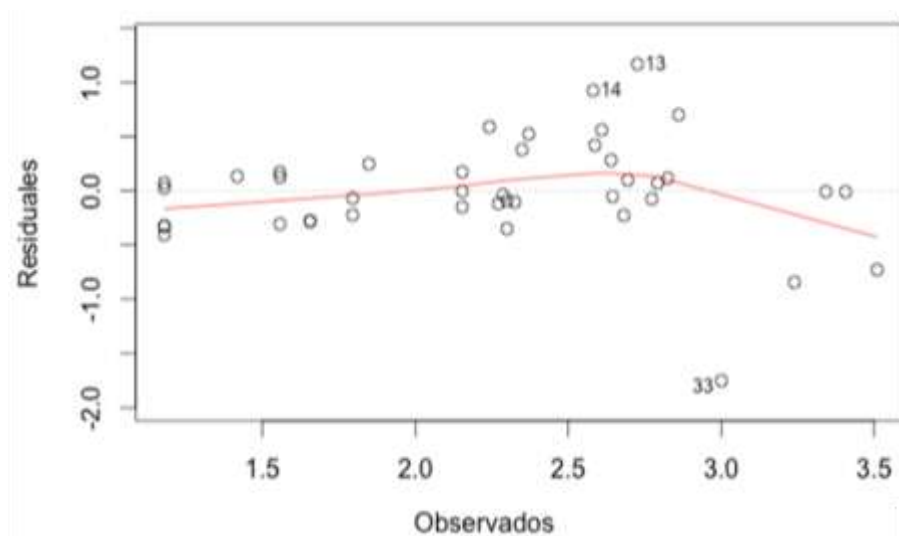


Figura 9. Gráfica de residuales para la correlación de las técnicas de recuento de *Lc. mesenteroides* en la dinámica en salchichas empacadas al vacío almacenadas a 19°C.

El error podría ser causa de los conservadores presentes en la salchicha que podrían generar un estrés extra en los microorganismos que dificulta su desarrollo en las placas. Estos conservadores podrían estar heterogéneamente distribuidos en el producto y algunas porciones se pueden encontrar microorganismos con un estado fisiológico disminuido. Sin embargo, esta podría ser una limitante manifiesta del empleo de las placas de Petrifilm™ que no logre recuperar células con daño.

6. CONCLUSIONES

La exposición a medio de cultivo con pH 3.0 por 1 h generó estrés en el 99.99% de la población en *Lc. mesenteroides*, *L. curvatus* y *Lc. lactis*, mientras que para *L. casei*, *L. sakei* y *Lb. rhamnosus* se requirió la exposición al mismo medio por 1.5 h.

Al someter a las cepas de *Leuconostoc* y a *Lb. curvatus* en un medio de cultivo por 2 h a una temperatura de 54°C se generó estrés en el 99% de la población, mientras que para *Lb. casei*, *Lb. sakei* y *Lb. rhamnosus* se requirió la exposición a la misma temperatura por 2.5 h.

El sistema Petrifilm™ mostró eficiencia similar a la técnica tradicional que emplea MRS en el recuento de BAL estresadas por condiciones de bajo pH (R^2 de 0.93). Este Desempeño no se obtuvo cuando se empleó una población de BAL estresadas por calor (R^2 de 0.0371).

El uso del sistema Petrifilm™ durante la evaluación del desarrollo de *Lc. mesenteroides* en salchichas empacadas al vacío mostró un desempeño intermedio, con una buena correlación con la metodología tradicional en el 80% de los datos.

7. REFERENCIAS

- Axelsson**, L. T. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd rev. and exp. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York. **2004**; 1-66.
- Bell**, C., Neaves, P., Williams, A.P. Food Microbiology and Laboratory Practice. Blackwell Publishing, Iowa USA, **2005**.
- Castro**, B. L. A., Restrepo, D. C. Probióticos: utilidad clínica. Colomb. Med. 37(4): 308 – 314. **2006**.
- Colombo**, M., Zimmermann de Oliveira, A. E., Fernandes de Carvalho, A., Nero, L. A. Development of an alternative culture medium for the selective enumeration of *Lactobacillus casei* in fermented milk. Foodmicrobiology. **2014**; 89-95.
- Contardo**, V. M., Bustamante, G., Rodríguez, J. Probióticos en niños con diarrea aguda. Rev. Ped. Elec. **2005**;3(2):32-35.
- Dunne**, C., O'Mahony, L., Murphy, E. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am. J. clin.Nutr. 73(2): 386S-392S. **2001**.
- Feng**, P., Emergence of rapid methods for identifying microbial pathogens in foods. J. AOAC Int. **1996**; 79, 809e812.
- Fernández**, E. E. Microbiología e inocuidad de los alimentos. 1^a ed. Universidad autónoma de Querétaro, Querétaro, México. **2000**; 43-60.
- Fung**, D.Y.C., Rapid methods and automation in food microbiology a review. Food Rev. Int. **1994**; 10, 357e375.
- Gram** L, Ravn L, Rasch M, Bruhn JB, Christensen AB, Givskov M. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology. **2002**; 78(1-2):79-97.
- Hugas**, M., Garriga, M., Monfort, J. M., New mild technologies in meat processing: High temperature as a model technology. MeatScience. **2002**; 62, 359-371.
- Jay**, J. M. Microbiología moderna de los alimentos. 4a ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. **2000**; 19-27, 106-108, 441-475.

Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., Uyttendaele, M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*.v. 27, **2010**.

Kandler, O. and Weiss, N. Regular non-sporing, Gram-positive rods in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed. P. Sneath, Baltimore, Williams & Wilkins, **1992**; 1209-1 234.

Larpent, J.P. Parte III: La fermentación de los productos animales. Capítulo 4: Productos cárnicos fermentados. En *ICMSF, Microbiología Alimentaria Vol. 2., Las fermentaciones alimentarias*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España, **1995**; 271-279

Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J Food Microbiol.*, 2006; 106, 270-285.

Leveau, J. Y., Bouix, M. *Microbiología industrial: Los microorganismos de interés industrial*. Ed. Acribia. Zaragoza, España, **2000**; 167-187, 206, 227-242.

Madigan, M. T., Martiniko, J. M., Parker, J. Brock. *Biología de los microorganismos*. 10a ed. Ed Prentice Hall. Madrid, España, **2004**; 122, 352, 400-402, 991.

Nero, L.A., Rodrigues, L.D., Vicoso, G.N., Ortolani, M.B.T. Performance of petrifilm aerobic count plates on enumeration of lactic acid bacteria in fermented milks. *J. Rapid Method. Automat. Microbiol.* **2008**; 16, 132e139.

Nyachuba, D.G., Donnelly, C.W. Comparison of 3M (TM) Petrifilm (TM) environmental Listeria plates against standard enrichment methods for the detection of *Listeria monocytogenes* of epidemiological significance from environmental surfaces. *J. Food Sci* **2007**; 72, M346eM354.

Ossa, J., Coral, A., Vanegas, L. M. Microbiota de jamones de cerdo cocidos asociada al deterioro por abombamiento del empaque. *Rev. MVZ Cordoba*, Córdoba, v. 15, n. 2, mayo **2010**.

Pexara, E., Metaxopoulos, J., Eleftherios H., Drosinos, E. Evaluation of shelf life of cured, cooked, sliced turkey fillets and Ccooked pork sausages 'piroski'—stored under vacuum and modified atmospheres at 4 and 10 °C. *Meat Science* 62 : 33–43. **2002**.

Rosmini, M.R., Signorini, M.L., Schneider, R., Bonazza, J.C. Evaluation of two alternative techniques for counting mesophilic aerobic bacteria in rawmilk. *Food Control*, **2004**; 15, 39e44.

Schmelder, J.L., Kalinowski, R.M., Bodnaruk, P.W. Evaluation of the petrifilm (TM) and redigel (TM) as rapid methods to the standard plate count method for the enumeration of processed meats and environmental samples. *J. Rapid Method. Automat.Microbiol*, **2000**; 8, 65e70.

Silva, B.O., Caraviello, D.Z., Rodrigues, A.C., Ruegg, P.L. Evaluation of petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* from milk samples. *J. Dairy Sci.*, **2005**; 88, 3000e3008.

Storz, G. ,&Hengge-Aronis, R. Preface, p. xii-xiv. In G. Storz and Hengge-Aronis (ed.), *Bacterial stress responses*.ASM Press, Washington, DC. **2000**.

Young, R. J., Huffmans, S. Probiotics use in children. *J. Pediatr Health Care*. 17:277-283. **2003**.

Yousef, A. E., Juneja, V. K. *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. CRC Press. 3 – 8. **2003**.