

TP N° 10: Microbiología de los Alimentos

Objetivos:

- Determinar la presencia de microorganismos degradadores de lactosa y productores de ácido (*Lactobacillus* spp.).
- Conocer cómo se realiza el recuento de bacterias aerobias mesófilas, coliformes.
- Establecer UFC/g de bacterias aerobias formadoras de esporas (*Bacillus cereus*), UFC/g de bacterias termófilas y UFC/g de mohos.

LECHE

La leche es el producto que surge de la secreción normal de las glándulas mamarias de los mamíferos. Cualquier leche que no haya sido calentada a temperaturas de pasteurización se denomina cruda. La leche es un buen medio de cultivo para el crecimiento de varios microorganismos por su contenido en agua, pH casi neutro, y una amplia variedad de nutrientes como lactosa y diferentes proteínas. La leche contiene varios factores antimicrobianos: lisozima, lactoferrina, proteínas de la leche unidas a vitamina B12 y ácido fólico, lactoperoxidasa e inmunoglobulinas maternas. Los microorganismos son importantes en la leche y los productos derivados porque producen aromas y propiedades físicas deseables en productos lácteos, pero otros pueden generar alteraciones y algunos patógenos o sus toxinas pueden tornar peligrosos a los productos lácteos. La microbiota incluye: a) bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, etc), b) *Pseudomonas*, c) Micrococcaceae (*Micrococcus*), y d) levaduras. Otros organismos presentes son *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*.

Bacterias lácticas: Son bacilos o cocos, grampositivas, no esporulados y en general catalasa-negativos, con una amplia distribución y adaptabilidad a diferentes ambientes. Aunque son mesofílicas pueden crecer a 5-45°C. Las bacterias lácticas poseen propiedades terapéuticas, mostrando una variedad de efectos beneficiosos. La fermentación de la leche por los lactobacilos genera una mayor disponibilidad, digestibilidad y asimilación de sus nutrientes, aumentan la concentración de vitamina B1, ácido láctico, galactosa, ácidos grasos y elementos esenciales como Ca, P, Mn, Fe y Zn.

Los miembros de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* llegan a la leche porque se encuentran presentes en las superficies externas de la vaca, el suelo, el forraje o el estiércol.

Análisis microbiológico: El Código Alimentario Argentino (CAA) establece límites microbiológicos para leche pasteurizada y en polvo, quesos y otros productos. Los límites para leche cruda certificada son ausencia de patógenos y *E. coli*, bacterias coliformes <10 /mL y bacterias mesófilas <104/mL en el momento de la recepción por el consumidor (art 557).

GRANOS

La microbiota de los granos de cereales y leguminosas es la proveniente del suelo y el ambiente del depósito, además de la adquirida durante el procesamiento.

Aunque tienen alta concentración de carbohidratos y proteínas, su baja actividad de agua restringe el crecimiento microbiano si se almacenan adecuadamente. Las condiciones de almacenamiento, tales como el contenido de humedad de los granos, la temperatura y el tiempo de almacenamiento, son factores críticos en el control de los microorganismos. Los mohos, las levaduras y la mayoría de las bacterias mesofílicas presentes, son originarias de las plantas. Algunos tipos de granos están constantemente contaminados con mohos tales como *Cladosporium*, mientras que otros contienen *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* y otros. Los contaminantes bacterianos (coliformes, enterococos, *E. coli*) son aportados por los pájaros, insectos y roedores. La población bacteriana en los granos es alta, pero el número de patógenos es bajo y suele incluir *B. cereus*, *C. perfringens*, *C. botulinum* y en algunos casos *Salmonella* spp. Los niveles de mohos y levaduras también son elevados y si los granos están secos mueren lentamente.

Análisis microbiológico: La microbiota normal de los granos de cereales comprende mohos (10²-10⁴/g), levaduras y hongos levaduriformes (10²-10⁴/g), bacterias aerobias (10²-10⁶/g), coliformes (10²-10⁴/g), *E. coli* (<10²-10³/g), actinomicetos (10³-10⁶/g).

FRUTAS y HORTALIZAS

Una vez que el producto es cosechado comienza de inmediato la senescencia haciéndolo más sensible al deterioro microbiano. El grado y la velocidad del incremento de la población de microorganismos depende del producto y las condiciones de almacenamiento. El deterioro es realmente causado por solo una pequeña proporción de la microbiota inicialmente presente y un tipo específico de alteración se desarrolla bajo las condiciones normales de almacenamiento a temperaturas apropiadas. Los factores que influyen sobre la microbiota dominante y determinan la clase de deterioro, son la contaminación inicial, las propiedades del sustrato, las condiciones ambientales y las características de los microbios. Otros factores importantes son la contaminación a partir del suelo, el agua, los animales domésticos y salvajes, y la extensión del contacto durante la cosecha con las superficies sucias de las cosechadoras y contenedores.

La microbiota dominante sobre las hortalizas recién cosechadas es muy variable. Constituida por bacterias gramnegativas como *Enterobacter*, *Pantoea* y *Pseudomonas*, pero las partes que crecen cerca o dentro del suelo contienen bacterias grampositivas, por ejemplo, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Clostridium*. Los hongos filamentosos aislados de las hortalizas con más frecuencia son *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Phoma*, *Chaetomium* y en menor proporción *Aspergillus*, *Acremonium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Sclerotium*, *Trichoderma*, *Ulocladium*, etc.

Análisis microbiológico: La población microbiana sobre los productos frescos puede variar mucho y el recuento suele estar en el rango de 10⁴–10⁶ ufc/g. Los valores microbiológicos de referencia en las hortalizas crudas listas para el consumo, acordes con las buenas prácticas de manipulación son: recuento de colonias a 17°C de 10⁵ ufc/g, recuentos de *E. coli* y de *Enterococcus* spp. de 10 ufc/g y ausencia de *L. monocytogenes* en 1g. Estos valores son accesibles cuando se

llevan a cabo correctamente el abonado, el riego, la recolección, el lavado y el procesamiento posterior. Los coliformes y enterococos son contaminantes comunes de las hortalizas congeladas, pero *E. coli* es relativamente raro en los vegetales blanqueados por lo que su presencia es índice de contaminación fecal. La presencia de coliformes en las frutas congeladas no suele ser índice de peligro para la salud pública.

Recuento de *Lactobacillus* en leche

Recuento Estándar en Placa (REP): también conocido como recuento de aerobios mesófilos, es el análisis directo mayormente empleado para determinar la calidad microbiológica de la leche y otros alimentos. El método consiste en hacer diluciones de la muestra y sembrar en placas de petri con agar estándar; luego de 24 a 48 horas de incubación a $37 \pm$ se cuentan las colonias observadas las cuales permiten obtener el número de unidades formadoras de colonias por mililitro o gramo de muestra (ufc/mL o ufc/g). Aquí solo intervienen microorganismos vivos capaces de formar colonias, además una colonia puede estar originada por uno o más de una unidad formadora de colonias.

Se toma 1 mL de la muestra líquida y agregarlo a 9 mL de diluyente. Homogenizar y hacer diluciones decimales. Se siembra 0,1 mL en la superficie de las placas de medio de cultivo extendiendo con una varilla en L.

Se colocan las placas de MRS invertidas en el interior de una lata y sobre las mismas una vela encendida, tapar herméticamente. Cuando la llama se ha consumido, la disminución del oxígeno estimula el desarrollo de estas bacterias. Incubar a 37°C durante 24-48hs. se observa las colonias y se determina el número de ufc/g ó mL.

MEDIO MRS: Peptona de carne 10g, extracto de carne 10g, extracto de levadura 5g, glucosa 20g, tween 80 1mL, acetato de sodio 5g, citrato triamónico 1g, fosfato dipotásico 2g, sulfato de magnesio 0,2g, pH6,6. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos, enfriar a 50°C y volcar en cajas de Petri.

Observación de microorganismos del yogur

En la observación de un frotis de yogur al microscopio aplicando tinción con azul de metileno se puede determinar formas cocoides encadenadas (arrosariadas) pertenecen al género *Streptococcus*. Por el contrario, las formas bacilares (de mayor o menor tamaño), en bastoncillo, corresponden al género *Lactobacillus*.

BIBLIOGRAFÍA

- ICMSF. 1998. Microorganisms in foods. 6. Microbial ecology of food commodities. Blackie Academic & Professional, London, p 521.
- Mossel DA et al. 2003. Microbiología de los Alimentos. 2º ed. Acribia, Zaragoza, p 506, 636.
- Sharpe ME. 1981. En: The Prokaryotes. Vol. II. Starr MP et al., eds. Springer-Verlag, Berlin, pp.1653-1679.
- Mossel DAA et al. 2003. Microbiología de los Alimentos. Acribia, Zaragoza, p. 548.
- ICMSF. 1981. Microorganismos de los Alimentos. Vol 2. Acribia, Zaragoza, p.109.
- Código Alimentario Argentino. <http://www.anmat.gov.ar/codigoo/caa1.htm> cap 9.