



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE MARISCOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO BIÓLOGO
PRESENTA
Adriana Josefina García Cárdenas
QUERÉTARO, QRO. 1977

No. Reg. 52153

TS

Clas. 576.163

G216C

*No tengo palabras para agradecer a mis
Padres el que me condujeran con su apoyo
y cariño a la meta que un día me forje.*

A:

Mi Hermano Gilberto

A:

Todos mis Familiares

A:

Mario

Con admiración a mis maestros

*Con especial agradecimiento al
M. en C. Pedro Vela Fuerte por su
valiosa orientación en la elaboración
del presente trabajo.*

*A todas mis amigas y compañeros en las
aulas Universitarias.*

A:

*Mis tíos Carmen y Víctor que
siempre me alentaron.*

A:

*Carmelita; compañera y amiga
desde los primeros años de estudio.*

INDICE

	Pág.
Introducción	1
Capítulo I. Historia	2-4
Capítulo II. Generalidades	
Valor nutritivo de los mariscos	5
Generalidades sobre los moluscos	6-8
Generalidades sobre crustáceos	8-10
Mariscos como agentes de intoxicación alimentaria	10
Reservorios de infección y modos de difusión	10-12
Alteraciones microbianas que sufren los mariscos	12-13
Efecto del procesado sobre las bacterias	13-15
Inspección de mariscos	15-16
Depuración de mariscos	17-19
Esquema de una planta depuradora	20
Procesamiento de mariscos	21-26
Capítulo III. Métodos	
Utilización de microorganismos indicadores	27
Recuento total de microorganismos	27-32
Gráficas de crecimiento microbiano	32
Organismos entéricos indicadores	33-35
Enterococos como microorganismos indicadores	36-37
Capítulo IV. Técnicas	
Homogeneizado de alimentos	39-40
Preparación de diluciones	40-41
Recuentos viables	41-43
Bacterias coliformes	
Coliformes totales	43-45
Determinación de coliformes de origen fecal	46
Pruebas de identificación de coliformes DMViC	47-48
Tabla del índice del NMP	48
Estafilococos	
Recuento de estafilococos coagulasa positiva	49-54
Prueba de la coagulasa	54-55
Capítulo V	
Generalidades sobre los microorganismos estudiados en el presente trabajo	
Coliformes en general	56-59
E. coli	59-62
Estafilococos	62-66
Tablas de resultados	67-73
Conclusión	74
Bibliografía	75

I N T R O D U C C I O N

En nuestro País, es muy frecuente encontrar casos de enfermedades o toxi infecciones y aún parasitosis causadas por el consumo de alimentos.

Alimentos que por estar contaminados con microorganismos patógenos resultan ser no aptos para el consumo humano.

En México y en muchos países principalmente los subdesarrollados no se lleva a cabo un control sanitario supervisado por las autoridades correspondientes a la salud. Y aunque existan éstas no ejercen control adecuado sobre la elaboración y distribución de alimentos.

Hay que señalar que en la época actual nuestra forma de vida ha cambiado en comparación con años anteriores a la industrialización. Ya que ahora es más frecuente la necesidad de tomar nuestros alimentos fuera del hogar, en sitios donde la preparación de los alimentos es en grandes cantidades y almacenados por períodos de tiempo largos, proporcionando condiciones favorables para el crecimiento y proliferación de los microorganismos.

El objetivo de este trabajo es demostrar esa falta de vigilancia en el control, elaboración y distribución de alimentos.

Como material para este estudio se han utilizado a los mariscos como ali mento a analizar, y el uso de microorganismos indicadores como método.

Las razones son las siguientes: Los mariscos son alimentos que en un 80% aproximadamente, se consumen fuera del hogar; son alimentos muy perecederos, requieren de medios especiales para su transporte, y principalmente porque son productos del mar que crecen y se les captura cerca de las costas en aguas contaminadas. Por lo tanto es lógico que este tipo de alimento se encuentre contaminado por una gran variedad de microorganismos.

El uso de microorganismos indicadores, es un grupo de microorganismos que han sido utilizados universalmente para determinar la calidad sanitaria de un alimento. Son utilizados estos microorganismos debido a que son más fáciles de cultivar, de enumerar y que su presencia en cierto número en un alimento se considera como indicación de que existen paralelamente otros microorganismos peligrosos que pudieran encontrar condiciones favorables para su crecimiento y reproducción.

CAPITULO I

HISTORIA

La intoxicación alimentaria no es una enfermedad nueva para el hombre, se tienen datos de que los antiguos ya identificaban a los alimentos que se creía causaban enfermedades, por ejemplo tenemos que las leyes de los israelitas contenían información sobre los alimentos que se podían comer y los que no, así también sobre los métodos de preparación y sobre la limpieza de las manos.

Aproximadamente en el año 2000 a.C., según indica el libro Levítico, Moisés dictó numerosas leyes que protegían a su pueblo de los estragos de las enfermedades infecciosas.

Los relatos de intoxicaciones alimentarias que registra la historia antigua se atribuyen a productos químicos venenosos, esto se debió a que el conocimiento de las intoxicaciones alimentarias de naturaleza no química, o sea bacteriana, no se remonta más que a la última parte del siglo XIX.

Aproximadamente desde 1880 se conoce la contaminación de los alimentos por microorganismos productores de enfermedad, y a partir de esta época se han señalado numerosas causas de enfermedades por alimentos.

En el año 1658 un monje, A. Kircher, examinando organismos en descomposición, carnes, leche y otras sustancias, fue quizá el primer hombre que reconoció el papel de los microorganismos en la alteración de los alimentos, considerando que ello se debía a "gusanos" invisibles a simple vista. Pero fue hasta el año 1675 en que con un instrumento óptico hecho con una lente biconvexa, Anton Van Leeuwenhoek hizo las primeras observaciones notables sobre las bacterias y estas fueron registradas.

Fue Luis Pasteur el gran químico bacteriólogo francés, entre los años 1857 y 1862, el que demostró que sin duda alguna las bacterias eran causa necesaria de enfermedad, a partir de entonces la marcha de los descubrimientos en el campo de la bacteriología y la microbiología en general fue rápida.

La primera bacteria productora de toxinas que causan intoxicaciones alimentarias que se ha descrito fue aislada en el año 1888 por el doctor Gaertner, a partir de los órganos de un hombre que había muerto por intoxicación alimentaria durante un brote ocurrido en Alemania, que afectó a otras 59 personas, bacterias similares se encontraron en la carne servida a las víctimas. Fue entonces cuando las intoxicaciones alimentarias gradualmente fueron relacionadas con contaminaciones bacterianas específicas.

En Bélgica en el año 1896 Van Ermengem, descubrió el microorganismo *Clostridium botulinum*, causante de la grave intoxicación alimentaria denominada botulismo. Por los años 1909 a 1923 muchas de las bacterias cono-

cidas en la actualidad como causantes de intoxicación alimentaria fueron agrupadas bajo el nombre genérico de Salmonella, en honor al doctor Salmon que en 1885 descubrió al primer miembro del grupo, el bacilo del cólera porcino. Otro grupo de bacterias implicadas en las intoxicaciones alimentarias, denominadas estafilococos, fueron halladas a partir del año 1914.

En 1945 fue descubierta otra cuarta causa importante de intoxicaciones, el bacilo anaerobio esporulado Clostridium Welchii este microorganismo es similar al Cl. botulinum pero de efectos menos catastróficos.

A pesar de que se han descubierto numerosos microorganismos causantes de enfermedades, se siguen presentando casos de intoxicaciones alimentarias. Podemos preguntarnos por qué los brotes de intoxicaciones alimentarias son aún tan frecuentes en la actualidad en que los estándares de vida son más elevados, y en que ha mejorado la higiene general y personal, y en que nuestros conocimientos científicos y tecnológicos son mayores.

Estos problemas siguen persistiendo debido al cambio de modo de vivir que tuvo lugar después de comenzar el presente siglo. El cambio fue tan sutil que apenas se notó en varios años.

Antes de la primera guerra mundial, los alimentos eran sencillos en su preparación, las comidas las preparaban en pequeños "restaurantes" de la época, lugares bastante sucios y con servicios higiénicos deficientes. Pero aunque los estándares higiénicos en esa época fueran inferiores a los actuales, el riesgo de que a tales comidas siguiesen intoxicaciones alimentarias era muy pequeño, porque aquellas comidas simples se cocinaban en el acto y se servían sin demora. Al crecer la población del mundo, al surgir la industrialización, los transportes públicos, etc., surgen con ellos los grandes restaurantes económicos. Después de la segunda guerra mundial se incrementa la población, la popularidad de las comidas precocidas aumenta, platillos preparados y van didos quizá varios días después de su preparación, platillos que son ideales para la reproducción de diversas bacterias productoras de enfer medades.

Con el transcurso de los años se sigue modificando la forma de vida, au menta el hábito de la alimentación comunal; pero las naciones no se en contraban aún preparadas para este enorme cambio. El personal, así como los establecimientos para la preparación de alimentos.

Las bacterias responsables de las infecciones vía los alimentos pueden

transferirse de los hospedadores humanos o animales a los alimentos en los cuales crecen y se multiplican rápidamente. Los alimentos constituyen por lo tanto una fuente potencial de infección y pueden no ser adecuados para el consumo.

Para impedir la difusión de infecciones de origen alimentario tenemos por lo tanto, que impedir el acceso de ciertas bacterias a los alimentos, debemos evitar a toda costa su crecimiento, si estos han tenido inevitablemente acceso a los alimentos.

CAPITULO II

GENERALIDADES

BIOLOGIA DE LOS MARISCOS

El término mariscos, se usa generalmente para referirse no sólo a los moluscos como ostiones y almejas, sino también a los crustáceos. Se puede decir que mariscos son cualquier animal marino invertebrado especialmente los moluscos y crustáceos comestibles.

Según la clasificación de los alimentos de acuerdo a su estabilidad, los mariscos pertenecen a los alimentos perecederos, son aún más perecederos que el pescado.

VALOR NUTRITIVO DE LOS MARISCOS

Para estudiar el valor nutritivo de un alimento o grupo de alimentos se debe:

a) Examinar la composición de cien gramos de la porción comestible del alimento y la cantidad de desperdicio, así tenemos que para los mariscos el valor nutritivo es:

- Moluscos (coquinas, mejillones, ostiones) 75% de desperdicio.
- Crustáceos (langostas, cangrejos, camarones) 63% de desperdicio.

Porción promedio servida= 100 gr

Comestible = 400 gr, pesados con desperdicios

TABLA Y VALOR NUTRITIVO DE LOS MARISCOS
 COMPOSICION PROMEDIO

- A Por 28 gr de porción comestible
- B Fracción de la ración diaria proporcionada por una porción promedio comestible de 100 gr

		Kcal	Prot (g)	Ca (mg)	Fe (mg)	Vit.A (UI)	B ₁ (mg)	B ₂ (mg)	Nic (mg)
Moluscos	A	19	3	40	0.5-8	60	0.01	0.04	0-4
marinos	B	-	1/5	1/4	10-200%	1/10	-	1/10	1/12
Crustá-	A	26	5	30	1.5	-	0.01	0.06	0.7
ceos	B	-	1/3	1/5	1/2	-	-	1/7	1/8

Los mariscos proporcionan buenas raciones de hierro y proteínas y cantidades útiles de calcio, ácido nicotínico y riboflavina; son deficientes en tiamina, vitaminas C, A, D.

Extracto de aminoácidos contenidos en diversos mariscos:

Valina	5.7	Fenilalanina	3.9
Leucina	8.0	Triptófano	1.1
Isoleucina	4.9	Cistina	1.2
Treonina	4.5	Arginina	6.8
Lisina	9.0	Histidina	3.4
	Metionina	2.9	

MOLUSCOS

La mayoría de los moluscos son formas libres que se arrastran o viven en el fondo del agua. Son miembros del Phylum Mollusca, consisten en casi cien mil especies conocidas; los moluscos se dividen en cinco clases:

Amphineura, Scaphalópoda, Gasterópoda, Pelecypoda (almejas y ostiones) y Cephalópoda (calamares y pulpo).

Los moluscos son de los seres vivientes más antiguos de la tierra, se han encontrado fósiles de moluscos con antigüedad de 600 mil años, existe la evidencia firme de que los moluscos se han originado en los océanos primitivos a partir de una línea extremadamente antigua.

Todos los moluscos tienen cuerpos blandos, y en la mayoría de las especies están protegidas por conchas duras o exoesqueletos.

Su cuerpo está constituido esencialmente de una cabeza, la cual en la mayoría de las especies está bien desarrollada, tiene los órganos de los sentidos, y una región viceral que contiene la mayoría de los órganos internos.

La locomoción la efectúan por medio de un pie muscular ventral, y una envoltura de un epitelio glandular, que los cubre totalmente y que en muchos casos segregan una concha constituida predominantemente de carbonato de calcio.

Para obtener alimento muchos de los moluscos con excepción de las almejas poseen un órgano específico, es una rádula o especie de lengua áspera formada de una banda de tejido con hileras de dientecillos córneos funcionando a manera de sierra. Solamente en los Gasterópodos es funcional esta rádula siendo vestigial en los Cefalópodos.

El tracto digestivo de todos los moluscos está esencialmente constituido de boca, esófago, estómago, intestino, rectoano y órganos anexos glandulares.

Con excepción de los cefalópodos, presentan un sistema circulatorio "abierto" bien desarrollado, formado de un corazón contráctil y de numerosos vasos sanguíneos que distribuyen la sangre hacia los diversos órganos del cuerpo, sin embargo dentro de los órganos la sangre fluye a través de espacios o senos, más que por medio de capilares, los elementos nutritivos y el oxígeno se difunden directamente hacia el fluido intracelular sin atravesar las paredes de los vasos sanguíneos. Los Cefalópodos tienen un sistema circulatorio excepcionalmente bien desarrollado de tipo "cerrado" (con capilares).

Los moluscos poseen órganos parecidos a los pulmones o sacos pulmonares, estos están constituidos de una cavidad paleal y de un manto muy vascularizado, el cual es el sitio del intercambio gaseoso en los gasterópodos terrestres y de algunos acuáticos. En todos los otros moluscos incluyendo los gasterópodos marinos, los órganos fundamentalmente para el intercambio gaseoso entre el agua y la sangre circulante son los bronquios.

Los órganos excretores de los moluscos son fundamentalmente nefridios o sea túbulos pares que están diferenciados en una porción tubular y otra a manera de vejiga.

El sistema nervioso en muchos consiste básicamente de tres pares de ganglios interconectados, que se localizan en la cabeza, pie y masa visceral, con nervios que se extienden a los músculos y superficies sensoriales del cuerpo. En otros como calamar y pulpo el sistema nervioso ha evolucionado hasta constituir una masa gangliolar muy desarrollado y especializado, el cerebro, cuyos nervios se extienden a todas las partes del cuerpo.

Los sexos están separados en muchos moluscos, y también los procesos reproductores varían grandemente, los ovarios y testículos generalmente son estructuras ramificadas dentro de la masa visceral. En unos la fecundación es externa y en otros interna, los cigotos se desarrollan primero en larvas ciliadas nadadoras llamadas trocóferas, en muchos esta trocófera pasa a un estado larvario llamado veliger, el cual se transforma después en adulto.

Los moluscos se caracterizan por la posesión de una concha o conchas que proporcionan protección al cuerpo blando que encierran. La concha que los recubre en algunas especies está constituida por dos valvas mantenidas por un músculo que permite la abertura de los mismos.

Estos moluscos reciben el nombre de bivalvos. En otros los moluscos poseen una concha solamente, denominados univalvos.

Entre los moluscos más importantes comestibles tenemos:

Ostras, vieiras, mejillones y berberecho, bigarós y bocinas, ostra común.

OSTRA COMUN (*Ostrea edulis*). Bivalvo, concha de forma oval, aplanada y hojosa.

OSTRA PORTUGUESA (*Cassostrea angulata*). Bivalvo, forma muy irregular, mayor en profundidad que la ostra común.

MEJILLON (*Mytilus edulis*). Bivalvo, valvas lisas negras.

BERBERECHO (*Cardium edule*). Bivalvo, valvas blancas con costillas iguales.

VIEIRA O CONCHA DE PEREGRINO (*Pecten maximus*). Bivalvo, concha en forma de abanico.

BIBARO (*Littorina littorea*). Univalvo, concha de forma de caracol, negra o pardo oscura.

BOCINA (*Buccinum undatum*). Univalvo, concha en forma de espiral.

Los moluscos difieren en su composición química tanto de los peces teleosteos como de los crustáceos por, contener una cantidad significativa de materiales hidrocarbonados, y una cantidad inferior de N, los carbohidratos se encuentran sobre todo en forma de glucógeno alcanzando un nivel que explica la actividad fermentativa que tiene lugar a producirse su deterioro bacteriano microbiano. En los lípidos musculares de los moluscos la proporción de arginina libre, ácido aspártico y glutámico es más alta que la encontrada en los peces.

La diferencia principal entre moluscos y crustáceos es que el contenido de carbohidratos en los moluscos es más elevada. Debido a los niveles altos de glucógeno el deterioro de los moluscos es básicamente fermentativo.

CRUSTACEOS

La clase crustácea está representada por organismos tan bien identificados como el cangrejo, la langosta, el langostino y el percebe. Existen aproximadamente 50 000 especies marinas y unos cuantos de aguas dulces.

Los crustáceos se caracterizan por la posesión de un cuerpo blando encerrado en un caparazón quitinoso. Este caparazón es rígido pero la cola es articulada y presenta un desarrollo considerable, en algunas especies y escaso en otras. Las patas son articuladas. Por la existencia de este caparazón rígido, los crustáceos crecen por mudas, la respiración se lleva a cabo por medio de bronquios situados encima de las patas. Los crustáceos poseen ojos, pero se desconoce si les son de utilidad. Entre otros sentidos se encuentran el del olfato, el gusto y el tacto, poseen antenas, piezas punzoras y masticadoras y extremidades, el primer par a veces dotado de piezas potentes. Los crustáceos de mar poseen dos pares de antenas o tentáculos sensitivos, un par de mandíbulas y dos pares de maxilares sobre sus cabezas, sus ojos son generalmente compuestos.

Poseen estos animales un sistema circulatorio abierto, con un corazón que late y arterias que terminan en el hemoceloma, grandes espacios llenos de sangre que se ramifican por casi todas las partes del cuerpo.

Dentro del grupo de los crustáceos más extensamente consumidos son las gambas, bogavantes, cangrejos de mar y langostinos.

CARON O QUISQUILLA GRIS (*Cragon vulgaris*). Pertenecen a los decápodos, son características de esta especie el que posee el primer par de patas engrosadas, terminando en pinzas, que carece de rostro, que posee el dorso redondeado y su color pardo que persiste después de hervido el crustáceo, su longitud alcanza hasta diez centímetros.

CIGALA (*Nephrops norvegica*). Su longitud es hasta de veinte centímetros.

CAMARON (*Leander squilla*). Posee rostro alargado, y su color es rosado, presenta manchitas rojas en todo su cuerpo en sentido longitudinal. Se dice que es más rosado cuando procede de aguas más profundas. Su caparazón se vuelve rojo y opaco después de la ebullición, mide de longitud hasta seis centímetros.

CANGREJO DE RIO (*Astracrus fluviatilia*). Pertenecen a los decápodos, se encuentra en los ríos puede distinguirse porque el segmento medio de su aleta caudal está dividido transversalmente. El cangrejo de río se vuelve rojo después de la cocción. Su longitud es de diez centímetros.

LANGOSTA COMUN (*Palinuros vulgaris*). La langosta común es de color naranja carece de pinzas grandes, el caparazón está cubierto por vellocidades finas y sus antenas son muy largas. Alcanza gran tamaño y no son raros los ejemplares de hasta tres a cinco kilogramos. Después de cocción la cáscara permanece de color naranja.

Los crustáceos se diferencian de los peces en que tienen alrededor de un 0.5/100 de carbohidratos, ya que en los peces su contenido es nulo.

Debido a su alto contenido de aminoácidos libres y extractivos nitrogenados es muy susceptible a ser rápidamente descompuesto por la flora productora de alteraciones. Se ha señalado que el músculo de los crustáceos contiene unos trecientos miligramos de N/100 de carne. Esta cifra es superior a la de los peces. El deterioro inicial de la carne de los crustáceos se ve acompañado de la producción de grandes cantidades de bases nitrogenadas, algunas de estas bases nitrogenadas volátiles provienen de la reducción del óxido de trietanolamina presente en los crustáceos, también se encuentra la arginina.

MARISCOS COMO AGENTES DE INTOXICACION ALIMENTARIA

Las intoxicaciones alimentarias de tipo bacteriano, a diferencia de la fiebre entérica o disentería, pueden considerarse ataques agudos de dolor abdominal y diarrea, generalmente acompañadas de vómitos que se manifiestan entre las dos y treinta y seis horas después de comer el alimento contaminado. Los agentes causales pueden clasificarse en cinco grupos:

1. Salmonelas
2. Estafilococos
3. Clostridium Welchii
4. Otros microorganismos como estreptococos, bacilos coliformes y bacilos esporulados aerobios.
5. Clostridium botulinum.

RESERVORIOS DE INFECCION Y MODOS DE DIFUSION

Las bacterias se encuentran en cualquier parte del medio ambiente, en el suelo, en el agua, en el aire, la mayoría de ellos no son perjudiciales para el hombre, pero existen muchos tipos que sí son patógenos.

Bajo ciertas condiciones son capaces de crecer y multiplicarse en los tejidos corporales y dar origen a enfermedades. Se sabe perfectamente que durante la enfermedad los gérmenes infectantes pueden transferirse de una persona a otra, de animal a animal, y de animal a hombre, bien directamente o a través de un medio tal como los alimentos. El nuevo hospedador puede sucumbir a la enfermedad o puede resistirla sin mostrar síntomas. De esta manera los gérmenes que se adaptan a vivir en las condiciones que ofrece el cuerpo humano o animal, mantienen su existencia y, cuando no se hallan causando enfermedad activamente, pueden sobrevivir tranquilamente en la nariz, garganta o intestino de una persona sana o de otro ser vivo.

Algunas intoxicaciones alimentarias son causadas por los productos tó-

xicos de las bacterias que crecen activamente en los alimentos, y no por la invasión del cuerpo por el microorganismo.

La carga bacteriana necesaria para infectar o para producir toxina, como para causar irritación varía con los diferentes microorganismos y también con la resistencia del huésped. El número de microorganismos de un alimento particular en un momento dado depende del tipo de alimento, de la temperatura y del tiempo de exposición.

Bajo condiciones existentes en el mercado, los mariscos a menudo están intensamente contaminados, esta contaminación puede provenir de: las aguas de donde se le pesca, por causa de los manipuladores, y de los utensilios para su manipulación. Como los mariscos son animales de estuario, están expuestos a contaminación fecal. Los moluscos de importancia comercial se encuentran próximos a las costas, y por ello es posible su contaminación por gérmenes diversos a partir de las aguas de alcantarillado, restos de barcos, etc., esto es esencialmente peligroso ya que muchos mariscos se consumen crudos, sin que se les haya sometido a un tratamiento térmico que inactivaría a los microorganismos patógenos que pudieran contener.

Los mariscos durante su respiración y alimentación filtran grandes cantidades de agua y captan con facilidad patógenos intestinales de los lechos contaminados, o cuando se colocan en agua salubre cerca de los desagües bocaderos de aguas negras para que "engorden". También están contaminados de manera similar con virus según demuestra la epidemiología de epidemias de hepatitis infecciosa transmitida por alimentos. Numerosos brotes de fiebre tifoidea se han debido a mariscos contaminados

Mientras que unas especies de mariscos se consumen pocas veces en crudo como ostras; los caracoles de mar, berberechos y bucinas; langostinos y gambas, se hierven antes de su venta, pero por lo general no se comprueba su cocción. Los mejillones producen muy pocos incidentes de intoxicación debido a que se consumen cocidos. Los berberechos también se cuecen y en ocasiones se les adiciona sal antes de su distribución, se han registrado incidentes debido al consumo de berberechos esto ha tenido lugar durante el tiempo cálido y la causa puede ser debida a contaminación y multiplicación después de su cocción y durante su venta al por menor. En el caso de camarones, gambas y colas de langosta cocidos y congelados, pueden ser congeladas aunque muy raramente se han aislado salmonelas en las muestras examinadas en el puerto directamente, debe de suponerse por lo tanto que raramente resultan contaminadas por manipuladores humanos y que no constituyen una fuente natural de salmonelas. Es más frecuente encontrar estafilococos procedentes de los manipuladores.

Además el usuario es responsable de mantener el producto en buen estado bacteriológico, el tiempo y la temperatura de almacenamiento entre la

descongelación y en consumo es importante.

La flora microbiana de los moluscos puede variar muy considerablemente dependiendo del agua en que han sido capturados o lavados y de otros factores.

En ostras alteradas se han encontrado los siguientes géneros de bacterias *Pseudomonas*, *Serratia*, *Proteus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Aerobacter*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium* y *Micrococcus*. Al principio y al avanzar la alteración, predominan las especies de los géneros *Pseudomonas* y *Achromobacter*, y en las últimas etapas prevalecen los estreptococos, lactobacilos y levaduras.

La flora bacteriana de los crustáceos recientemente pescados será reflejo de las aguas en que hayan sido capturados, de las contaminaciones de la cubierta del buque, manipuladores y agua de lavado.

Las *pseudomonas* y *achomobacter* son los microorganismos predominantes en los crustáceos deteriorados por acción microbiana.

ALTERACIONES MICROBIANAS QUE SUFREN LOS MARISCOS

Todos los animales marinos constantemente tienen sobre su superficie exterior poblaciones de bacterias más o menos grandes, no se tiene información exacta sobre la cantidad de gérmenes que se encuentran en la superficie de los crustáceos y moluscos pero se dice que poseen una cifra semejante que para los peces siendo para estos 10^5 y 10^2 gérmenes existentes en la piel por cm^2 . Los tejidos y órganos de crustáceos y moluscos sanos están estériles.

Durante la vida de los crustáceos y moluscos no existe una penetración declarada en los tejidos de las bacterias presentes en la superficie corporal y en el intestino, pareciendo existir un tipo de equilibrio en donde las cantidades de las bacterias se conservan en un nivel bastante estable. Cuando el animal muere dejan de existir las defensas humorales contrarias a la invasión microbiana, a la vez que las barreras mecánicas como lo es la piel y membranas pierden gradualmente su impermeabilidad. Teniendo como resultado de estos cambios y otros post mortum, se rompe el equilibrio entre las bacterias y el animal apareciendo inmediatamente evidentes modificaciones cuantitativas y cualitativas en dichas poblaciones bacterianas.

Durante un breve período de tiempo siguiente a la muerte y que corresponde estrechamente con la instauración, duración y resolución del "rigor mortuus", existe poco cambio en el número de bacterias presentes; sigue después un período de crecimiento gradualmente acelerado, que va asociado a cambios organolépticos principalmente el olor, enseguida la población

microbiana entra en fase de crecimiento más o menos exponencial, que corresponde a la iniciación de la aparición de sustancias como la trimetilalanina y otras afines son bien conocidas por ser indicadores de alteración. Esta etapa dura poco tiempo y le sigue un período de crecimiento terminal más o menos estacionario, en este período se producen pocos cambios respecto al número de la población bacteriana superficial, pese a la ausencia de cambios bacterianos cuantitativos, este es el período de máxima actividad alterante terminando prácticamente cuando el alimento está próximo a la putrefacción.

Se ha comprobado que este esquema clásico de crecimiento se repite en todas las muestras de pescado, moluscos y crustáceos sometidos a refrigeración o sea por encima de 0°C y por debajo de 10°C.

ALTERACIONES CUALITATIVAS

Las alteraciones cualitativas que ocurren en la población bacteriana y que acompañan a los cambios cuantitativos mencionados no son bien conocidos, la flora predominante gramnegativa y en forma de bastón que se encuentra en los animales marinos vivos, resulta frecuentemente alterada por las operaciones de manipulación que preceden al depósito en hielo, con lo cual gérmenes gram positivos como el *Micrococcus* y el *Corynebacterium* alcanzan una cuantía importante transitoria en la población de gérmenes superficiales. No obstante durante el período de aparente retardamiento y en la fase de aceleración del crecimiento los cambios cualitativos que se producen en la flora restablece la predominancia de las formas gramnegativas en forma de bastón, con lo cual cuando tiene lugar el crecimiento logarítmico, por lo general el 90% de las bacterias presentes son de esta clase.

A la vez se producen cambios en el equilibrio entre los géneros normalmente presentes de organismos gramnegativos.

De todos los factores físicos y químicos que influyen sobre el desarrollo bacteriano, el factor más importante es tal vez la temperatura. Las bacterias psicrófilas, que normalmente producen el deterioro de los alimentos marinos, se multiplican muchas veces más de prisa a temperaturas próximas a los 22°C que a los 0°C.

EFECTO DEL PROCESADO SOBRE LAS BACTERIAS

El procesado de los alimentos marinos tiene un objetivo principal, éste es impedir de diversas maneras la acción de los gérmenes de la descomposición. La mayoría de las técnicas del procesado tienden a lograr uno de los tres efectos siguientes:

1. Inhibición parcial de los gérmenes.
2. Inhibición completa.
3. Esterilización.

1. **Inhibición parcial.** La inhibición parcial se consigue generalmente en la práctica, manteniendo la temperatura de almacenamiento de los alimentos marinos próxima a los 0°C, esto puede lograrse usando hielo o salmuera refrigerada.

A bajas temperaturas se reduce bastante el ritmo de multiplicación de las bacterias de la putrefacción y así retardar la instauración de la fase de crecimiento logarítmico, y el correspondiente desarrollo de las alteraciones profundas. Se utilizan también aditivos químicos, que también ocasionan la inhibición parcial de la fracción sensible de la flora bacteriana, de una manera un tanto diferente, pero proporcionan los mismos resultados finales que la refrigeración.

Otra forma de lograr una inhibición parcial es mediante la pasteurización que se puede realizar por medio de calor o por radiaciones de alta energía, teniendo un efecto selectivo sobre las bacterias sensibles frenando la multiplicación de la flora de la descomposición retrasando así la putrefacción.

Las modernas técnicas de ahumado, proporcionan sólo una inhibición parcial de las bacterias. La previa salazón y desecación pueden originar cierta reducción en la taza bacteriana, se cree que se logra un efecto bacteriano colectivo.

2. **Inhibición completa.** La congelación salazonado, y desecación son procesos mediante los cuales se logra la inhibición completa.

En los procesos donde se logra la inhibición completa, existe la característica bacteriológica de presentar reversibilidad, ya que al ser descongelados los alimentos principalmente los marinos muestran inmediatamente, los signos característicos de la descomposición, ya que las bacterias inhibidas recuperan su capacidad normal de multiplicación.

Otro factor importante que influye sobre el desarrollo bacteriano es el pH, el pH bajo, o sea ácido es un poderoso inhibidor de carácter general del desarrollo bacteriano, pero existen microorganismos capaces de multiplicarse y causar alteración en los alimentos, a niveles bajos de pH.

3. **Esterilización.** Para lograr la esterilización existe solamente un método comercial de procesamiento de los productos marinos, este método es el enlatado, aunque se ha señalado que la irradiación en altas dosis también alcanza la esterilización. En ambos casos, las bacterias presentes sobre el producto marino resultan muertas, de tal manera que el procesamiento de la putrefacción sólo puede reanudarse por contaminación del producto a partir de una fuente externa.

Los productos marinos frescos y congelados como los moluscos constituyen un peculiar problema debido a su natural sistema de alimentación, y a su desarrollo en aguas costeras expuestas a contaminación de origen telúrico, los gérmenes productores de toxinas causantes de intoxicaciones alimentarias, no crecen por lo general de manera significativa a bajas temperaturas o sea inferiores a 10°C, en tanto que la flora normal, por ser principalmente de naturaleza psicrófila se multiplica más rápidamente. Cuando la temperatura es lo bastante elevada para permitir el desarrollo de organismo peligroso, la flora normal crecerá en la mayoría de las veces mucho más rápido, resultando con éste que los posibles gérmenes patógenos se vean desbordados y pueden llegar a morir. Se ha comprobado que existe un efecto letal sobre dichos gérmenes patógenos debido al desarrollo competitivo de la flora de putrefacción.

INSPECCION DE MARISCOS

Inspección de moluscos. El objeto del muestreo de moluscos es determinar si están o no contaminados por bacterias procedentes de aguas residuales. Como las zonas de recogida o criaderos puede ser variable el grado de contaminación de un momento a otro, es importante que los muestreos se tomen frecuentemente. Lo ideal sería recoger muestras semanalmente.

Los moluscos deben muestrearse a su llegada al mercado para evitar tomar en cuenta las contaminaciones posteriores a causa de la manipulación de que son objeto.

El número representativo de la muestra puede ser de diez o doce moluscos, no habiendo diferencia entre los más superficiales y los más profundos del recipiente a muestrear, la muestra debe ser recolectada en un recipiente estéril.

En la inspección de moluscos el aspecto y el color son los principales factores que sirven de guía en una inspección. El exterior de la concha de los mejillones debe estar limpia y separadas una de otra, cuando se encuentran conglomerados con barro y hierbas, se deben examinar estos racimos y lodos separadamente, ya que éstos podrían ser la causa de contaminación de moluscos limpios durante el transporte al mercado. La concha de los moluscos bivalvos aparece fuertemente cerrada, o se cierra al tocarlos. Cuando la concha aparece abierta o semiabierta el molusco está alterado y desprende por lo general mal olor.

Quando se examina un recipiente que contenga moluscos bivalvos, si estos están alterados puede percibirse un sonido hueco producido por las balvas abiertas cuando el recipiente es agitado para que choquen entre sí.

Los moluscos bivalvos se inspeccionan mediante un examen visual, cuando

están frescos no desprenden mal olor, el cuerpo es firme y se introduce en la concha al tocarlos. Si están alterados desprenden mal olor, están húmedos y blandos y se encuentran encogidos en la concha.

INSPECCION DE CRUSTACEOS

Cuando los bogavantes están alterados las extremidades y la cola aparecen flácidos y la carne desprende un olor desagradable, decoloración y exudación de humedad. Cuando están frescos la cola se mantiene rígida incluso después de haber sido hervidos. Los cangrejos cuando están alterados tienen un aspecto blanquecino, flacidez de pinzas y cola y desprende mal olor. Las quisquillas de ríos y los cangrongs, aparecen secos cuando están frescos y su olor es agradable. Se vuelven húmedos y viscosos cuando están alterados y presentan olor amoniacal.

Estos tipos de inspección son de tipo visual y organolépticos, existe otro tipo de inspección que es la microbiológica.

El servicio de Sanidad Pública de Estados Unidos de Norteamérica, ha su gerido que en la prueba de presunción no tiene que haber más de cincuenta por cien de muestras de un mililitro de líquido reunido de las conchas y tejido finamente triturado de diez o más ostras moluscos o similares que presenten bacterias coliformes, pero esta cifra es de orienta ción más que de un valor estándar.

Existen estándares bacteriológicos establecidos y son los siguientes para el caso de los mariscos:

Contajes viables inferiores a 100 000 por gramo son la regla normal. Menos de veinte bacilos coliformes por gramo y menos de cien estafilococos coagulasa-positivos por gramo; estos niveles se logran fácilmente si se tiene cuidado durante su fabricación.

En la fijación de estándares desde el punto de vista sanitario para los moluscos se han establecido diferentes tipos de calidad, siendo éstas tres:

Calidad sanitaria I, comprende aquellos moluscos con cinco o menos E. coli por mililitro, de carne y son aceptados en todos los mercados.

Calidad sanitaria tipo II, comprende los que tienen de 6 a 15 E. coli por ml., se consideran como sospechosos y es preciso efectuar un segundo muestreo.

Calidad sanitaria tipo III, comprende aquellos moluscos con más de 16 E. coli por ml., y son considerados como inaceptables.

DEPURACION DE MARISCOS

Para los mariscos, principalmente para los moluscos que se consumen crudos, es necesario depurarlos o sea limpiarlos, existiendo para este propósito estaciones depuradoras.

Desde el punto de vista de la depuración, los mariscos que solamente tienen importancia son las ostras y los mejillones. Los berberechos y bigaros, tienen menos importancia ya que se cuecen casi siempre antes de ser consumidos y los bigaros se cuecen siempre para poder sacarlos de su concha.

En el año de 1916 el English Fisheries Department, inició una investigación sobre el problema de la posible depuración de moluscos, posteriormente el Dr. Dodgson demostró que si los mejillones se mantenían en agua de mar no contaminada durante 48 horas, ellos mismos se liberaban de sus gérmenes peligrosos, resultando después inocuos para el consumo humano.

Métodos de depuración de mejillones:

La depuración de mejillones se basa en la técnica de Dodgson, esta técnica consiste en dos baños de agua previamente esterilizada añadiendo cloro en forma de hipoclorito cálcico, este baño debe durar toda la noche. Actualmente se ha comprobado que el cloro destruye las bacterias procedentes de aguas residuales en pocos minutos, no siendo necesario por lo tanto que el baño dure toda la noche, siendo suficiente añadir la solución de hipoclorito cálcico al agua de mar, según sea vertida ésta sobre los mejillones en el tanque de depuración.

Con esta modificación a la técnica de Dodgson se han obtenido varias ventajas ellas son, reducir el costo de instalación, simplificación del proceso, así como de tiempo. Se ha simplificado más el proceso debido a que el hipoclorito cálcico para estos fines en la actualidad se vende en forma estabilizada y que posee una concentración de cloro relativamente constante. Para obtener la solución deseada se añaden 450 gr. del producto a 40 000 litros de agua, lo que evita tener que preparar una solución inicial y buscar su concentración de cloro mediante titulación.

Ejemplo de una estación depuradora:

La estación depuradora de mejillones de Conway, consta de un tanque de almacenamiento de agua con capacidad de 360 000 litros y de tres tanques de limpieza y depuración los cuales tiene poca profundidad.

Las dimensiones del tanque de almacenamiento son de 21 metros de longitud por 9 metros de ancho y aproximadamente 2 metros de profundidad. Y es llenado con agua de mar con ayuda de una bomba eléctrica vertiendo 240 000 litros por hora. El llenado se lleva a cabo únicamente durante

durante el período de marea alta, cuando el peso específico del agua li toral pura es de 1.026. A medida que el agua de mar se vierte en el tanque de almacenamiento se va añadiendo el hipoclorito cálcico. De es te modo se destruyen las bacterias procedentes de aguas residuales que puedan existir en el agua de mar.

Los tres tanques de limpieza y depuración tienen una longitud total de 30 metros por 12.5 metros de ancho, la profundidad varía de 82.5 cm. en un extremo a 105 cm. en el otro, constituyendo la inclinación de su fondo la parte más esencial de su diseño. Sobre este fondo inclinado y de un extremo al otro de los depósitos existen soportes o salientes de hormigón a modo de viguetas de aproximadamente 10 cm. de altura y con un espacio alrededor de uno a dos metros, la misión de estas salientes es soportar una rejilla de madera dispuestas de tal manera que queda por debajo de ellas un espacio libre de 10 cm., lo que permite que la sucied ad de los mejillones pueda evacuarse cuando estos son lavados.

Los mejillones son depositados en el tanque y el pescador los extiende sobre el suelo de la rejilla hasta formar una capa uniforme no mayor de 7.5 cm. de espesor. Los mejillones primero son lavados con agua mediante una manguera, eliminando de esta forma la suciedad de las conchas y esta suciedad es arrastrada con el agua por los espacios libres de la rejilla. Después de esta limpieza externa el tanque se llena con agua de mar clorada procedente del tanque de almacenamiento, a medida que el agua fluye en el tanque de limpieza y depuración, sobre ella se vierte una solución de hiposulfito sódico para eliminar las posibles trazas de cloro que pudieran aún existir en el agua tratada, se necesitan 2.5 lb. de hiposulfito sódico para 40 000 litros de agua. El tanque se llena hasta una profundidad de aproximadamente de 90 cm. y así se deja durante la noche hasta la mañana siguiente, eliminándose y sustituyéndose por volúmenes semejantes de agua tratada. Esta se deja hasta la mañana siguiente, en que también se elimina. A continuación los mejillones se cubren con una capa delgada de agua, justa la superficie para cubrir a los moluscos, esta agua contiene 10 p.p.m. de cloro y se deja durante media hora para esterilizar las conchas. Se elimina esta agua y los mejillones se someten a una ducha con manguera para eliminar las heces, estando finalmente listos para ser envasados.

Depuración de ostras:

En los últimos años la depuración de ostras se ha llevado a cabo en ins talaciones con luz ultravioleta, y ya ha sido aprobado este método. Este método presenta ciertas ventajas como son su simplicidad, el no emplear compuestos clorados o de otro tipo, a los que se les ha atribuido la causa de dar a los mariscos sabores desagradables, y además es un procedimiento barato y seguro.

Debido a que el agua puede ser usada varias veces, esto supone una venen

taja también, por ser menor el número de veces que es necesario llenar los tanques, operación que en algunos casos puede estar supeditado al estado de la marea.

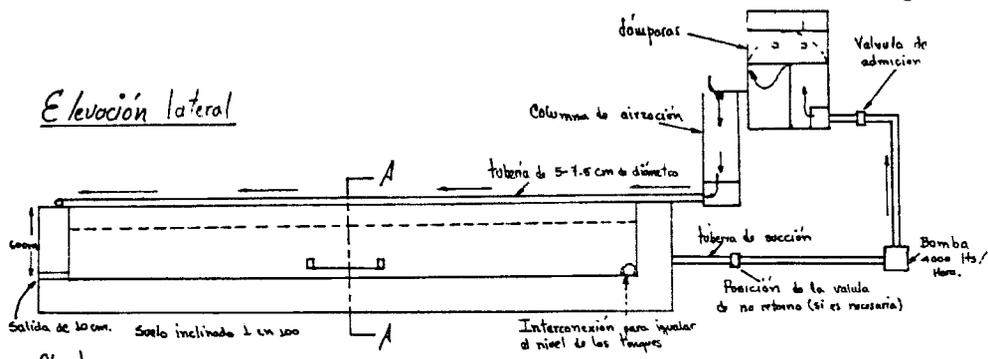
Este tipo de instalación está constituido por dos tanque por lo general, o por una serie de depósitos más pequeños en los cuales el agua circula de manera continua, con la ayuda de una bomba eléctrica, el agua al pasar por debajo de lámparas de luz ultravioleta es esterilizada y se aere^a al caer en cascada siendo después conducida por una tubería al lado opuesto de donde fue tomada.

Las ostras se colocan en bandejas, ocupando toda el área del depósito, en cantidad de hasta 550 por metro cuadrado.

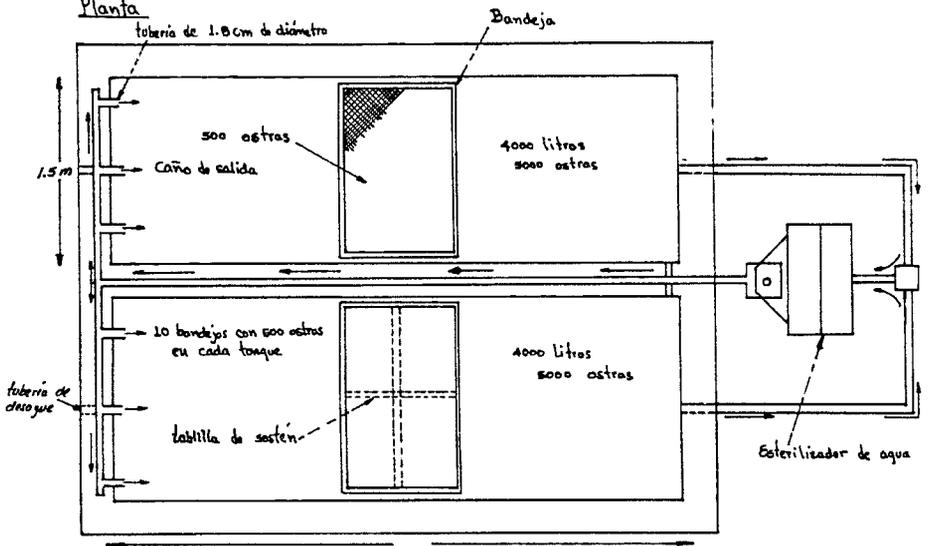
Pasado el proceso de depuración que se completa después de 36 horas de inmersión, las ostras se sacan del depósito tomando las bandejas donde se encuentran a medida que son requeridas. Las ostras no destinadas a la venta inmediata pueden mantenerse en los tanques hasta una semana sin sufrir ninguna alteración. Durante la purificación, el agua de los tanques no debe estar a una temperatura inferior a 5°C, la salinidad del agua empleada en la depuración no debe ser inferior a 25 p.p.m., para la ostra común y de 20 p.p.m. para la ostra portuguesa.

Las instalaciones típicas para la depuración de ostras, tienen capacidad para 10 000 ostras y constan de un depósito de 6 metros de longitud por 3 metros de ancho y con una profundidad de 45 a 60 cm., en la mayoría de las instalaciones el tanque está dividido en dos partes, y de este modo colocando las ostras en cada parte en vías alternas puede disponerse de 5 000 ostras depuradas diariamente.

Elevación lateral

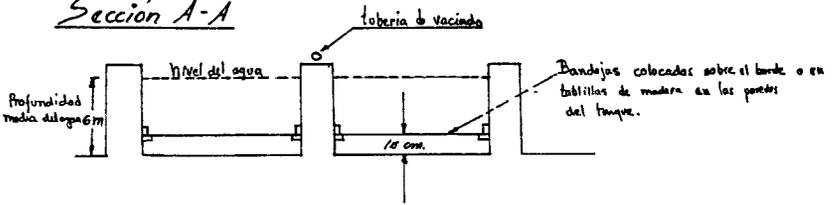


Planta



Nota: las flechas indican la dirección del flujo del agua.

Sección A-A



Tanque con luz ultravioleta para la depuración de ostras

PROCESAMIENTO DE LOS MARISCOS

Moluscos y crustáceos. El enlatado de estas especies se diferencian del pescado, en que se cuecen previamente hasta cierto punto antes de ser enlatados, envasados o congelados. Y además precisan un tratamiento ulterior, tal como el salazonado, acidificación, o una combinación de los mismos.

Crustáceos.

Gambas. Llamados también langostinos. Se encuentran por lo general en aguas poco profundas la pesca tiene lugar en bahías y otras zonas de ensenadas con menos de quince brazas de profundidad, pero existen otras que se encuentran en aguas más profundas.

Métodos de pesca. El 95% de las gambas capturadas se pescan con redes de arrastre con puertas de madera, las cantidades relativamente inferiores se pescan con redes de arrastre con viga, también con trampas cebadas o con redes de bolsa.

La pesca de la gamba se realiza principalmente durante el día. El tiempo que la red es arrastrada varía mucho, pero ordinariamente es de dos a tres horas. Además de gambas las redes arrastran cantidades considerables de "morralla" compuesta de peces, esponjas, cangrejos y otros animales. Cuando la red de arrastre se vuelca sobre cubierta, las gambas son separadas de la morralla. Las gambas se suelen descabezar en la embarcación, después son colocadas en cubos de capacidad de 38 kg. y se lavan con chorro de agua de mar aplicado con manguera, posteriormente son almacenados en hielo.

Es importante que la manipulación se efectúe con rapidez, ya que las gambas se capturan en aguas que alcanzan temperaturas elevadas, de no hacerse así pueden ser alteradas por las bacterias, y presentarse un tipo de alteración conocido como "manchas negras", esta es una alteración que afecta a la cáscara de la gamba y que puede originar la decoloración de la carne, esta mancha negra es causada por un sistema enzimático óxido reductor, y por lo cual se agrava al exponer a las gambas al aire. En el muelle las gambas se descargan en tanques de lavado que sirven para limpiarlas. Si no se les ha descabezado, enseguida se efectúa esta operación, clasificándolas al mismo tiempo por tamaño. Las gambas se envasan con hielo machacado o con salmuera refrigerada.

Procesado. Las gambas en el mercado se venden de diversas formas: frescas, congeladas, rebozadas, enlatadas, curadas y como productos especiales en sopas, gambas en salsa, pasta de gambas, etc.

Con las cabezas desperdicios de las gambas resultantes, la industria

enlatadora principalmente se fabrican harina que se utiliza como suplemento del pienso de aves y otros animales.

Enlatado. El enlatado de las gambas se realizó por primera vez en Estados Unidos en 1867 por la familia Dunbar de Luisiana.

Las gambas recibidas en la factoría son vertidas en un dispositivo lavador y separador del hislo, del cual son sacadas por una cinta continua de tela metálica, ésta pasa frente a los inspectores que eliminan a las gambas rotas, descompuestas y descoloradas, o cualquier substancia extraña. Enseguida son descabezadas y se les quita la cáscara. Esta operación puede hacerse manualmente o con ayuda de máquinas. Las gambas vuelven a ser inspeccionadas para establecer su calidad y poder clasificarlas por tamaño, las mayores son sometidas al "desvenamiento", esta operación es quitarle "la vena" o sea el intestino de la gamba, esta operación se realiza a máquina hendiendo el músculo de la gamba en toda la longitud del intestino y quitándolo, haciendo pasar la gamba a través de un cilindro rotatorio y dentado parcialmente sumergido en agua,

Escaldado. Esta es la etapa siguiente, dura de uno y medio a tres minutos según el tamaño de la gamba, la salinidad suele ser de 25°, las gambas se empujan a través de la solución salina en ebullición.

En algunos otros procesos las gambas pasan directamente desde el escalador a un tanque de agua fría, así se interrumpe el proceso de la ebullición rápidamente y se controlan mejor los rendimientos, las gambas pasan del tanque de enfriamiento a la cinta transportadora del desecador, en éste pierden exceso de humedad o pueden pasar directamente desde el escalador a la cinta y después se categorizan en clasificadores de agitación, en los cuales las gambas caen a través de una serie de orificios que las separa en cinco categorías de acuerdo al tamaño. Se efectúa la inspección final y se envasan manualmente las latas al ser selladas se les adiciona una solución caliente con una tableta de sal, efectuando al mismo tiempo el vacío. Las latas al ser selladas se llevan a las autoclaves, se les aplica temperatura de 120°C, el tiempo que dura este proceso varía con el tamaño de la lata, siendo de 12 minutos para los tamaños comunes de 211x300 y de 307x113. Para evitar que se estrópeen con el exceso de calor, se detiene el proceso de cocción rápidamente al finalizar el tiempo de procesado, cerrando las válvulas de vapor, se abre el escape y se inunda el autoclave con agua. Las latas se enfrían alrededor de 37°C, ya secas se colocan en cajas y se refrigeran a temperaturas bajas como 18°C.

Otro tipo de presentación de las gambas es como gambas enlatadas en seco el proceso difiere en que las gambas son escaldadas durante ocho a diez minutos, las latas se forran con papel parafinado, no se les agrega líquido y son mantenidas durante 60 minutos a 120°C.

Gambas crudas congeladas con cáscara, es otro tipo de presentación, las gambas se reciben en la planta de congelación, son descargadas en un tanque de lavado, después son categorizadas por tamaños y se envasan en cajas de cartón, son depositadas en un congelador a temperaturas entre -12 y -20 °C, las gambas se congelan durante quince horas. Al salir del congelador, se eleva la temperatura del envase y se agregan cerca de 225 ml. de agua con pulverizador, la tapa se cierra y el envase se vierte, formándose de esta manera un bloque casi perfecto de gambas y hielo, protegiéndose así de la decoloración.

Otra presentación es como gambas congeladas peladas y desvenadas, el proceso es el mismo que para las que se presentan congeladas y peladas solamente que en este caso se les quita la vena.

Gambas rebosadas, el proceso es el mismo que para el caso anterior solamente se les adiciona una mezcla de harina de trigo y maíz extracto seco desgrasado de leche, especias y otros ingredientes, se someten a cocción y se envasan en cajas de cartón parafinado y finalmente se congelan entre -17 y -40 °C.

Estas son algunas de las presentaciones de las gambas conocidas comúnmente como camarones.

Se puede afirmar que las gambas o camarones son el alimento marino más importante desde el punto de vista económico.

Los camarones se capturan principalmente en las costas cercanas de Estados Unidos, en el Atlántico del Sur, el Pacífico y el Golfo de México.

Cangrejos. Los cangrejos deben de estar vivos al iniciarse el proceso de enlatado, se les quita el caparazón o escudo dorsal, tras lo que son eviscerados, lavados bien y luego precocidos diez o quince minutos en agua hirviendo o vapor antes de su acidificación, además la carne de cangrejo se suele sumergir o envasar en una solución de ácido cítrico para evitar la decoloración del producto.

Moluscos.

Las almejas, ostras y mejillones se procesan de manera similar.

Ostras. La ostra fue uno de los primeros alimentos marinos utilizados por el hombre. Este molusco vive en aguas poco profundas entre los niveles alcanzados por ambas mareas, y en bahías y estuarios abrigados, por el lugar donde habita es fácil de capturar, así para el hombre primitivo el cual no poseía ningún tipo de utensilios para obtener su alimento, le era muy fácil de capturar este tipo de moluscos. Además por ser la ostra un animal sedentario se disponía de este alimento todo el año.

El género ostra, que por lo menos comprende nueve especies de interés comercial, se encuentra en las orillas de todos los continentes con excepción de la región Antártica.

La ostra es un molusco bivalvo, los sexos pueden estar separados o alternar en el mismo organismo según la especie; al principio de su vida es un ser que nada libremente, pero las crías pronto se asientan en el fondo del agua y se adhieren a cualquier objeto duro.

Recolección. Las ostras pueden recogerse de tres maneras:

1. Reuniéndolas a mano cuando la marea está baja.
2. Atenazando las ostras.
3. Utilizando dragas motrices cuando los barcos están cubiertos de agua.

La recolección manual se practicó en épocas primitivas posteriormente surgió el método de "atenazado", las tenazas para la recogida son un dispositivo semejante a dos rastrillos articulados cerca de la extremidad inferior y con los dientes dispuestos unos enfrente de otros. Se introducen las tenazas hasta el fondo del banco, abriendo y cerrando los mangos recogiendo las ostras en los bordes dentados.

Por ser este un procedimiento muy lento en la actualidad se utiliza el dragado motriz. La draga puede ser una barca a motor o un lanchón, la embarcación remolca a la draga, que es una estructura metálica con una barra dentada atravesada en su posición frontal, esta desprende a las ostras de la arena y lodo, las cuales ruedan hacia atrás hasta una bolsa de tela metálica.

Procesado. Las ostras se preparan para el mercado de varias maneras, si las ostras se van a vender con concha, solamente es necesario lavarlas por fuera, envasarlas en sacos o barriles y refrigerarlas.

La mayor parte de las ostras se destinan al "vaciado"; en el punto de origen la carne una vez sacada de la concha va a un dispositivo llamado "burbujeador" o lavador, donde las ostras limpias son agitadas en agua potable por medio de un chorro de aire que entra en el depósito hasta el fondo. La violenta agitación y la explosión de las burbujas de aire hacen que las ostras se separen y suelten la arena y residuos que llevan incluidos.

Si las ostras se mantienen en el baño de agua largo tiempo aumentan de peso, a este aumento se le llama "remojo" de las ostras; existen dispositivos legales que regulan el tiempo que las ostras deben de estar sometidas a esta operación y así evitar la absorción de cantidades im procedentes de agua.

Una vez lavadas las ostras se vierten sobre una mesa y se categorizan por tamaños.

Las ostras destinadas al comercio sólo deben criarse en aguas libres de contaminaciones. A la salida del aparato lavador, las ostras se introducen por tamaños en recipientes de cristal o de metal, y son enviados al mercado en hielo machacado, la temperatura de refrigeración por lo menos debe de mantenerse a 1°C. El período máximo de almacenamiento de las ostras limpias refrigeradas es de unos 16 días. Las ostras depositadas en recipientes metálicos para ser almacenadas largo tiempo se congelan intensamente y se depositan a -20°C.

Existen productos preparados a partir de ostras congeladas; las ostras abiertas recientemente se cortan en rodajas o en cubos y se les adicionan ingredientes como sal, pimienta, etc., se envasan y se congelan; también se les puede encontrar en el comercio como productos precocinados ya sea fritas en aceite y envasadas en caja de cartón en forma congelada.

Las conchas de las ostras constituyen una fuente importante del suplemento caliza en avicultura. También sirve como suplemento en los pienso para el ganado.

Almejas. Como las ostras, las almejas fueron importante alimento para los primeros colonizadores de las costas del Atlántico, ya que al descender la marea quedan al descubierto grandes bancos de diferentes especies de almejas.

Las almejas se encuentran a lo largo de la costa del Atlántico desde Maesie hasta México, y en la costa del Pacífico desde Alaska hasta México.

La almeja es un molusco bivalvo, no pasa su vida en la superficie del fondo de los mares, tal como lo hace la ostra, sino que las almejas se entierran en el fondo de la arena a varios centímetros de profundidad, y para alimentarse alargan hasta la superficie una apéndice tubuliforme llamado sifón y que contiene dos conductos, el de entrada y el de salida sirviéndole uno para alimentarse y el otro para desechar, además este sifón sirve para detectar cualquier peligro en la superficie.

Recolección. En las explotaciones a gran escala se utilizan barcos con dragas semejantes a las descritas para las ostras.

Procesado. Las almejas deben de salir al mercado lavadas, limpias de arena y suciedades y clasificadas por tamaño.

Para eliminar las bacterias perjudiciales las almejas se mantienen en agua con cloro.

Las almejas se separan de su concha para ser enlatadas, después del lavado con agua abundante para limpiarlas de arena, se hacen pasar por

una cámara de vapor dotada de una pantalla de tela metálica sometida a movimiento de vaivén, la cual impulsa a las almejas hacia adelante a la vez que separa la parte blanda de las conchas. A medida que las conchas van siendo vertidas al final de la cámara de vapor, las conchas se apartan hacia los lados por una corriente de aire en ángulo recto a la dirección del transportador de las almejas, las conchas van a parar a otra cinta transportadora de residuos. Posteriormente los sifones se cortan y se escinden longitudinalmente para lavar la arena y suciedad y eliminar la porción visceral. Las piezas limpias pasan a través de una máquina trocadora y se introducen mecánicamente en latas.

Las almejas sin concha pueden enlatarse enteras o troceadas en su jugo, al cual se le denomina "néctar de almejas".

CAPITULO III

METODOS

UTILIZACION DE MICROORGANISMOS INDICADORES

Entre los requisitos que debe presentar un alimento para que se considere de buena calidad higiénica, se encuentran el estar exentos de microorganismos peligrosos, o que si los hay, estén en un nivel que los haga inocuos.

En general no es posible analizar cada producto o alimento para el aislamiento y recuento de gérmenes patógenos, ya que los métodos son poco eficaces cuando los microorganismos patógenos se encuentran en pequeño número y sobre todo cuando abundan otros microorganismos. Aún cuando se cuenta con métodos eficaces y sensibles, los costos y el tiempo son inaccesibles.

Debido a esta serie de dificultades en la determinación de microorganismos patógenos en los alimentos, ha sido la causa de que se utilicen grupos de gérmenes o especies de enumeración más fácil, y cuya presencia en cierto número se considera como una indicación de que los alimentos estuvieron expuestos a condiciones que pudieron determinar la llegada de microorganismos peligrosos a los alimentos, y que pudieran permitir la proliferación de especies patógenas o toxigénicas.

Los grupos de gérmenes denominados microorganismos indicadores han sido utilizados para este fin, proporcionando gran utilidad para la determinación de la calidad bacteriológica de los alimentos y por lo tanto la garantía que ofrecen al consumidor.

Mediante el uso de microorganismos indicadores, se pone de manifiesto las prácticas de higiene inadecuadas, como son las condiciones del tratamiento y manipulación de los alimentos que suponen un peligro potencial, que puede no estar presente en la muestra de alimento estudiado, pero sí en muestras similares del mismo alimento.

Actualmente los indicadores de calidad higiénica aplicados a los alimentos comprenden dos grupos de bacterias: Coliformes y Enterococos, siendo además utilizado el recuento total de microorganismos.

RECUESTO TOTAL DE MICROORGANISMOS

Los recuentos de microorganismos pueden hacerse ya sea de células viables y no viables, llamándose recuento total de microorganismos, este tipo de recuento se efectúa con ayuda del microscopio y la cámara de Petroff-Houser.

El método consiste en contar a las células viables ya sea aerobias o anaerobias pero en ambos casos a temperaturas de 37°C o próximas a ella.

Bacterias aerobias mesófilas

Estos recuentos se obtienen en placas de agar incubadas a temperaturas aproximadamente de 37°C y en forma aerobia.

Los recuentos altos de microorganismos viables indican frecuentemente materias primas contaminadas, que la limpieza y desinfección durante su manipulación no fueron correctas.

Considerándose no aptos para el consumo a los alimentos con recuentos altos, (excepto los alimentos fermentados) aún cuando estos microorganismos no sean patógenos o que no lleguen a alterar las propiedades organolépticas del alimento. Además los recuentos altos indican, que han existido condiciones que pudieran haber favorecido el que ciertos microorganismos patógenos hayan proliferado considerablemente y que se encuentren por consiguiente en el alimento en grandes cantidades.

También pueden estar presentes bacterias que se les considera no patógenas pero que en gran número sí pueden ser consideradas como patógenas.

Sin embargo el recuento de flora aerobia viable tiene un valor limitado en ciertos casos:

1. En determinados alimentos donde es natural una multiplicación bacteriana, ya que paralelamente tiene lugar una "fermentación" o "maduración" del producto. Careciendo de valor un recuento alto en estos casos.
2. En los alimentos tratados por el calor los recuentos de microorganismos viables pueden dar cifras muy bajas. Revelando en realidad únicamente el grado de tratamiento.
3. En los alimentos desecados y en los congelados siempre se obtienen recuentos de bacterias viables más bajos. Siendo preferible en este caso efectuar un recuento directo al microscopio para comprobar si en un principio la materia prima antes de ser sometida a procesamiento existían o no abundantes gérmenes.
4. Los recuentos de gérmenes mesófilos son de poco valor cuando se va a predecir el tiempo de duración de un alimento conservado en refrigeración, ya que a temperaturas entre 15 y 5 °C, o más bajas mueren muchos microorganismos mesófilos. Para ello es preferible efectuar recuentos de gérmenes viables psicrófilos, a temperaturas de incubación entre 0 y 5 °C.

La utilización de los microorganismos aerobios mesófilos, es tal vez porque es más fácil incubar en forma aerobia que en anaerobia. Pero los recuentos anaerobios mesófilos, incluyen por lo general muchos organismos facultativamente anaerobios tales como coliformes, estreptococos fecales y estafilococos. Además estos recuentos pudieran ser útiles como indicadores de la existencia de condiciones favorables para la multiplicación de los organismos anaerobios productores de intoxicaciones alimentarias tales como *Clostridium perfringens*, *Cl. botulinum*.

Al hablar de recuentos totales de microorganismos, es necesario hablar de crecimiento bacteriano.

Las células crecen por absorción de materiales nutrientes que utilizan como elemento de construcción para producir nuevo protoplasma. Cuando una célula bacteriana alcanza la madurez, su tamaño máximo, se divide en dos, y cada célula hija iniciará una "vida" independiente y nueva.

El periodo entre la formación inicial de una bacteria y su división final en dos células hijas recibe el nombre de tiempo de generación. Este tiempo de generación varía para los diferentes tipos de bacterias, y aún varía para un tipo determinado de bacterias cuando las condiciones del medio sufren alguna alteración. Los tiempos de generación de las bacterias fluctúan entre veinte minutos y hasta varias horas.

El desarrollo bacteriano de un cultivo supone un aumento de la masa celular y del número de organismos sin relación constante entre ambos, por lo tanto, en los estudios cuantitativos del crecimiento celular es necesario distinguir entre concentración celular o número de células por unidad de volumen de cultivo, y densidad bacteriana, que se define como el protoplasma total por unidad de volumen. Para llevar a cabo la enumeración real de concentración celular se efectúa la cuenta total directa o cuentas biológicas indirectas.

Para contar a los microorganismos viables se distribuye homogéneamente una muestra de la población del organismo en estudio en un medio de cultivo adecuado a base de agar que haya sido licuado por calentamiento. Cuando el agar se enfría se solidifica, y cada uno de los organismos quedan separados de los otros. Durante la incubación cada célula viable produce descendencia suficiente para formar una colonia visible.

Crecimiento potencial logarítmico

Cada individuo microbiano crece hasta cierto límite, y se divide formando dos individuos, estos dos repiten el proceso para formar cuatro y así sucesivamente, como la población se duplica en cada generación, su número se puede expresar por potencias del número dos, así por ejem

pló una célula puede expresarse como 2^0 , dos células se expresarán como 2^1 , cuatro células como 2^2 , etc. Tales progresiones en una población se denominan crecimiento logarítmico se observa:

1. El lapso entre generaciones sucesivas, o tiempo de generación, es constante durante el crecimiento exponencial.
2. Cada generación la población se duplica en progresión geométrica o sea 1, 2, 4, 8, 16, etc., con la diferencia constante de aumento en progresión aritmética 2, 4, 6, 8, etc.
3. Los exponentes también se pueden expresar como logaritmos y se recomienda su uso ya que las cantidades de organismos que se producen son muy elevadas.

Como el logaritmo de un número es el exponente de la potencia a la que debe elevarse una cifra fija llamada base para obtener dicho número, y como el 2 es una base apropiada para usarse ya que los microorganismos se duplican en cada generación por lo cual esta relación puede expresarse matemáticamente como:

$$\log_2 X = n$$

Donde:

x = al número de células producidas en n generaciones

n = al número de generaciones

La relación entre logaritmo y número de generaciones se puede expresar como fórmula matemática general:

$$\text{Número de generaciones} = n = \log_2 n_0$$

nt = número de microbios presentes después de cierto tiempo de crecimiento exponencial.

n_0 = al número inicial de microorganismos.

4. El número de generaciones entre dos determinaciones cualesquiera practicadas a una población que crece exponencialmente, es igual a la diferencia entre los exponentes obtenidos para ambas determinaciones. Ejemplo, la diferencia que hubo entre el número de generaciones entre ocho células (2^3) y 128 células (2^7) es $n=7-3=4$

Gráficas de crecimiento microbiano:

El crecimiento microbiano puede presentarse en una gráfica, si tenemos que una gráfica de una población de microorganismos que consta de individuos son un tiempo de generación de una hora y que empieza a multiplicarse inmediatamente por división celular la gráfica de esta po-

blación se podrá trazar mediante el número de individuos (eje de las abs cisas), pero como el número de microorganismos pronto alcanza valores elevados, y además el aumento de la población no es realmente una función aritmética directa de la edad del cultivo obteniendo en la gráfica una curva y no una recta. Si los resultados se utilizan para trazar una gráfica del logaritmo del número de individuos con respecto a la edad del cultivo, el crecimiento de la población se convertirá en una función lineal de la edad del cultivo.

También se pueden hacer gráficas de logaritmo del número de individuos contra el tiempo, todas estas gráficas se trazan en papel semilogarítmico, o papel milimétrico.

El crecimiento de una población no puede continuar indefinidamente.

Este crecimiento está limitado por el espacio, los elementos nutrientes acumulación de desechos que se convierten en tóxicos para los microorganismos mismos, y otros factores.

Las fases observadas del crecimiento bacteriano pueden estar definidas en una curva ideal de crecimiento. En la siguiente figura tenemos:

Fase A - Este período se le llama fase inicial estacionario o logarítmica de crecimiento, se presenta antes de que las células entren en el período de crecimiento exponencial. Esta fase se explica partiendo de que las células deben ajustarse a su nuevo ambiente antes de que se presente la división celular de alguna mutante, estas células después formarán el tipo de organismos dominantes del cultivo. En este caso la mayoría de las células inoculadas al principio o sea tiempo cero, dejan de reproducirse en el nuevo ambiente del cultivo, mientras que la cepa mutante sí desarrollará en un nuevo ambiente.

Fase B - En este período ya aparece la etapa de crecimiento exponencial o logarítmico. En este período se mantiene elevado el índice en el número de microorganismos, además casi todas las células son viables y se reproducen, con el aumento constante de el número de microorganismos por unidad de tiempo conduce finalmente a lograr la población máxima del cultivo. Cuando se han acumulado gran cantidad de microorganismos se presentan factores que detienen el crecimiento, estos factores pueden ser, falta de oxígeno, agotamiento de nutrientes, reducción del espacio, y la acumulación de productos tóxicos.

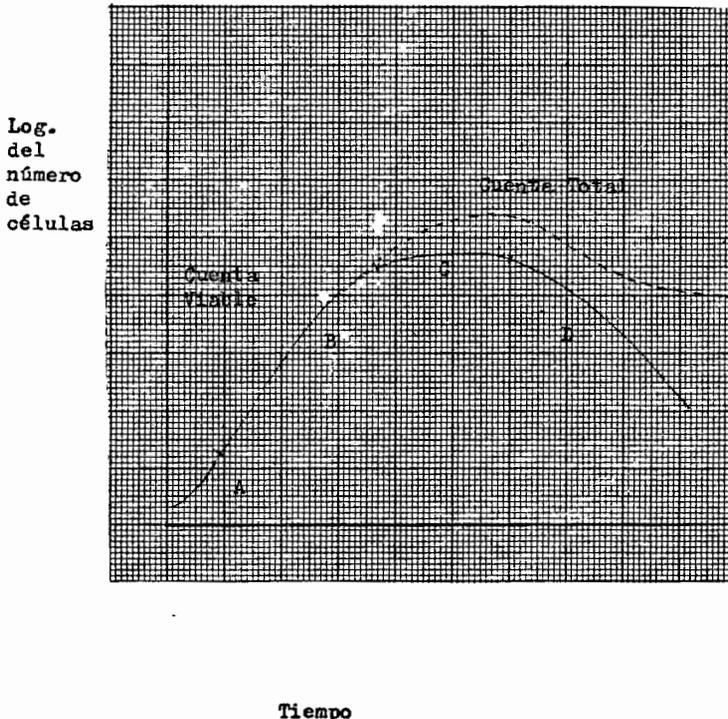
Fase C - Se le conoce como fase máxima estacionaria en un cultivo. Esta fase ocurre debido a la muerte de las células viejas, pero al mismo tiempo queda equilibrada con la producción de células

nuevas, así se logra que permanezca constante la curva viable. La cuenta bacteriana total o sea células vivas y muertas continúa aumentando más allá del comienzo de la fase máxima estacionaria, determinada por las células viables.

Fase D -A esta fase se le llama fase de muerte. La proporción exponencial o logarítmica de células viables con respecto a células no viables es menor cada vez. Alcanza un valor constante el índice de mortalidad, pero la curva en esta fase puede sufrir cambios no esperados, tal como células mutantes que resisten los efectos dañinos del medio envejecido pueden dar origen a nuevas poblaciones, o que los productos resultantes del catabolismo celular puedan servir como sustrato para la producción de nuevas células y que se reinicie otra fase de crecimiento.

FIG

Curvas ideales del crecimiento microbiano determinado por las cuentas viables y total de la población.



ORGANISMOS ENTERICOS INDICADORES

ESCHERICHIA COLI Y COLIFORMES

Schodinger fue el primero que en 1892 utilizó el *Escherichia coli* como microorganismo indicador de microorganismos patógenos transmitidos por el agua. Este microorganismo se eligió para este fin, debido a que se encuentra en el intestino del hombre y animales. En 1893, Teobaldo Smith hace constar que puesto que este microorganismo se encuentra presente de forma constante en el tracto intestinal, su presencia fuera del intestino puede considerarse como contaminación de origen fecal si se le encuentra en los alimentos. Y por ello *E. coli* es el indicador clásico de la presencia simultánea de bacterias patógenas entéricas. Entre los microorganismos patógenos entéricos tenemos: *Salmonella typhi* otras almonelas, *Shigellas*, *Vibrios*, entamoebas, parásitos diversos de zoonosis y virus entéricos.

Es difícil y costoso determinar la presencia en los alimentos de la mayoría de estos gérmenes y por ello se hace necesario confiar en la presencia de los microorganismos indicadores. Sin embargo, se debe considerar que, la presencia de *E. coli*, en un alimento no indica que existan también necesariamente gérmenes patógenos, sino que simplemente advierte el riesgo de que pudieran estar presente. Para determinar la presencia de *E. coli*, se determina primero a los gérmenes coliformes totales. Al efectuar estas pruebas preliminares, se deduce la posibilidad de contaminación de origen fecal, los coliformes se someten a otros ensayos para determinar si entre ellos está presente *E. coli*.

En término general "coliformes" comprende *Escherichia coli*, y especies de otros géneros de la familia Enterobacteriaceae. En la tabla siguiente se señalan los grupos taxonómicos de enterobacterias en relación con su presencia y detección en los alimentos:

GRUPO I

TIPOS ENTEROPATOGENOS

Salmonella

Arizona

Shigella

Ciertos serotipos de *Escherichia coli*Ciertos serotipos de *Providencia*

GRUPO 2

POSIBLES INDICADORES DE CONTAMINACION FECAL

Escherichia coli

Proteus

(de forma más restringida biotipos, ureasa positivos de *Klepsiella*, *Enterobacter aerógenes*).

GRUPO 3

BACTERIAS GRUPO COLI AEROGENES

(Que fermentan rápidamente la lactosa con formación de gas)

Escherichia coli

Citrobacter

Enterobacter aerógenos

Klebsiella

GRUPO 4

BACTERIAS NO PATOGENAS NO DETECTAS POR LO GENERAL EN LAS PRUEBAS
PARA EL GRUPO COLI AEROGENES

Citrobacter

Hafnia

Ciertos serotipos de E. coli

Proteus

Serratia

Ciertos serotipos de Providencia

Erwinia

Los coliformes distintos de E. coli persisten en el suelo o sobre las superficies mucho más tiempo que E. coli, por lo tanto los gérmenes coliformes no indican necesariamente contaminación fecal, en el sentido de implicar un contacto inmediato con heces o con una superficie contaminada con heces.

En resultados de la determinación cuantitativa de gérmenes coliformes (incluyendo E. coli) en un alimento pueden no guardar ninguna relación con la cuantía de la contaminación original. Esto sucede cuando el alimento no ha sido conservado a temperatura adecuada, o cuando se ha almacenado durante algún tiempo.

Lo anterior se aplica a los alimentos, pero en el agua no sucede lo mismo ya que en este caso el número de coliformes puede estar directamente relacionado con el grado de polución. Por otra parte en alimentos industrializados los coliformes indican un tratamiento inadecuado o una contaminación posterior al tratamiento, esta contaminación puede deberse a manipuladores o a instrumentos sucios o a materia prima contaminada.

En los experimentos hechos para encontrar métodos seguros y rápidos para poner de manifiesto la presencia en los alimentos de E. coli o de variantes muy próximas, sin la necesidad de purificar los cultivos o de aplicar pruebas de IMViC, que son métodos relativamente costosos, ha surgido el concepto de "coliformes fecales", con esta denominación se designa a un grupo de organismos seleccionados por incubación del inóculo procedente de un caldo de enriquecimiento de coliformes a temperaturas mayores de las normales (44 a 45.5°C). Tales cultivos contienen por lo general un alto porcentaje de E. coli tipos I y II y son por ello muy in-

dicadores de una probable contaminación del alimento por materia de origen fecal.

CONCLUSIONES:

1. E. coli es un buen indicador de contaminación fecal en la mayoría de los alimentos.
2. Los otros microorganismos coliformes son buenos indicadores de una limpieza y desinfección no adecuada, o que en los alimentos industrializados los tratamientos o procesos higiénicos no son adecuados. La presencia de niveles altos de coliformes en un alimento tratado o industrializado indica que pudieran haber existido circunstancias favorecedoras de la multiplicación de microorganismos, y por lo tanto también de Salmonellas, Shigellas, estafilococos y de otros agentes introducidos probablemente a consecuencia de la deficiencia de limpieza y desinfección.
3. Los coliformes fecales tienen una probabilidad mayor de contener organismos de origen fecal y por ello son indicadores más seguros de contaminación fecal que los coliformes totales.

LAS ENTEROBACTERIAS TOTALES COMO MICROORGANISMOS INDICADORES:

Este método utiliza un medio que permita la formación de colonias por parte de todos los miembros de la familia Enterobacteriaceas en vez de seleccionar como indicadores a los miembros lactosa positivos (Escherichia y Aerobacter).

Ventajas de la utilización de las Enterobacteriaceas totales como microorganismos indicadores.

1. Así se evitan resultados negativos de coliformes, engañosos en ciertos casos en que pueden estar presentes enterobacterias patógenas, tales como salmonellas.
2. Varios miembros lactosa negativos de esta familia tales como Salmonellas y Shigellas, no sólo indican contaminación fecal sino que tendrán un significado más directo en relación con la salud pública que los coliformes.
3. En ciertos procesos tales como la radiación (tipo de pasteurización mediante radiaciones iónicas). Algunas Salmonellas pueden ser más resistentes que las especies de los géneros Escherichia y Aerobacter.

ENTEROCOCOS COMO MICROORGANISMOS
INDICADORES

En este grupo se incluyen principalmente estreptococos del grupo D de Landcefield. El grupo D incluye además de los enterococos especies me nos resistentes tales como *Streptococcus equinus*, a todo este grupo se le designa "estreptococos fecales".

Aunque los estreptococos se encuentran presentes en las heces de mamíferos no han sido adoptadas de modo general como indicadores de contaminación fecal, ya que por ejemplo en los alimentos industrializados en el agua y en los moluscos puede existir escasa correlación entre la presencia de enterococos y la de *E. coli*, aunque en alimentos naturales y no industrializados sí existe correlación entre coliformes y enterococos.

Debido a su gran resistencia a la desecación, a las altas temperaturas, y a los detergentes y desinfectantes, los enterococos pueden tener un papel importante como indicadores de una limpieza y desinfección deficientes en las industrias alimenticias. Debido a su mayor resistencia a la congelación, los enterococos se prefieren a veces como organismos indicadores de falta de limpieza y desinfección en los alimentos congelados y en alimentos tratados o deshidratados, procesos que destruyen organismos indicadores más sensibles como enterobacteriaceas.

Los enterococos son miembros del género *streptococcus*, que son cocos gram positivos de cadenas largas o cortas, y que se diferencian de los demás cocos gram positivos, en que son catalaza negativos.

Aunque existe cierta confusión sobre qué especies de enterococos deben incluirse en el término enterococos, en la actualidad se admite que los enterococos son miembros del grupo D de la clasificación serológica de Lancefield.

El grupo D comprende cuatro especies distintas:

<i>S. faecalis</i>	<i>S. faecium</i>	<i>S. bovis</i>	<i>S. equinus</i>
Var. <i>liquefaciens</i>	Var. <i>durans</i>		
Var. <i>zymogenes</i>			

Los enterococos de mayor importancia en bromatología, corresponden a los tipos *S. faecalis*, *S. faecium*, siendo las otras dos especies de menos interés.

Los enterococos de mayor importancia en bromatología, corresponden a los tipos *S. faecalis*, *S. faecium*, siendo las otras dos especies de menos interés.

Streptococcus salivarius, este microorganismo se ha utilizado como indicador de contaminación oral en fábricas alimenticias, debido a que este microorganismo está casi siempre presente en la boca humana.

Los *Streptococcus salivarius* mueren rápidamente en las superficies secas, se cultivan en agar Mitis-Salivarius, en este medio se permite la diferenciación de *Streptococcus salivarius*, de los enterococos por los diferentes caracteres de las colonias formadas.

ESTAFILOCOCOS COMO MICROORGANISMOS INDICADORES

La presencia de *Staphylococcus aureus* en un alimento se interpreta por lo general como indicativo de contaminación a partir de la piel, boca y fosas nasales de los manipuladores de alimentos, pueden ser causantes de la contaminación por estafilococos los utensilios sucios la manipulación o procesamiento de un alimento.

Quando se encuentra un gran número de estafilococos en un alimento, ello significa que la temperatura de conservación no ha sido adecuada, así como tampoco la limpieza y desinfección del equipo. Existen métodos específicos para determinar la presencia de estafilococos patógenos como son los estafilococos coagulasa-positivos, no siendo necesario efectuar recuentos de estafilococos en general, sean de cualquier tipo.

CLOSTRIDIOS COMO MICROORGANISMOS INDICADORES

La presencia de clostridios mesófilos en alimentos enlatados no ácidos, indica que posiblemente el tratamiento térmico fue insuficiente para destruir las esporas de *Clostridium botulinum* que pudieran hallarse presentes.

En alimentos refrigerados o desecados, la presencia de clostridios en número anormalmente acelerado, o en una proporción alta de la población bacteriana total, pudieran indicar un peligro por parte tanto de *Cl. per*fringes como de *Cl. botulinum*.

CAPITULO IV

T E C N I C A S

Para el análisis de alimentos congelados, se indican generalmente cuatro investigaciones microbiológicas.

1. La estimación del contenido microbiano, o sea recuentos viables.
2. Estimación del número de bacilos coliformes, especialmente de *Escherichia coli*, que se considera generalmente como indicador de contaminación fecal reciente o remota.
3. Aislamiento de bacterias productoras de intoxicación alimentaria.

TOMA DE MUESTRAS, PREPARACION Y DILUCION, HOMOGENEIZADO DE LOS ALIMENTOS PARA SER ANALIZADOS

TOMA DE MUESTRAS:

Los análisis microbiológicos en particular dependen en gran parte de la calidad de las muestras que se analizan.

Quando la toma de muestras no es adecuada, pueden introducirse algunos microorganismos a la hora de efectuar el muestreo del material a analizar, estas contaminaciones debidas a la toma inadecuada de la muestra alteran la veracidad de los resultados microbiológicos reportados en un análisis.

Sólo aquellos microorganismos que se encuentran en el sitio del cual se tomó la muestra deben de estar presentes y ser sometidos a análisis.

Por lo anteriormente expuesto es de vital importancia el transporte y toma y manejo de las muestras a analizar.

La muestra siempre debe de ser representativa, para evitar cualquier contaminación, las muestras deben de colocarse en vasos o tomadores de muestras metálicos esterilizados tomando gran cantidad de muestras, y efectuando el tipo de muestreo como mejor convenga al caso. En productos en vasados se examinan varios envases completos tal como se ofrecen a la venta.

El transporte de las muestras debe de ser el apropiado a cada caso, en algunos será necesario el transporte a temperaturas bajas, recipientes especiales, etc., Para efectuar análisis microbiológicos, el lapso de la toma de muestra y el análisis a efectuar es importante; esto dependerá de la presentación del producto.

HOMOGENEIZADO

Los métodos de aislamiento y recuento de los microorganismos presente en los alimentos no líquidos requieren por lo general la preparación previa de las muestras con el fin de liberar en un medio fluido a los microorganismos presentes en los alimentos no líquidos, ya que en este tipo de alimentos los microorganismos pueden estar aprisionados en las estructuras del alimento, en superficies secas o gelatinosas.

Para lograr una suspensión homogénea del alimento, se utilizan batidoras o licuadoras, o mediante la ayuda de un bisturí.

Cuando se usan licuadoras es necesario controlar la velocidad de las espas ya que pueden lesionar a las células bacterianas al ser expuestas a velocidades altas, lo mismo sucede con el tiempo de homogeneizado.

DILUYENTES

Se debe tener precaución al usar los diluyentes, existen algunos que pueden ser tóxicos para algunos microorganismos. No se recomienda el agua destilada o la solución salina, las soluciones más utilizadas por dar mejores resultados, son la solución de Ringer o el agua de peptona al 1%, esta última da excelentes resultados. Los diluyentes no deben de utilizarse inmediatamente cuando se sacan del refrigerador, los cambios de temperatura pueden afectar a las bacterias impidiendo su reproducción.

TECNICA:

1. Si la muestra está congelada, descongelarla en su envase original manteniéndola en el refrigerador durante 18 horas de 2 a 5 °C.
2. En un vaso estéril o en un vaso del homogenizador, pesar 10 o 50 gr. de la muestra. Si el contenido del envase no es homogéneo, tomar una muestra a partir del macerado de todos los componentes. También se pueden cortar en trozos pequeños con un bisturí estéril, se trozan 10 g. con 90 ml. de diluyente, esta mezcla se agita con fuerza y se deja sedimentar. Se supone que las bacterias se hallan en este momento uniformemente distribuidas entre el sólido y el líquido.
3. Añadir al vaso 90 o 450 ml de diluyente, obteniéndose de esta manera una dilución 10^{-1} .
4. Homogenizar el alimento y hacer las diluciones sin pérdida de tiempo, si el homogenizado se efectúa en licuadora medir escrupulosamente el tiempo de homogenización, el cual debe de ser de dos minutos a alta velocidad. Esperar de 2 a 3 minutos hasta que desaparezca la espuma.

5. Medir un mililitro de la dilución 10^{-1} del homogenizado, evitando la formación de espuma y pasarla a un recipiente con 99 ml de diluyente a 10 ml a uno con 90 ml de diluyente. Agitar esta dilución y las subsiguientes enérgicamente 25 veces en un arco de 30 cm. Repetir esta operación para preparar las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} etc.

PREPARACION DE DILUCIONES:

Se deben de tomar las siguientes precauciones; utilizar pipetas limpias estériles que no sean de rápido vaciado.

La pipeta se hunde en la muestra solamente 2.5 cm. se toma un ml. y se deja caer en el primer blanco de dilución; estos blancos se preparan con 9 ml. de diluyente en tubos de ensayo; la solución de la pipeta se deja caer en los blancos de dilución 1 cm. por encima del nivel del líquido, se aspira tres veces y se sopla la pipeta, esta pipeta se elimina.

Con una pipeta limpia se introduce en el líquido 2.5 cm. se mezcla el contenido del primer tubo aspirando y dejando caer diez veces el líquido, sin producir espuma, se eleva la pipeta y se sopla; se toma 1 ml. que se transfiere al segundo blanco de dilución, se elimina la pipeta. Se procede con las otras diluciones de la misma manera.

Las diluciones quedarán de la manera siguiente:

TUBO NUMERO	1	2	3	4
DILUCION	1/100	1/1000	1/10 000	1/100 000
PESO DEL MATERIAL ORIGINAL EN g.	0.01 10^{-2}	0.001 10^{-3}	0.0001 10^{-4}	0.00001 g. 10^{-5} g.

RECUENTOS VIABLES

Frecuentemente es necesario determinar el tamaño de la población bacteriana de una muestra.

El recuento de "gérmenes vivos" se funda en que se desarrollará de cada germen una colonia visible, sin embargo las bacterias están rara vez se paradas por completo de sus vecinos y se agrupan frecuentemente en racimos en gran número, por ello una colonia aislada puede originarse de un solo organismo o de cientos, o aún de miles. Rara vez las bacterias se hallan distribuidas uniformemente en la muestra, pudiendo existir error en los resultados obtenidos al efectuar las cuentas viables.

Ningún medio aislado o temperatura de incubación pueden dar el cuadro total; de tales medios y temperaturas de incubación deben escogerse teniendo en cuenta las condiciones de almacenamiento conocidas para los alimentos, así por ejemplo para los mariscos la temperatura será dentro del margen de los psicrófilos.

Si el alimento ha sido refrigerado los alimentos pueden estar "shockados por el frío" y crecen únicamente en medios enriquecidos.

Por todas estas causas se admite que en los métodos de recuento de gérmenes vivos son inevitables los grandes errores, aún cuando se emplean grandes números de placas duplicadas. Es preciso combinar por lo tanto el máximo cuidado en la técnica con una interpretación liberal de los resultados.

Entre los varios métodos para el recuento de microorganismos viables tenemos:

Enumeración de gérmenes aerobios mesófilos. Consiste en tres técnicas:

1. Recuento Standar en placa por siembra en profundidad.
2. Recuento en placa por siembra en gotas en superficie.
3. Recuento en placa de siembra por extensión en superficie.

Ninguno de estos métodos es capaz de poner de manifiesto todos los microorganismos presentes en una muestra.

Siempre que se utilicen estos métodos debe especificarse la temperatura de incubación. Por lo demás pueden aplicarse al recuento de grupos distintos de microorganismos con temperaturas de crecimientos variables, de 0-5°C. para los psicrófilos; de 30-35°C para los mesófilos y de 55°C para los termófilos.

TECNICA:

METODO STANDAR DE RECUENTO EN PLACA POR SIEMBRA EN PROFUNDIDAD;

1. Preparar la muestra de alimento por uno de los procedimientos de homogeneización y dilución.
2. Pipetear en placas de petri alícuotas de 1 ml. de las diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-5} , y una alícuota de 0.1 ml. de la dilución 10^{-5} .
3. Inmediatamente vertir en las placas inoculadas 10 a 15 ml. de agar para métodos estándar fundido y templado a $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Se mueve seis

veces describiendo círculo en el sentido de las manecillas del reloj. Se repite el mismo número de veces en el sentido contrario, se mueve la caja de atrás hacia adelante el mismo número de veces y lo mismo con movimientos laterales; se deja solidificar.

4. Se invierten las placas y se incuban 24 a 48 horas a 37°C o a la temperatura adecuada.

Para realizar el conteo de colonias, se escogen las placas que muestren entre 30 y 300 colonias.

Cálculos.- Se multiplica el promedio de las colonias contadas en las placas contables, por el recíproco de la división y se refiere como "colonias contadas por gramo o por mililitro" no como "bacterias por mililitro".

RECUESTO EN PLACA DE SIEMBRA POR EXTENSION EN SUPERFICIE

1. Añadir a cada placa 15 ml. de agar para métodos estándar fundido y enfriado a 45 - 60 °C y se deja solidificar.

Secar las placas preferiblemente a 50°C durante 1.5 a 2 horas.

2. Preparar las muestras de alimento siguiendo uno de los métodos recomendados anteriormente.
3. Utilizando una única pipeta, tomar 0.1 ml de cada uno de las divisiones a ensayar (por lo menos tres) y depositarlos en la superficie del agar de cada una de las placas, dos placas de dilución. Comenzar por la dilución más alta y continuar hasta la más baja, llenando y vaciando la pipeta tres veces antes de transferir los 0.1 ml a la placa.
4. Extender las alicuotas tan pronto como sea posible después de depositadas y con cuidado sobre la superficie del agar con ayuda de un distribuidor de vidrio. Dejar secar la superficie del agar durante 15 minutos.
5. Incubar las placas invertidas durante tres días a 30°C \pm 1°C.
6. Contar todas las colonias en las placas que presenten 30 a 300 colonias.
7. Calcular el número de gérmenes aerobios mesófilos por gramo de muestra.

METODO DE RECUESTO EN PLACA DE SIEMBRA POR GOTAS EN SUPERFICIE

1. Preparar placas secas de agar sangre de caballo o de agar para métodos standar en la forma descrita en el método anterior.

Marcar en el fondo de las placas tres segmentos iguales, e indicar en cada uno la dilución a sembrar.

2. Preparar las muestras de alimento como ya se recomendó utilizando como diluyente solución de Ringer, de concentración 1/4.
3. Mediante la pipeta especialmente calibrada depositar dos gotas (0.02 ml.) de cada solución sobre la superficie del agar de los segmentos correspondientes. De este modo, con sólo dos placas pueden sembrarse por duplicado seis diluciones.
4. Dejar que se sequen las gotas durante 15 minutos a temperatura ambiente con la superficie del agar hacia arriba.
5. Incubar las placas invertidas durante 48 horas a $30 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
6. Contar las colonias formadas en las divisiones que den 20 o menos colonias por gota.
7. Calcular el número de organismos mesófilos por gramo de muestra.

BACTERIAS COLIFORMES

COLIFORMES TOTALES

Se utilizan tres métodos principales para la determinación de coliformes. Uno de ellos se basa en la técnica del número más probable (NMP). Entre los métodos para el número más probable de coliformes tenemos:

METODO I

1. Preparar las muestras como ya se indicó.
2. Pipetear un mililitro de cada una de las diluciones de el homogeneizado de alimento en tubos de caldo lauril sulfato, utilizando tres tubos por dilución.
3. Incubar los tubos a $35 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 y 48 horas.
4. Pasadas las 24 horas anotar los tubos que muestren producción de gas, volver a incubar los tubos gas negativo durante 24 horas más.

5. Pasadas las 48 horas anotar los tubos que muestren producción de gas.
6. Elegir la dilución más alta en que sean positivos de formación de gas los tres tubos y las dos diluciones superiores más próximas. Si esto no es posible, ya que ninguna de las diluciones presenta tres tubos positivos o porque no se hicieron diluciones más altas de aquellos que presentan tres tubos positivos seleccionar las tres últimas diluciones y anotar el número de tubos positivos en cada una, ejemplo:

Si las tres últimas diluciones positivas fueron 1:100, 1:1000 y 1:10000 y el número de tubos positivos en cada dilución fuera de 3, 1 y 0 respectivamente, el recuento se anota como: dilución 1:100 = 3, dil. 1:1000 = 1, dil. 1:10 000 = 0.

Buscar en la tabla del NMP y anotar el NMP, para este ejemplo la tabla indica un NMP de 43/100 ml. Para obtener el NMP de organismos coliformes se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{NMP de la tabla}}{100} \times \text{factor de dilución intermedio} = \text{NMP/g.}$$

7. Confirmar que los tubos son positivos de organismos coliformes transfiriendo un inoculum de cada tubo de caldo lauril sulfato triptosa a otro tubo de caldo lactosa bilis (2%) verde brillante, o sembrando en placas de agar eosina azul de metileno, o de agar Endo. Incubar durante 24 y 48 horas a 35 ± 1 °C y observar los tubos para confirmación, y si hay producción de gas se confirma la presencia de coliformes. En los medios sólidos de confirmación observar si hay colonias de coliformes típicas después de la incubación. En el agar de eosina azul de metileno las colonias de coliforme son negras o con el centro negro con la periferia transparente incolora, en el agar Endo las colonias son rojas rodeadas de un halo rojo.
8. Anotar el número de tubos confirmados como positivos de organismos coliformes en cada dilución.

METODO II

1. Preparar la muestra de alimento por uno de los procedimientos ya recomendados.
2. Pipetear 1 ml. de cada una de las diluciones de homogeneizado de alimento en cada tubo de caldo de MacConkey utilizando tres tubos por dilución.
3. Incubar los tubos a 37 ± 1 °C durante 24 y 48 horas.
4. Pasadas las 24 horas anotar los tubos que sean positivos de producción

de gas. Volver incubar los tubos gas negativos, durante 24 horas más.

5. Pasadas las 48 horas, anotar los tubos que muestren producción de gas. La formación de gas a las 24 o 48 horas de incubación se considera evidencia suficiente de la presencia de organismos coliformes.

METODO III

1. Homogenizar y preparar las diluciones de alimento por uno de los métodos recomendados.
2. Pipetear un mililitro de cada dilución del homogenizado de alimento en cada tubo de caldo lactosa bilis verde brillante, utilizando tres tubos por dilución, el volumen de medio es de 10 ml. en tubos de 150 por 15 mm. conteniendo tubos de fermentación de Durham invertidos (75 x 10 mm.).
3. Incubar los tubos a 35 - 37 °C durante 24 y 48 horas.
4. Pasadas las 24 horas, anotar los tubos que muestren producción de gas. Volver a incubar los tubos gas negativos durante 24 horas más.
5. Pasadas las 48 horas, anotar los tubos que muestren producción de gas.
6. Escoger tubos para las pruebas confirmatorias y para la determinación del NMP.
7. Confirmar que los tubos de caldo bilis verde brillante seleccionados son positivos de organismos coliformes, sembrando por estría una asa de cada uno de ellos en la superficie de una placa de agar bilis rojo violeta o de agar Endo. Incubar las placas invertidas a 35 - 37 °C y examinar las placas de agar bilis rojo violeta a las 24 horas la presencia de coliformes se ve confirmada por la formación de colonias rojo oscuras con diámetros mayores de 0.5 mm. Las cajas de agar Endo se examinan a las 48 horas y será positivo de coliformes si presenta colonias rojas rodeadas de un halo también rojo.
8. Anotar el número de tubos confirmados como positivos de coliformes en cada dilución.
9. Calcular el NMP de coliformes.

DETERMINACION DE ORGANISMOS COLIFORMES DE ORIGEN FECAL

Los siguientes métodos sirven para diferenciar con exactitud los coliformes de otro origen.

METODO I

1. Escoger tubos gas positivos de caldo lauril sulfato triptosa procedentes del método I sección sobre enumeración de coliformes.
2. Inocular un asa de caldo de los cultivos seleccionados en tubos de caldo E.C.
3. Incubar los tubos de caldo E.C. a $45.5^{\pm} 0.2$ °C y ver si son positivos de formación de gas a las 24 y a las 48 horas.
4. Se presume que los tubos de caldo E.C. que presentan gas son positivos también de organismos coliformes fecales.

NOTA: Los volúmenes en los tubos de caldo E.C. son de 10 ml. en tubos de 150 x 15 mm. conteniendo tubos de fermentación de Durham invertidos.

METODO II

1. Seleccionar tubos de caldo de MacConkey gas positivos del método II para la enumeración de coliformes.
2. Inocular un asa de caldo de cada tubo seleccionado y un tubo de caldo lactoso bilis verde brillante y en otro de agua de peptona (contenidos en tubos de 150 x 15 mm. en cantidad de 10 ml. y conteniendo tubos de fermentación de Durham invertidos).
3. Incubar los tubos sembrados a 44 ± 0.1 °C (se usa un baño de agua con agitación y con un mecanismo de regulación térmica).
4. Observar a las 24 y 48 horas de incubación si los tubos de caldo bilis lactosa verde brillante presentan gas.
5. Después de 24 horas de incubación pipetear una alícuota de 5 ml. de cada uno de los tubos de agua de peptona en un tubo de ensayo independiente y añadir 0.2 - 0.3 ml. del reactivo de indol. Agitar los tubos y dejarlos reposar 10 minutos. La prueba positiva de producción de indol se manifiesta por la coloración rojo oscura en la superficie de la capa de alcohol amílico; en la reacción negativa se conserva el color original del reactivo. Los cultivos gas positivos en caldo lactosa bilis verde brillante que produzcan indol en agua de peptona, pueden considerarse como positivos de coliformes fecales.

PRUEBAS DE IDENTIFICACION DE ORGANISMOS COLIFORMES: IMViC

En el análisis de los alimentos no es posible muchas veces llevar a cabo la confirmación de la presencia de *E. coli* más allá de las pruebas descritas anteriormente en la sección sobre determinación de coliformes de origen fecal. Pero en algunos casos puede llevarse a cabo la diferenciación del grupo coliforme en especies y variedades sobre la base de los resultados de cuatro pruebas denominadas colectivamente como "pruebas IMViC".

TECNICA

- a) Aislamiento y purificación de los cultivos.
1. Sembrar por estría en una placa individual de agar de eosina azul de metileno o de agar Endo, un asa de cada tubo de caldo gas positivo del método I (caldo E.C.) o del método II (caldo lactosa bilis verde brillante). Incubar las placas invertidas durante 24 horas a 37 - 35 °C.
 2. Tomar una colonia representativa (nucleada con un brillo metálico) de cada placa y sembrar en estría en una placa de agar nutritivo. Incubar la placa invertida durante 24 horas a 35 - 37 °C.
 3. Seleccionar las colonias y sembrar cada una en agar nutritivo inclinado y en caldo lactosado. Incubar durante 24 horas a 35-37°C.
 4. A partir de los cultivos gas positivos en caldo lactosado hacer un frotis y teñirlo por el método de Gram para confirmar la presencia de bacilos Gram-negativos no esporulados.
 5. Para inocular los medios IMViC, utilizar un asa de platino y hacer la siembra a partir de cultivos de 24 horas en agar nutritivo inclinado.
- b) Prueba del indol.
1. Inocular tubos de caldo triptona o de agua de peptona a partir de cultivos puros e incubar los tubos sembrados a 35 - 37 °C durante 24 horas.
 2. Añadir a cada tubo 0.2 - 0.3 ml. del reactivo de indol.
 3. Esperar 10 minutos y observar los resultados. Si aparece un color rojo oscuro en la superficie de la capa de alcohol amílico la prueba es positiva. Un color naranja indica probablemente la presencia de escatol y puede ser anotada como reacción ±.
- c) Prueba del rojo de metilo

1. Inocular tubos de caldo glucosa tamponado a partir de cultivos puros e incubar los tubos sembrados a 35 - 37 °C durante 5 días.
2. Pipetear 5 ml. de cada cultivo en tubos vacíos y añadir a cada tubo 5 gotas de la solución de rojo de metilo y agitar.
3. Anotar como positivo si aparece un color rojo bien definido y como negativo si el color es amarillo. Colores intermedios indican reacción dudosa.

Tabla del índice del NMP y límites de confianza a 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se utilizan tres alícuotas de 10 ml., tres de 1 ml. y tres de 0.1 ml.

Nº DE TUBOS POSITIVOS DE TOTAL DE			Índice de NMP/100 ml	Límite de Inferior	Confianza 95% Superior
3 DE 10 ml	3 DE 1 ml	3 DE 0.1 ml			
0	0	1	3	0.5	9
0	1	0	3	0.5	13
1	0	0	4	0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	49
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	386
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

d. Prueba de Voges-Proskauer

1. Inocular tubos de caldo glucosa tamponado de caldo sal glucosa peptona a partir de cultivos puros e incubarlos a 35 - 37 °C durante 48 horas.
2. Pipetear 1 ml. de cada cultivo en tubos vacíos y añadir a cada uno de ellos 0.6 ml. de solución de naftol y 0.2 ml. de solución de hidróxido potásico.
3. Agitar los tubos y dejarlos en reposo durante 2 - 4 horas. Observar los resultados. La aparición de un color rosa a carmesí será un resultado positivo.

El fundamento de esta prueba depende de la producción de acetilmetilcarbinol a partir de la glucosa. En presencia de un álcali este compuesto es oxidado a diacetilo y da una coloración rosada.

e. Prueba del citrato sódico

1. Inocular tubos de caldo citrato de Koser o de agar citrato de Simmons a partir de cultivos puros. Se recomienda inocular una pequeña cantidad del inoculum, ya que la transferencia de nutrientes junto con el inoculum puede interferir en la reacción.
2. Incubar el caldo citrato de Koser a 35 - 37 °C durante 72 - 96 horas y el agar citrato de Simmons a 35 - 37 °C durante 48 horas.
3. Anotar en ambos medios de cultivo como reacción positiva si el crecimiento es visible y negativo cuando no hay crecimiento.

El crecimiento se manifiesta por lo general por un cambio de color del medio de verde claro a azul.

En esta prueba se utiliza al citrato como única fuente de carbono.

Para *E. coli* la fórmula nemotécnica para estas pruebas es ++ - - ; para *E. aerógenes* - - + +.

ESTAFILOCOCOS

Existen varios métodos para el recuento de estafilococos en los alimentos, estos métodos difieren principalmente en el tipo de agentes selectivos utilizados, entre los que se encuentran concentraciones altas de cloruro de sodio, telurito sódico, cloruro de litio y la azida sódica.

Actualmente existe otro método que ha resultado bastante eficaz, consiste en un medio a base de yema de huevo y conteniendo uno o más de los agentes selectivos mencionados, el principio de la reacción que se efectúa en este medio para identificar a los Estafilococos patógenos, o sea a los *Staphylococcus aureus*, en la utilización de la lipovitellina, que es una lipoproteína presente en la yema de huevo, lo que se manifiesta por la aparición de áreas claras debajo y alrededor de las colonias. También aparecen en las zonas claras un precipitado blanco, que procede de la formación de sales de calcio y magnesio de los ácidos grasos liberados. A ambas características que se presentan en este medio por la presencia de *Staph. aureus* se le denomina "reacción en yema de huevo".

Entre los métodos para la identificación de estafilococos tenemos:

RECUESTO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS

METODO I

1. Preparar las muestras de alimento como ya se indicó en la sección para homogeneizado y dilución de alimentos.
2. Hacer placas de agar de Baird-Parker (15 ml. de medio por placa) secarlas en una estufa de desecación o en un incubador.
3. Pipetear 0.1 ml. del homogeneizado y de sus diluciones en la superficie de placas individuales, y distribuir cada inóculo con un extendedor de vidrio estéril, hasta que la superficie aparezca seca. Hacer dos placas por dilución.
4. Incubar las placas invertidas a 37 ± 1 °C durante 24 y 48 horas.
5. Después de las 24 horas de incubación, escoger las placas que presenten entre 30-300 colonias aisladas, y contar las colonias negras brillantes con bordes reducidos blancos y que aparezcan rodeadas de zonas claras que contrastan con el medio opaco. Estas colonias corresponden a *Staph. aureus*.
6. Marcar la posición de estas colonias e incubar las placas otras 24 horas.

7. Contar las colonias que presenten el aspecto mencionado y someterlas a la prueba de la coagulasa. Si el número de colonias es grande de someter a la prueba de la coagulasa un número significativo de ellas (la raíz cuadrada del total).
8. A las 48 horas de incubación contar las colonias rodeadas de zonas opacas y someterlas a la prueba de la coagulasa. Así pueden distinguirse estos cultivos (coagulasa positivos) de las cepas de *Staph. epidermidis* (coagulasa negativas) que pueden presentar un aspecto semejante.
9. Sumar el número de colonias que presentaron zonas claras a las 24 horas de incubación y las que fueron coagulasa positivas como se indicó en el inciso 7 y 8 y calcular por las diluciones correspondientes al número total de estafilococos coagulasa positivos.

NOTA: Más del 90% de los estafilococos coagulasa positivos forman colonias características después de la incubación a 37°C durante 24 - 26 horas; es importante leer los resultados en el tiempo que se especifica y no antes. Un 5 a 7% de estafilococos coagulasa positivos presenta la zona clara característica a menudo con una zona opaca interna después de las 48 horas de incubación en cuyo momento los estafilococos coagulasa negativos pueden presentar el mismo aspecto.

METODO II

1. Preparar las muestras de alimento
2. Inocular tubos de caldo tripticasa soja (10% de NaCl) con alícuotas de un mililitro de las diluciones del homogenizado. La dilución máxima de la muestra debe ser suficientemente grande para que se proporcione resultados negativos al menos en una dilución.
3. Incubar los tubos a 35 - 37 °C durante 48 horas.
4. Utilizando un asa de inoculación con anillo de 3 mm. transferir un asa de cada tubo inoculado a una placa de agar Vogel-Johnson y sembrar por estría procurando que se tengan colonias aisladas.
5. Incubar las placas a 35 - 37 °C durante 48 horas \pm 2.
6. Seleccionar al menos una colonia de cada tipo de colonias claramente diferentes, que haya reducido el telurito, de todas las diluciones ensayadas y efectuar la prueba de la coagulasa.
7. Calcular el número de estafilococos coagulasa positivos en la mues

tra original de alimentos a partir de la dilución más alta.

METODO III

1. Preparar la muestra de alimento.
2. Preparar placas de agar, yema de huevo, azida y secarlas como ya se indicó.
3. Pipetear 0.2 ml. del homogeneizado y de las diluciones de la muestra en placas y distribuir el inóculo con un extendedor de vidrio; continuar el proceso de distribución del inóculo hasta que aparezca seca la superficie del agar.
4. Incubar las placas en posición invertida a 37 °C durante 24 y 48 horas. Después de 24 horas las colonias de estafilococos están rodeadas de zonas claras con escaso o nulo precipitado granular blanco. A las 48 horas los halos son mayores y presentan un precipitado granular blanco, debido a las sales cálcicas de los ácidos grasos.
5. Contar todas las colonias que presenten las características mencionadas en las placas que presenten entre 30 y 300 colonias.
6. Someter estas colonias o un número significativo de ellas a la prueba de la coagulasa.
7. Calcular el número total de estafilococos coagulasa positiva en la muestra teniendo en cuenta la proporción de colonias que fueron coagulasa positiva y la dilución.

METODO IV

Este método incluye las técnicas para la siembra en placa directa y previo enriquecimiento.

a) Siembra directa en placa.

1. Homogeneizar y diluir la muestra de alimento.
2. Para determinar el número total de microorganismos, pipetear 0.1 ml del homogeneizado de alimento y de sus diluciones en placas de agar leche sal secas. Distribuir el inóculo de vidrio hasta que la superficie de agar aparezca seca.
3. Incubar las placas a 37°C durante 24 y 48 horas.
4. Después de 24 horas, escoger las placas que presenten entre 30 y

300 colonias y contar las que están rodeadas de una zona clara.

5. Marcar la posición de estas colonias y volver a incubar las placas otras 24 horas, contar las colonias típicas que se forman durante este período de incubación sumarlas al número de colonias contado el primer período.
6. Elegir un número significativo de colonias típicas en las placas utilizadas para el recuento y sembrar estas colonias en tubos de agar nutritivo inclinado, incubar a 37 °C durante 24 horas.
7. Hacer frotis a partir de estos cultivos y teñirlos por el método de Gram.
8. Examinar al microscopio los frotis para ver si son Gram positivos, si es así someterlos a las siguientes pruebas:

A. Prueba de la coagulasa.

B. Reacción de la lipasa:

Sembrar por estría en una placa de agar yema de huevo sal, previamente secada, con un asa procedente de un cultivo de 24 horas, e incubar a 37 ± 1 °C durante 24 horas. Los estafilococos son lecitinasa positivos y aclaran el medio que rodean las colonias.

C. Prueba de la hemólisis:

Sembrar por estría una placa de agar sangre, previamente se cada con un asa procedente de un cultivo de 24 horas e incubar 37 ± 1 °C durante 24 horas. Los estafilococos productores de enterotoxina son, por lo general hemolíticos.

- 9) Calcular el número total de estafilococos presentes en la muestra original de alimento a partir de la dilución más alta que presente estafilococos coagulasa positivos. Por lo general estas cepas, son lipasa positivas y tienen propiedades hemolíticas.

b.) Siembra en placa previo enriquecimiento.

Si se va a determinar la presencia o ausencia de estafilococos coagulasa positivos en donde se cree que el número es mínimo, se efectúa simultáneamente con la siembra directa en placa anteriormente descrita, el enriquecimiento previo de las muestras antes de su siembra en placa por el siguiente procedimiento.

1. Pipetear 1 ml. del homogenizado original (dilución 1:10) en un tubo de cada uno de los siguientes caldos de enriquecimiento: caldo sal 6.5%, caldo sal 10% caldo glucosado. Incubar los tu-

bos a 37 ± 1 °C durante 24 horas.

2. A partir de cada cultivo en caldo, sembrar en estría, un asa en placas independientes, previamente secada de agar leche sal, sembrar del mismo modo en agar sangre, incubar a 37 ± 1 °C durante 24 horas.
3. Seleccionar varias colonias sospechosas y sembrarlas en tubos de agar nutritivo inclinado, incubar a 37 ± 1 °C durante 24 horas.
4. Someter estos cultivos a las pruebas coagulasa, reacción de la lipasa y prueba de la emólisis.

METODO V

1. Preparar placas de agar yema de huevo telurito polimixina y secarlas.
2. Homogenizar y diluir las muestras de alimento.
3. Pipetear 0.1 ml. del homogenizado y de las diluciones del alimento en placas, y extender cada inóculo con un distribuidor de vidrio, hasta que aparezca seca la superficie del medio.
4. Incubar las placas en posición invertida a 35 - 37 °C durante 24 y 48 horas. Examinar a las 24 horas, las colonias de estafilococos tienen un diámetro de 1 - 1.5 mm., su color es negro azulado o verde oscuro y presentan uno o más de los tres tipos de reacción en yema de huevo siguientes:
 - a) Una zona discreta de yema de huevo precipitada alrededor y debajo de las colonias.
 - b) Una zona clara o halo frecuentemente con precipitación de la yema de huevo debajo de las colonias.
 - c) Ausencia de la zona de precipitación o del halo, pero con precipitación visible debajo de las colonias. La reacción en yema de huevo se aprecia mejor a las 48 horas de incubación.
5. Hacer el recuento de las colonias de color negro que presenten reacciones típicas de precipitación, escoger las placas que tenga entre 30 y 300 colonias.
6. Someter estas colonias o un número significativo a la prueba de la producción de coagulasa.

7. Calcular el número de estafilococos coagulasa positivos por gramo de la muestra de alimento, teniendo en cuenta el porcentaje de colonias seleccionadas que han dado positiva la prueba de la coagulasa.

Otro método que se utiliza para llevar a cabo la identificación de estafilococos es sembrar un inóculo procedente de un caldo de enriquecimiento en placas de medio 110 para estafilococos.

El medio 110 para estafilococos es selectivo para el aislamiento e investigación de estafilococos; contiene gelatina y manitol para seleccionar los organismos capaces de atacar estas sustancias.

Técnica:

1. Homogenizar y diluir la muestra de alimento.
2. Se inocular una cantidad de la muestra en un medio de enriquecimiento que puede ser medio de infusión Cerebro-Corazón.
3. Se incuba a 30 °C durante 24 horas.
4. Se estría y frota un inóculo y se incuba a 30 °C durante 48 horas, se seleccionan las colonias pigmentadas amarillas con aspecto brillante para ser tinción de Gram, y reacciones de coagulación así como para pruebas de hemólisis.
5. Se agregan unas gotas de azul de bromotinol en las áreas que dejan las colonias al ser seleccionadas, se puede apreciar la fermentación del manitol.
6. Las placas se pueden incubar con 5 ml. de una solución acuosa saturada de sulfato de amonio e incubarlas durante 10 minutos para apreciar la hidrólisis de la gelatina observando las zonas claras.

PRUEBA PARA LA PRODUCCION DE COAGULASA:

1. Hacer subcultivos a partir de las colonias seleccionadas en caldo infusión de cerebro y corazón, e incubar durante 20 - 24 horas a 35-37 °C.
2. Añadir 0.1 ml. de los cultivos resultantes a 0.3 ml. de plasma de conejo en tubos pequeños e incubar a 35 - 37 °C.
3. A las 4 horas, examinar los tubos para ver si el medio aparece coagulado y, en caso negativo, también pasadas las 24 horas de incubación. La formación de un coágulo bien visible es demostrativa de producción de coagulasa. La puntuación para el grado de la reacción es:

Negativo = ningún signo de formación de fibrina

1 + = pequeño coágulo no organizado

2 + = pequeño coágulo organizado

3 + = gram coágulo organizado

4 + = todo el contenido parece coagulado y se mantiene, aún cuando se invierte el tubo.

Solamente la puntuación 2 + o una mayor se considera como evidencia positiva de producción de coagulasa.

La reacción en tubo se hace para confirmar la reacción en placa, o cuando la reacción en placa es negativa.

Reacción en placa:

Un porta objetos se emulsionan una o dos colonias en una gota de agua, si no se produce el agrupamiento en 10 a 20 segundos, se moja un alambre recto en plasma humano o de conejo y se agita la suspensión bacteriana con ella. *Staphylococcus aureus* aglutina, determinándose el agrupamiento visible en 10 segundos.

Se hace la observación de emplear agua en lugar de solución salina, ya que algunos estafilococos son sensibles a la sal, especialmente si se han cultivado en medios salados. Debe evitarse el exceso de plasma, ya que puede dar reacciones positivas falsas. También deben de incluirse patrones conocidos de estafilococos coagulasa positivos y negativos.

La prueba en placa detecta la coagulasa "conjugada" que actúa directamente sobre el fibrinógeno. La prueba en tubo detecta la coagulasa "libre" que actúa sobre el fibrinógeno en composición con otros factores existentes en el plasma. Pueden hallarse presentes uno o ambos tipos de coagulasa.

CAPITULO V

GENERALIDADES SOBRE LOS MICROORGANISMOS ESTUDIADOS EN ESTE TRABAJO:
COLIFORMES, ESCHERICHIA COLI, ESTAFILOCOCOS

COLIFORMES

Los coliformes pertenecen a la familia de las Enterobacterias, según la clasificación propuesta por Ewing la clasificación de la enterobacterias es la siguiente:

Enterobacteriaceas:

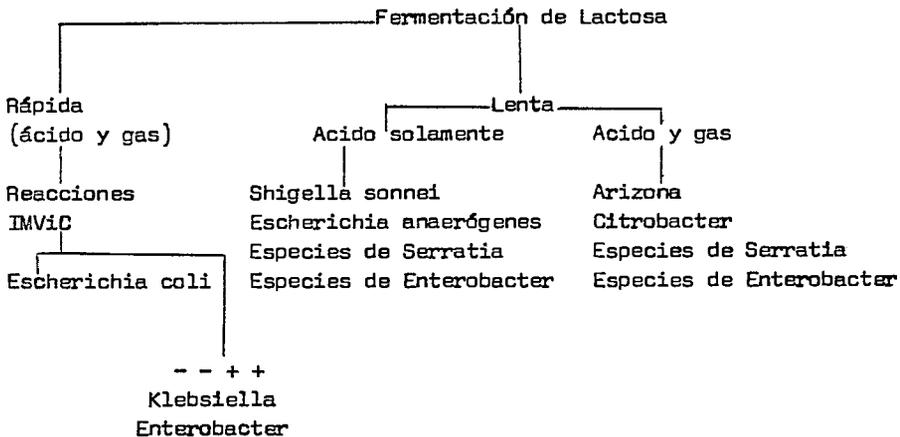
Orden	IV	Eubacteriales
Familia	IV	Enterobactericeae
Tribu	I	Escherichieae
Género	I	Escherichia
Género	II	Shigella
Tribu	II	Edwardsiellae
Género	I	Edwardsiella
Tribu	III	Salmonelleae
Género	I	Salmonella
Género	II	Arizona
Género	III	Citrobacter
Tribu	IV	Klebsielleae
Género	I	Klebsiella
Género	II	Enterobacter
Género	III	Pectobacterium
Género	IV	Serratia
Tribu	V'	Proteae
Género	I	Proteus
Género	II	Providencia

Las Enterobacteriaceas se encuentran en el intestino del hombre y otros animales, en el suelo y en las plantas. Muchos son parásitos, otros saprófitos, muchas especies son patógenas para el hombre, y producen en fermedades intestinales e infecciones septicémicas.

La diferenciación y caracterización de los bacilos entéricos, se basan en una variedad de reacciones bioquímicas y de cultivo así como de su estructura antigénica. Una diferenciación primaria útil puede basarse en la fermentación de la lactosa, que se relaciona de manera apropiada con la patogenicidad. Las bacterias coliformes fermenta este carbohidrato con rapidez formando ácido y gas en 24 horas, en tanto que los ba cilos de otros grupos, fundamentalmente patógenos (Shigella y Salmonella) no lo fermentan. Esta diferenciación no es definitiva, ya que los bacilos paracólicos y algunos de la disentería, fermentan lentamente la lactosa.

Para lograr una diferenciación entre las enterobacterias, se hace uso de sus características bioquímicas, tanto en la composición de los medios que se hacen selectivos por inclusión de sales biliares, y diferenciales por azúcares e indicadores, como mediante pruebas bioquímicas específicas.

En general los miembros de la familia Enterobacteriaceae son bastoncillos rectos, gramnegativos, algunos de ellos móviles y otros no. Las especies móviles poseen flagelos peritricos. Algunas cepas de *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Proteus* poseen fibrillas, estas fibrillas no son órganos de locomoción, son más pequeños que los flagelos y no se les considera antigénicos.



BACILOS COLIFORMES

Los bacilos coliformes se describieron en 1886 como *Bacterias coli commune* y *Bacterias Lactis aerógenes*. El primero se presenta en dos tipos fermentativos, *Bacteria coli communior* que fermenta la sacarosa, y *Bacteria coli communis* que no lo hace. El otro tipo es *Bacteria coli anaerógenes*, que fermenta los azúcares sin producir gas. En la actualidad se usan los nombres genéricos de *Escherichia* y *aerobacter*.

El grupo coliforme se define como: todos los bacilos aerobios y anaerobios facultativos, gramnegativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a 35 - 37 °C en menos de 48 horas.

Las bacterias coliformes se encuentran ampliamente distribuidas, ya que se presentan universalmente en el intestino del hombre y de muchos animales superiores.

Los bacilos coliformes muestran considerables variaciones de morfología.

Varían de 2 a 4 micras de longitud, por 0.4 a 0.7 micras de ancho. Frecuentemente se encuentran formas muy cortas, ovales parecidos a cocos. Eventualmente se pueden encontrar bacilos en pares o cadenas cortas, algunas variedades son encapsuladas sobre todo las que se encuentran en procesos patológicos. La movilidad es variable, aunque las cepas más típicas son móviles y poseen flagelos peritricos. No forman esporas; se tiñen fácilmente con colorantes ordinarios de anilina y son gramnegativos.

Aspecto de las colonias. En gelatina nutritiva las colonias de coliformes son consistentes y de aspecto característico que las de agar. Son opacas o parcialmente transparentes, lisas húmedas y de consistencia homogénea, con bordes enteros u ondulantes con aspecto de hoja de arce. En agar, las colonias típicas son opacas y grisáceas, tienden a tomar color pardo amarillento si se continúa la incubación. En medios diferenciales las colonias de bacilos coliformes pueden presentar otras características típicas. En Endo agar las colonias son rojas con brillo metálico característico a la luz reflejada. En agar-sangre, algunas variedades son beta hemolíticas, estos tipos se encuentran con mayor frecuencia en procesos patológicos en el intestino normal.

Crecimiento de coliformes. Al igual que las bacterias gramnegativas no patógenas, los coliformes crecen bien sobre muchos medios y alimentos. Crecen a temperaturas entre 10 y 46 °C siendo satisfactorio entre 20 y 40 °C y óptimo a 37 °C y dentro de un amplio margen pH entre 4.4 y 9.0. Crecen en presencia de sales biliares que inhiben a las bacterias grampositivas. A diferencia de la mayoría de las bacterias fermentan la lactosa con producción de gas, la incorporación de glucosa y de sales biliares a los medios de cultivo hace posible su diferenciación de otros microorganismos.

Los bacilos coliformes son anaerobios facultativos, crecen bien en condiciones aerobias o anaerobiosis completa.

Distribución de los coliformes. Los coliformes se encuentran en el tracto intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente. Es importante diferenciar los organismos de los paracolon existentes en el tracto intestinal, caracterizándose este grupo por la fermentación tardía del caldo lactosado, raramente antes de las 72 horas, aunque comúnmente los paracolon no se consideran coliformes, se encuentran en el tracto intestinal y pueden indicar contaminación fecal.

ESTRUCTURA ANTIGENICA, PATOGENIA Y PATOLOGIA

Los organismos coliformes tienen una estructura antigénica muy compleja, se clasifican por sus antígenos O somáticos termostables, de estos existen 120 diferentes; por sus antígenos K capsulares termolábiles y por

sus antígenos H flagelares.

Muchos microorganismos gramnegativos producen sustancias bactericidas del tipo de los antibióticos producidas por algunas cepas de bacterias activas contra otras cepas de la misma especie u otra relacionada, estas sustancias son colicinas y piocinas siendo la primera producida por los microorganismos coliformes.

Las bacterias coliformes constituyen una gran parte de la flora normal aerobia del intestino, en él estos microorganismos no provocan enfermedad por lo general, incluso pueden contribuir al funcionamiento normal y a la nutrición. Se transforman en patógenos solamente cuando alcanzan tejidos fuera del intestino, particularmente de las vías urinarias, las vías biliares, los pulmones, el peritoneo o las meninges, provocan inflamaciones en estos sitios. En la infancia y en la vejez o en esta dios terminales de otras enfermedades, cuando las defensas normales del huésped son insuficientes las bacterias coliformes pueden alcanzar la corriente sanguínea y provocar septicemias.

ESCHERICHIA COLI

Familia: Enterobacteriaceae,
Género: Escherichia,
Especie: Escherichia coli

Este colibacilo es la especie tipo de un grupo de bacterias denominadas gérmenes coliformes. Es habitante del tubo digestivo del hombre y de los animales normales. De preferencia se encuentra en el intestino grueso, pero se ha demostrado que se encuentra también en el 45% de las bocas de los individuos normales.

El colibacilo logra penetrar en el intestino poco después del nacimiento y persiste en este sitio durante toda la vida del individuo. Se encuentra en grandes cantidades en la región de la válvula elicoidal y disminuye en número hacia el duodeno y recto.

Se cree que los colibacilos tienen una función útil en el organismo, impidiendo el desarrollo de ciertos microorganismos proteolíticos normalmente presentes en el intestino; además sintetizan cantidades apreciables de vitaminas.

Morfología. E. coli, es un bacilo corto, grueso de 0.4 a 0.7 micras de grosor y 1 a 4 micras de longitud. Puede adoptar aspecto filamentosos. La mayoría de las cepas de E. coli son móviles.

Características de cultivo. E. coli es anaerobio facultativo, y también aerobio, se desarrolla rápidamente en 24 horas en todos los medios usuales a temperaturas entre 20 y 40 °C, E. coli puede crecer en medios que

contienen glucosa, como única fuente de carbono orgánico y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ como fuente de nitrógeno, junto con otros minerales.

En placas de agar las colonias superficiales aparecen en 12 o 24 horas, alcanzan un tamaño de 2 a 3 mm. Se presenta variación considerable en el aspecto individual de las colonias. La colonia típica es poco elevada, convexa, lisa e incolora, un poco opaca, y con borde entero. Otras colonias son menores y la forma de cápsula es más acentuada, algunas solamente producen una colonia típica en forma de vid.

En agar-sangre se produce decoloración en el medio alrededor de la colonia, y algunas cepas producen beta-hemolisis.

En el medio de Endo agar, y en el de eosina azul de metileno, las colonias de *E. coli* tienen brillo metálico que se puede observar a la luz refleja.

En caldo se produce enturbiamiento homogéneo en 12 o 24 horas y en 24 a 48 horas tiene lugar la formación de una ligera película, acumulándose un depósito viscoso en el fondo del tubo. Forma generalmente indol en caldo peptona pero no licúa la gelatina. En caldo bilis 2% verde brillante forma gas y decoloración del medio con producción de ácido a las 24 horas.

E. coli fermenta la lactosa, maltosa y otros azúcares con producción de ácido y gas. Los cultivos de coliformes se caracterizan por su olor fétido, semejante al de las heces diluidas. El ácido formado por la fermentación de los carbohidratos es principalmente el ácido láctico, con pequeñas cantidades de ácido fórmico y acético. También se produce bióxido de carbono e hidrógeno. *E. coli* forma catalasa y sintetiza las vitaminas del complejo B; los bacilos vivos producen una sustancia fibrinolítica.

Propiedades biológicas. Tiene una gran vitalidad, en los cultivos de resiembras positivas después de varios meses. Conserva bien la vitalidad en el suelo, es resistente a los agentes exteriores. La mayor parte de las cepas mueren en 15 a 20 minutos a temperaturas de 60 °C, pero algunos sobreviven al proceso de pasteurización.

Las toxinas del colibacilo no son aún bien conocidas, pero poseen una toxina neurotrópa, ya que los cultivos filtrados inyectados por vía sanguínea a conejos, determinan fenómenos nerviosos, presentando convulsiones y contracciones tetaniformes, también se ha demostrado la presencia de lesiones de enteritis hemorrágica. En ciertas condiciones se forma también una hemolisina denominada colilysina.

Estructura antigénica. Se han identificado 201 cepas de colibacilos,

y existen 31 cepas

El colibacilo posee un antígeno somático complejo glúcido lipídico, termorresistente; un antígeno flagelar específico, termolábil presente en las cepas móviles. En condiciones normales puede desarrollar una serie de antígenos de "cubierta" denominado antígeno K y envuelve por completo al bacilo, éste antígeno K está compuesto de tres fracciones L, A y B, y pueden encontrarse por separado, en dos o las tres en las diferentes cepas, el número total de componentes antígenicos de E. Coli son 149 antígenos O y 46 antígenos H.

El tipo serológico específico depende de tres clases de antígenos:

1. Antígenos somáticos O, que no se inactivan por el calor de 100 °C.
2. Antígenos somáticos K, que se encuentran dispuestos como una cubierta de envoltura o como cápsula que enmascara a los antígenos O, e inhiben la aglutinación, los cuales son inactivados por el calor de 100 a 121 °C.
3. Los antígenos H o flagelares que se inactivan por el calor de 100°C.

Antígeno I, es un antígeno de cubierta, termolábil, fácilmente hidrolizable por el HCl N. Hemolítico para los glóbulos rojos de caballo, fuertemente patógeno y necronizante.

Antígeno A, termoestable, resistente a la acción del HCl N, durante 2 a 24 horas no es patógeno para el ratón y no es necronizante.

Antígeno B, se encuentra en todas las cepas de E. coli productoras de cuadros intestinales agudos. Es termolábil.

Además de los antígenos O, K y H, se ha demostrado la presencia de antígenos fibrilares, que no son específicos como los anteriores, pero que tienen la capacidad de aglutinar a los eritrocitos.

Hasta hace poco tiempo se ha subestimado la importancia de Escherichia coli como agente etiológico de enfermedad, de la que puede producir tres tipos:

1. Estos organismos son la causa más importante de pulmonofritis, y pueden producir abscesos en los órganos internos, septicemia, endocarditis y meningitis, lesiones de las vías biliares o de los órganos genitales, o supuración de las vías urinarias. Los síntomas clínicos son parecidos a los de la fiebre tifoidea, como son, anorexia, meteorismo, diarrea, asteria, insomnio, hipertrofia del bazo y fiebre continua que puede durar dos semanas.

2. Ciertos serotipos producen en los niños una diarrea epidémica grave y a veces mortal.
3. Son la causa de la diarrea de verano esporádica no epidémica, en niños de 2 a 3 años de edad.

El colibacilo encontrado en las lesiones o en las heces fecales de los humanos, presenta un poder patógeno evidente, pero muy variable para los animales de laboratorio. Las cepas aisladas del intestino de individuos normales, se muestra inofensiva pero las que proceden de procesos patológicos y las del intestino de individuos enfermos se muestran virulentas.

Por ingestión los colibacilos no producen trastorno alguno por vía subcutánea producen un absceso local, si es muy virulento produce una septicemia. Por inoculación intraperitoneal determinan una peritonitis mortal. Y por vía intravenosa producen los mismos síntomas que por vía subcutánea pero más constante.

En las localizaciones extraintestinales el colibacilo se comporta como germen piógeno produciendo afecciones supuradas.

ESTAFILOCOCOS

Familia: Micrococaceae.

Géneros: Staphylococcus, Micrococcus, Gaffkya, Sarcina, Methanococcus y Peptococcus.

Esta es la clasificación dada por Bergey, es la más general, ya que existen varias clasificaciones de los micrococcus.

Robert Koch en 1878 fue el primero que identificó a los estafilococos en el pus humano. Dos años más tarde Pasteur logró cultivar a estos microorganismos en un medio líquido, en el siguiente año, Ogston demostró la patogenicidad de los estafilococos para los ratones y conejillos de indias. En 1884 Rosenbach describió dos especies: Staphylococcus (pyogenes) aureus y Staphylococcus (pyogenes) albus. Los cuales en la actualidad se les ha clasificado en un género aparte (Staphylococcus) de la Familia Micrococaceae.

En 1930, Julianelle introdujo la primera clasificación de Staphylococcus, basada en las diferencias en la estructura antigénica, y en 1942 Fisk, desarrolló el método de tipificación de bacteriófagos.

Morfología, tinción, características de cultivo, patogenicidad:

Staphylococcus, son organismos no esporulados, inmóviles, esféricos, gram positivos generalmente agrupados en racimos irregulares. Crecen con fa-

cilidad en diversos medios de cultivo, y son metabólicamente muy activos. Miden de 0.7 a 1.2 micras de diámetro, son aerobios facultativos, que se desarrollan bien en una atmósfera de hidrógeno, pero el desarrollo más característico se lleva a cabo en condiciones aerobias. El pH óptimo de desarrollo es de 7.4, la temperatura óptima de desarrollo es a los 35 °C, aunque lo hace bien a los 37 °C, puede desarrollarse a temperaturas tan bajas 15 °C y tan altas como 40 °C.

Los estafilococos crecen bien en medios de extracto de carne, infusión de carne, en agar nutritivo; las colonias en medios sólidos son redondas, lisas, elevadas, brillantes y forman diversos pigmentos: amarillo dorado intenso por *Staphylococcus aureus*; blanco aporcelanado por *Staphylococcus albus*. En placas de agar-sangre, las colonias son más grandes, algunas variedades están rodeadas por zonas de hemólisis.

Los estafilococos se pueden cultivar en medios sintéticos si se incluyen tiamina y ácido nicotínico y el uracilo son necesarios para el desarrollo anaeróbico.

Por lo general las cepas patógenas fermentan el manitol, y todos fermentan los azúcares simples sin formar gas, decoloran el tornasol, azul de metileno, reducen los nitratos a nitritos y no forman indol en agua de peptona.

Para identificar a los estafilococos patógenos de los no patógenos se efectúa la prueba de la coagulasa, es necesario hacer subcultivos, ya que si se utilizan colonias de los medios anteriormente descritos pueden obtenerse resultados falsos negativos.

Los estafilococos son microorganismos relativamente resistentes al calor y a la desecación, resisten temperaturas hasta de 50 °C, por espacio de media hora, crecen en presencia de sal a concentraciones altas, hasta el 9% de cloruro de sodio, esta propiedad se aprovecha en la preparación de medios selectivos para aislar a los microorganismos.

Tienen alta tolerancia frente a compuestos como el telurito, cloruro mercúrico, neomicina, polimixina y azida sódica, que también se utilizan en la preparación de medios selectivos, sin embargo es altamente susceptible a la acción bactericida de ciertos colorantes básicos, por ejemplo el violeta de genciana en concentraciones de 1:100,000 a 1:2,000,000. La sensibilidad a las sulfonamidas y a los antibióticos es muy variable, existen mutantes resistentes a los agentes quimioterápicos en la mayoría de las cepas de estafilococos. Muchas cepas producen una enzima lactamasa, que es una penicilinasas que inhibe la acción de la penicilina rompiendo el anillo lactámico, dando origen al ácido peniciloico, el cual está desprovisto de actividad antibacteriana. También son más resistentes que otras bacterias a la acción del fenol y cloruro mercúrico.

Producción de enzimas y toxinas. Los estafilococos pueden producir enfermedad, ya sea por su capacidad de multiplicarse, así como por la producción de diversas sustancias extracelulares.

Cuando crecen en medios artificiales los estafilococos patógenos, liberan diferentes exotoxinas; se ha señalado que estas toxinas ya aparecen en cultivos de 6 horas de edad y aumentan proporcionalmente en la fase estacionaria. La producción de toxinas está favorecida por las condiciones de pH, temperatura, etc. que sean óptimas para el desarrollo.

Exotoxina, es un material filtrable y termolábil, produce hemólisis que puede ser alfa, esta hemolisina es una proteína de peso molecular de 3×10^4 daltones, actúa sobre los eritrocitos de conejo, lesiona a las plaquetas. También tiene una acción poderosa sobre el músculo de vasos sanguíneos. Existen otras hemolisinas que son beta hemolisina, gamma hemolisina y actualmente se ha incluido una quinta, la epsilon.

Enterotoxina. Las enterotoxinas estafilocócicas son las pocas toxinas bacterianas de naturaleza proteica que son resistentes al calor. Las enterotoxinas A, B, C, son proteínas simples, que por hidrólisis producen 18 aminoácidos, entre los más abundantes, el ácido aspártico, ác. glutámico, lisina y valina, en estado activo las enterotoxinas son resistentes a las enzimas proteolíticas, tales como la tripsina, quimiotripsina, renina, papaína; sin embargo son sensibles a la pepsina a pH de 2; los cuatro tipos de enterotoxinas, tienen aproximadamente la misma potencia, aunque tengan ciertas propiedades físicoquímicas que las diferencian.

Entre otras sustancias elaboradas por los estafilococos tenemos:

Enzimas lipolíticas, las cuales rinden la resistencia de la piel, resistencia que es proporcionada por los lípidos y que ejercen una acción bactericida.

Leucocidina, es una enzima soluble producida por muchos estafilococos patógenos, está compuesta de dos proteínas electropotencialmente separables, F y S, ambas son antigénicas. Es letal para los leucocitos de diversas especies animales.

Coagulasa, enzima producida por las cepas patógenas de estafilococos, tiene la propiedad de coagular el plasma citratado u oxalatado en presencia de un factor contenido en muchos sueros el mecanismo en donde el suero reacciona con la coagulasa, es similar a la activación de la protrombina a trombina. La coagulasa puede depositar fibrina en la superficie de los estafilococos, y de esta manera tal vez interfiera en la fagocitosis, o destruya a las células fagocitarias una vez dentro

de ellas. Alternativamente la coagulasa puede neutralizar un factor antiestafilocócico del plasma.

La mayoría de los estafilococos coagulasa positivos producen una enzima fib-rinolítica, la estafiloquinasa, la cual tiene la capacidad de poder disolver los coágulos de fibrina del plasma de diversas especies de animales, es una enzima relativamente estable al calor y es antigénica.

Otras sustancias extracelulares producidas por los estafilococos son, hialuronidasa o factor de propagación.

Estructura antigénica.

Los estafilococos están formados por polisacáridos, proteínas, que le proporcionan una estructura antigénica.

Todos los péptidos de la pared celular de las bacterias tienen una estructura común, que es una red de cadenas de poli-N acetilhexosamina, entrelazadas por puentes transversales de péptidos con cadenas, las cadenas del polisacárido constan de residuos alternantes de N-acetil glucosamina y ácido N acetilmurámico unidos por enlaces 8-1-4, la fracción peptídica consta de péptidos cortos de L-alanina, D-alanina, ácido D-glutámico, y N-acetilmurámico, unidos por enlaces de amida a la L-alanina N terminal de las subunidades peptídicas.

Los péptidos que sirven de puente ligan a la D-alanina, C terminal de una subunidad peptídica con el grupo E-amino de la L-lisina de un segundo péptido.

Patogenia, Los estafilococos patógenos, generalmente son hemolíticos y coagulan el plasma, algunos son miembros de la flora normal de la piel y mucosas del hombre, estos no son considerados como patógenos; pero otros pueden causar supuraciones, formación de abscesos, diversas infecciones piógenas, y hasta septicemias mortales. Una de sus toxinas es causante de los envenenamientos producidos por los alimentos. Los estafilococos pueden ser los organismos causales de neumonías, meningitis, endocarditis y supuraciones en cualquier órgano.

Los estafilococos desarrollan rápidamente cepas resistentes a los agentes antimicrobianos, por lo tanto son microorganismos difíciles de combatir.

En el hombre el reservorio principal de estafilococos es la nariz, a partir de aquí, estos microorganismos llegan directa o indirectamente a la piel y heridas, aunque el número de portadores nasales varía, es aproximadamente de un 50% en los adultos y a veces esta cifra es superior en los niños. Los brazos, manos y cara son las partes de la piel

más comúnmente afectadas, además puede encontrarse en los ojos, garganta y tracto intestinal. A partir de esta fuente los estafilococos llegan a través del aire y polvo a los vestidos y otras partes, contaminándose también los alimentos. Los síntomas de toxiinfección alimentaria estafilocócica son, una gastroenteritis con diarrea y vómitos profusos que a veces reviste gran variedad.

RESULTADO DE LAS PRUEBAS REALIZADAS EN EL LABORATORIO

A continuación se presentan tablas donde aparecen los resultados de las determinaciones realizadas.

Muestra	C.B.T. Col./g	N.M.P.	Grupo Colifor- me	E.coli	Estaf.	Coagu- lase Positiva	Estrepto- cocos
Camarones							
1	Incontables	930	+	+	+	+	-
2	Incontables	430	+	+	+	+	-
3	Incontables	4600	-	-	+	+	-
4	95.000	210	+	+	+	+	-
5	64.000	750	+	+	+	-	-
6	70.000	430	-	-	-	-	-
7	820.000	750	-	-	+	+	+
8	Incontables	2400	+	+	+	+	-
9	Incontables	230	+	+	-	-	-
10	17.000	930	+	+	-	-	-
11	Incontables	430	+	+	-	-	-
12	Incontables	2100	+	+	+	-	-
13	80.000	4600	+	+	-	-	-
14	20.000	930	-	-	+	+	+

MUESTRA	C.B.T. Col./g.	N.M.P.	Grupo Coliforme	E.coli	Estaf.	Coagu- lasea Positiva	Estrepto- cocos
15	360.000	390	+	+	-	-	-
16	200.000	2.400	+	+	+	+	+
17	350.000	430	+	+	+	-	-
18	400.000	2400	+	+	+	+	+
19	300.000	2400	+	+	-	-	-
20	230.000	2100	+	+	+	+	-
21	Negativo	Negativo	-	-	-	-	-
22	Negativo	Negativo	-	-	-	-	-
23	Negativo	Negativo	-	-	-	-	-
24	Negativo	Negativo	-	-	-	-	-
25	Negativo	Negativo	-	-	-	-	-
26	Negativo	Negativo	-	-	-	-	-
27	Negativo	Negativo	-	-	-	-	-
28	Negativo	Negativo	-	-	-	-	-
29	Negativo	Negativo	-	-	-	-	-
30	Negativo	Negativo	-	-	-	-	-
31	260.000	430	+	+	+	+	-
32	74.000	200	+	+	+	+	-
33	210.000	900	+	+	+	+	+

MUESTRA	C.B.T. Col./g.	N.M.P.	Grupo Coliforme	E.coli	Estaf.	Coagu- lase Positiva	Estrepto cocoe
---------	-------------------	--------	--------------------	--------	--------	----------------------------	-------------------

Camarones

34	308.000	2100	+	+	+	+	-
35	230.000	2100	+	+	+	-	-
36	84.000	940	+	+	+	-	-
37	95.000	430	+	+	+	-	-
38	170.000	2100	+	+	-	-	-
39	340.000	390	+	+	+	+	+
40	300.000	2100	+	+	-	-	-
41	20.000	210	+	+	-	-	-
42	64.000	390	+	+	+	+	-
43	80.000	430	-	-	-	-	-
44	100.000	2400	+	+	-	-	-
45	95.000	390	+	+	+	-	-

Ustiones

46	Incontables	210	+	+	-	-	-
47	Incontables	430	+	+	-	-	-
48	Incontables	200	+	+	+	+	-
49	32.000	30	+	+	+	+	-
50	Incontables	4600	+	+	-	-	-

MUESTRA	C.B.T. Col./g.	N.M.P.	Grupo Colifor- me	E.coli	Estaf.	Coagu- lase Positiva	Estrepto cocos
---------	-------------------	--------	-------------------------	--------	--------	----------------------------	-------------------

Ostiones

51	76.000	200	+	+	-	-	-
52	880.000	11000	+	+	-	-	-
53	11.500	11000	+	+	+	+	+
54	350.000	11000	+	+	+	+	-
55	121.000	1500	+	+	+	+	-
56	Incontables	11000	+	+	+	+	-
57	350.000	2400	+	+	+	+	-
58	Incontables	2400	+	+	+	+	-
59	400.000	70	+	+	-	-	-
60	700.000	280	+	+	+	+	-
61	880.000	750	+	+	+	+	-
62	Incontables	11000	+	+	+	+	-
63	190.000	1500	+	+	-	-	-
64	780.000	4600	+	+	-	-	-
65	760.000	2400	+	+	-	-	-
66	250.000	930	+	+	+	+	-
67	700.000	3400	+	+	+	+	-
68	240.000	930	+	+	+	+	-

MUESTRA	C.B.T. Col./g.	N.M.P.	Grupo Coliforme	E.coli	Estaf.	Coagu- lase Positiva	Estrepto cocos
---------	-------------------	--------	--------------------	--------	--------	----------------------------	-------------------

Ostiones

69	Incontables	280	+	+	+	+	+
70	880.000	1500	+	+	+	-	-
Pulpo							
71	190.000	2400	+	+	+	+	-
72	780.000	930	+	+	+	-	-
73	Incontables	2400	+	+	+	-	-
74	121.000	11000	+	+	+	+	-
75	250.000	2400	+	+	+	-	-
76	Incontables	11000	+	+	+	-	-
77	Incontables	11000	-	-	-	-	-
78	360.000	280	+	+	+	+	+
79	250.000	930	+	+	+	-	-
80	190.000	280	+	+	+	+	-
81	880.000	750	+	+	-	-	-
82	400.000	4600	+	+	-	-	-
83	190.000	1500	+	+	+	+	+
84	360.000	750	+	+	+	+	-
85	360.000	210	+	+	+	-	-

MUESTRA	C.B.T. Col./g.	N.M.P.	Grupo Colifor- me	E.coli	Estaf.	Coagu- lase Positiva	Estrepto- cocos
Pulpa							
86	121.000	200	+	+	+	+	-
87	64.000	30	+	+	+	-	-
88	70.000	70	+	+	+	-	-
89	95.000	380	+	+	+	+	+
90	360.000	930	+	+	+	+	-

En el presente trabajo, para determinar el índice de contaminación desde el punto de vista microbiológico, de los mariscos se utilizó a ciertos microorganismos indicadores, estos fueron, cuentas viables, grupo coliformes y Escherichia coli, estafilococos. En la determinación de estafilococos paralelamente en los medios de cultivo utilizados creció estreptococo, identificado al microscopio por tinción de Gram y prueba de hemólisis.

Los métodos utilizados fueron los siguientes:

Para cuentas viables, el método fue enumeración de microorganismos aerobios mesófilos en placa por siembra en profundidad.

Para grupo coliforme y número más probable de coliformes (NMP) se utilizó el método de bilis (2%) verde brillante, confirmando la presencia de Escherichia coli sembrando un inóculo procedente de los tubos gas positivos en placas de agar Endo, y en agar eosina azul de metileno (EMB).

Para estafilococos se utilizó el medio número 110 para estafilococos, previo cultivo en medio de enriquecimiento como es infusión cerebro-corazón. Y la prueba de la coagulasa en tubo y en placa para determinar la presencia de estafilococos coagulasa positiva. Además a todos los cultivos obtenidos fueron sometidos a la tinción de Gram, para determinar si son gramnegativos o grampositivos.

CONCLUSION

Con los datos e información obtenidos en este estudio, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

Las pruebas microbiológicas efectuadas en el laboratorio para determinar el índice de contaminación debida a microorganismos en los mariscos, fueron cuentas bacterianas viables, acompañada de otras determinaciones, ya que por sí sola no brinda una información completa.

El límite establecido de microorganismos en cuentas viables para los mariscos, es de 100,000 col./g de alimento; en los resultados obtenidos se observa que el 70% de los resultados sobrepasan esta cifra. En el número más probable de coliformes el límite es de 20 bacilos coliformes por gramo de alimento, en los resultados obtenidos en esta determinación, el 100% de las muestras sobrepasa este valor. El 80% de las muestras son positivas de la presencia de *Escherichia coli*; para estafilococos se establece un límite de 100 estafilococos coagulasa positivos por g. de alimento. El conteo de estafilococos no se efectuó debido a que existen métodos altamente sofisticados para efectuar esta determinación, basta determinar la presencia de estafilococos patógenos sin necesidad de efectuar conteos.

Paralelamente a la determinación de estafilococos coagulasa positivos se determinó la presencia de estreptococos. Se hace notar que estos microorganismos son altamente resistentes al calor, desecación y a la congelación; se observa en los resultados obtenidos que en algunas muestras que son negativas en la presencia de *Escherichia coli*, son positivas en la presencia de estreptococos, de aquí la razón de efectuar otras determinaciones y no confiar solamente en las pruebas de cuenta bacteriana total y determinación de coliformes como microorganismos indicadores, ya que algunos patógenos pueden persistir en el alimento cuando *E. coli* por ejemplo ya no se encuentre presente, debido a que existen otros microorganismos altamente patógenos resistentes a los cambios del medio, y que los microorganismos indicadores más comunes no los resisten.

Concluyendo, puedo afirmar basándome en los resultados obtenidos en el laboratorio, que, en general los mariscos que no son procesados, es decir aquellos que se consumen directamente o que son expendidos en forma cruda, no son aptos para el consumo, ya que se encuentran grandemente contaminados con diversos microorganismos patógenos potencialmente peligrosos para la salud humana.

Por lo anteriormente expuesto, se recomienda que se tenga una mayor precaución al consumir este tipo de alimento.

Espero que el presente trabajo sea tomado en cuenta por los alumnos de esta facultad.

BIBLIOGRAFIA

Tratado de Microbiología	William Burrows
Microbiología de los alimentos	Martin Froshisher
Manual de microbiología médica	Ernest Jawetz Joseph L. Melnick Edward A. Adelberg
Análisis microbiológico de los alimentos	F.S. Thatcher D.S. Clark
Métodos microbiológicos	C.H. Collins
La ciencia de los alimentos	Norman N. Potter
Microbiología moderna de los alimentos	J.M. Jay
Higiene y toxicología de los alimentos	B. Hobbs
Diagnóstico microbiológico	Baily Scott
Valor nutritivo de los alimentos	Patty Fisher Arnold Bender
Tecnología de la industria pesquera	M.E. Stansby
El pescado y su inspección	John D. Syne
Manual de procedimientos de laboratorio y de productos BBL.	.