

**EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DEL MÉTODO PETRIFILM 3M LAB EN EL
RECuento DE BACTERIAS ACIDOLACTICAS HOMO FERMENTATIVAS
FRENTE A LA TÉCNICA TRADICIONAL DE SIEMBRA EN AGAR APT PARA
EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS CÁRNICOS**

MARIA FERNANDA GRIMALDOS SÁNCHEZ

COD: 1096956368

INFORME PASANTÍA

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA

2018

**EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DEL MÉTODO PETRIFILM 3M LAB EN EL
RECuento DE BACTERIAS ACIDOLACTICAS HOMO FERMENTATIVAS
FRENTE A LA TÉCNICA TRADICIONAL DE SIEMBRA EN AGAR APT PARA
EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS CÁRNICOS**

MARIA FERNANDA GRIMALDOS SÁNCHEZ

COD: 1096956368

INFORME PASANTÍA

TUTORAS DE LA EMPRESA

CAROL ROCÍO BUITRAGO ROZO

Microbióloga Universidad de Pamplona

ANA MARÍA RIVERA BARRIOS NUEVOS

Microbióloga Universidad de Pamplona

TUTOR ACADÉMICO

CLAUDIA CLAVIJO OLMOS PH. D

Microbióloga Universidad de los Andes

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

PAMPLONA

2018

NOTA DE ACEPTACIÓN

TUTOR ACADÉMICO

JURADO

JURADO

PAMPLONA, 2018

TABLA DE CONTENIDO

Página

INTRODUCCION	1
1. OBJETIVOS	2
1.1 OBJETIVO GENERAL	
1.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	
2. JUSTIFICACIÓN	2
3. MARCO REFERENCIAL	3
3.1 MARCO LEGAL	
3.2 MARCO TEÓRICO	5-14
4. METODOLOGÍA	
4.1 Metodología selección de las cepas control	
4.2 Preparación medio APT	16
4.3 Siembra en agar APT	17
4.4 Siembra en placa Petrifilm 3M LAB	17
4.5 Análisis Estadístico	
4.6 Inoculación de las cepas control en los medios seleccionados	15
4.7 Pruebas con matrices cárnicas y no cárnicas sin cepas control	15-18
5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	19-20
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS	21-59
6.1 Recuento en medio APT y Placa 3M Petrifilm para bacterias ácido lácticas a partir de las cepas de trabajo sin matriz.	
6.2 Recuento en medio APT y placa 3M Petrifilm para bacterias ácido lácticas a partir de matrices inoculadas y superficies metálicas.	
6.3 Análisis estadístico usando el paquete SPSS	
7. CONCLUSIONES	60
8. BIBLIOGRAFIA	61-62

LISTA DE TABLAS

- **Tabla 1:** Recuento bacterias ácido lácticas a partir de la cepa 1 de trabajo *Lactobacillus plantarum* sin matriz.
- **Tabla 2:** Análisis de varianza para el recuento de *Lactobacillus plantarum*
- **Tabla 3:** Prueba t para el recuento de *Lactobacillus plantarum*
- **Tabla 4:** Recuento bacterias ácido lácticas a partir de la cepa 2 de trabajo *Lactococcus lactis sup lactis* sin matriz
- **Tabla 5:** Análisis de Varianza Recuento *Lactococcus lactis sup lactis*
- **Tabla 6:** Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales
- **Tabla 7:** Recuento de bacterias ácido lácticas a partir de matrices cárnicas y no cárnicas
- **Tabla 8:** Análisis de varianza recuento bacterias ácido lácticas en matrices cárnicas y no cárnicas
- **Tabla 9:** Prueba t en el recuento de bacterias ácido lácticas en matrices cárnicas y no cárnicas
- **Tabla 10:** Porcentajes de crecimiento de Bacterias ácido Lácticas en medio APT y en Placas Petrifilm

LISTA DE IMÁGENES

- Imagen 1:** Salida Colgado
Imagen 2: Salida Proceso Térmico
Imagen 3: Salida Proceso Frio Intensivo
Imagen 4: Salmuera Final
Imagen 5: Salmuera Inicial
Imagen 6: Pimienta Liquida Concentrada
Imagen 7: Dextrosa Monohidratada
Imagen 8: Mezcla Saborizante Paprika Soluble
Imagen 9: Pimienta Negra Molida
Imagen 10: Cebolla en Polvo (Diferenciación de BAL homo y hetero fermentativas)
Imagen 11: Placa Petrifilm con crecimiento de bacterias ácido lácticas heterofermentativas
Imagen 12: Cebolla en Polvo con diferentes diluciones
Imagen 13: Ajo en Polvo
Imagen 14: Mezcla Ahumado Especial Líquido

Imagen 15: Costilla de Cerdo
Imagen 16: Salchichon Cervecero
Imagen 17: Salchichon tradicional
Imagen 18: Salchicha Perro caliente
Imagen 19: Salchicha Perro caliente
Imagen 20: Contaminación en el agar APT
Imagen 21: Contaminación agar APT, difícil recuento.
Imagen 22: Carne hamburguesa cocida
Imagen 23: Paleta de Cerdo
Imagen 24: Salchicha rellena queso
Imagen 25: Salchicha rellena queso
Imagen 26: Albóndiga Proteína de soya
Imagen 27: Hamburguesa proteína de Soya
Imagen 28: Hamburguesa precocida
Imagen 29: Salchicha rellena de queso
Imagen 30: Hamburguesa proteína de soya
Imagen 31: Crecimiento *Lactobacillus plantarum*
Imagen 32: Crecimiento *Lactococcus lactis sup lactis*
Imagen 33: Escala Patrón Mac Farlan

LISTA DE GRÁFICOS

- **Gráfico 1:** Recuento de *Lactobacillus plantarum* en agar APT y Placa Petrifilm
- **Gráfico 2:** Recuento *Lactococcus lactis sup lactis*
en agar APT y placa Petrifilm
- **Gráfico 3:** Recuento de bacterias ácido lácticas (BAL) en agar APT y placa Petrifilm a partir de matrices cárnicas y no cárnicas

INTRODUCCIÓN

La actividad de los laboratorios ha evolucionado, de forma casi exponencial, en los últimos 30 años acompañando esta evolución a la propia evolución que ha tenido el sector industrial alimentario, en el que la confianza es crítica, al igual que los elevados niveles de calidad y seguridad alimentaria. Esto ha exigido una adecuación tecnológica e instrumental sin comparación en ninguna otra época de la historia; lo que se ha traducido en unos mayores controles de calidad alimentaria, en términos de precisión, fiabilidad o rapidez.

Las normas en materia de alimentos, generalmente establecen la calidad microbiológica en términos de microorganismos indicadores. Éstos son organismos (o grupos) que advierten oportunamente de un manejo inadecuado o contaminación que incrementan el riesgo de presencia de microorganismos patógenos en alimentos. Además de que su detección en el laboratorio es más sencilla, rápida y/o económica, los microorganismos indicadores permiten un enfoque de prevención de riesgos, puesto que advierten manejo inadecuado y/o contaminación. (Ashbolt, 2011)

Muchos de los procedimientos utilizados en el análisis microbiológico de alimentos para microorganismos indicadores demandan mucho tiempo, dinero y son poco flexibles para el analista, debido a la no actualización de sus sistemas de estudio. La industria alimentaria exige una rápida respuesta frente a la presencia o no de microorganismos que puedan generar o causar enfermedad en los consumidores, por lo que se hace necesario adoptar técnicas rápidas y de fácil lectura, logrando un mayor cubrimiento y rapidez en el control de la calidad de este sector. Por lo cual, hoy por hoy se hace necesario contar con productos que permitan desarrollar análisis de manera ágil, aumentando la productividad del laboratorio, proporcionando resultados confiables y seguros.

En este trabajo se realizó la comparación y evaluación de dos métodos de recuento para Bacterias ácido lácticas (BAL) en el análisis de productos cárnicos; las dos técnicas contrastadas fueron siembra en agar APT que se utiliza actualmente en el laboratorio de la institución versus la siembra en placas Petrifilm 3M LAB la cual se quiere adoptar, todo lo anterior con el fin de mostrar las ventajas y desventajas que tiene cada una y de esta manera afirmar cuál procedimiento es el más adecuado para su uso, juzgando calidad, fiabilidad y eficiencia en los resultados analíticos obtenidos. Puesto que para la determinación de este tipo de bacterias en matrices alimentarias en especial la industria láctea,

se utilizan métodos convencionales basados en la Norma Técnica Colombia 5034 con agar MRS, que generan mayor tiempo de procesamiento y una lectura de resultados más confusa, se quiere establecer con cual método se hace un recuento concreto, eficaz y sustentable en matrices cárnicas y sus subproductos, dando indicaciones del estado de la materia prima y todo el proceso que envuelve una gran diversidad de productos de este tipo.

1. OBJETIVO

1.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar y comparar el método petrifilm 3M LAB en el recuento de bacterias ácido lácticas (BAL) homofermentativas frente a la técnica tradicional de siembra en Agar todo Propósito (APT) para el análisis de productos cárnicos.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Comprobar la especificidad y fiabilidad de las dos técnicas de recuento a estudiar.
- Verificar la capacidad que tienen las técnicas de siembra en profundidad en Agar todo Propósito (APT) y la siembra en placas Petrifil 3M LAB en diferenciar colonias homofermentativas y heterofermentativas a partir de productos cárnicos y no cárnicos.
- Establecer y mantener un solo método de recuento para Bacterias Ácido lácticas (BAL) en el análisis de matrices cárnicas y no cárnicas que tengan contacto con el producto.

2. JUSTIFICACIÓN

La creciente tendencia hacia la globalización del comercio mundial ha estimulado un interés destacable en el desarrollo de sistemas de calidad convincentes y más eficientes. Mientras esta tendencia se orienta para asegurar básicamente una mejor protección al consumidor, también ayudará a desarrollar una base más homogénea para el establecimiento de acuerdos comerciales entre los países y al mismo tiempo, mejorar la estructura internacional para resolver problemas de seguridad alimentaria y

de comercialización de cualquier producto. (Higuera, Orozco; 2000). Por lo anterior un laboratorio de alimentos tiene la necesidad de adaptarse a las nuevas tendencias de análisis y a generar resultados en el menor tiempo posible, que sean confiables y verídicos. Tradicionalmente, el método estándar de recuento en placa ha sido ampliamente utilizado en los últimos 100 años en microbiología de los alimentos. Sin embargo, aunque sencillo, resulta laborioso, requiere de un volumen considerable de tubos de ensayo, pipetas, preparación de grandes volúmenes de medio para las diluciones, así como de espacio para el almacenamiento y la incubación de las placas de cultivo (Fátima, 2015). Además, para el análisis de bacterias ácido lácticas en carnes, se tiene muy poca información y en el laboratorio en el cual se realiza el proyecto se utiliza un método antiguo con el uso de agar APT. En contraposición a lo anterior el presente estudio tiene como fin buscar la mejor técnica de recuento para bacterias ácido lácticas (Agar APT o Placas Petrifilm 3M), donde se tomen en cuenta tiempo, gastos económicos, cuidado ambiental y resultados confiables para industrias que trabajen con materias cárnicas y sus productos derivados, ya que al ser ellas una microbiota determinante para la vida útil de los productos, pueden generar cambios físicos como cambio de color, olor, textura, provocar lechosidad e imperfección en la carne, por lo anterior es de gran importancia saber si están presentes antes, durante y después del proceso de fabricación de productos cárnicos .(Holzapfel et al., 1995).

3. MARCO REFERENCIAL

Una empresa destinada a la fabricación de productos cárnicos debe gestionar y generar materias de alta calidad que promuevan el alto consumo y a su vez proporcione seguridad y confianza en el cliente. El lugar destinado al desarrollo del proyecto es una empresa que está basada en la producción de embutidos como salchichas, salchichones, carne para hamburguesa y jamón, al igual que la elaboración de productos especiales tales como hamburguesa vegetariana, morcilla, albóndigas en salsa, enlatados, platos preparados, y madurados entre otros. Su principal objetivo es satisfacer las necesidades del cliente pero poniendo como razón principal su bienestar y su cuidado, generando productos con excelente apariencia, textura y sabor; favoreciendo la nutrición y buena alimentación de la población. La empresa cuenta con diferentes sedes a nivel nacional en los cuales se realizan diversidad de productos que son ofertados en toda Colombia, la sede en la cual se realizó el proyecto fue Bogotá, que cuenta

con una gran cantidad de empleados distribuidos en las diferentes partes de la producción, abarcando desde la parte administrativa, logística, producción y transporte. Esta institución buscar satisfacer el mercado de consumo de cárnicos procesados, que tengan un alto nivel de calidad y que además presenten el menor riesgo posible de alteración evitando así generar daño en el cliente.

3.1 MARCO LEGAL

Desde el punto de vista legal todo laboratorio microbiológico de alimentos en Colombia debe regirse a partir de normas ISO, normas técnicas Colombianas y resoluciones que dictan los parámetros a seguir en los procedimientos de análisis para cada grupo de alimentos y para cada técnica específica a utilizar. Para este estudio se deben tener en cuenta las siguientes normas:

- ✓ **Norma Técnica Colombia NTC 1325, 2008:** la cual establece los requisitos que deben cumplir los productos cárnicos procesados no enlatados.
- ✓ **Resolución 1619 del 2017:** Por la cual se establece el Sistema de Gestión de la Red Nacional de Laboratorios en los ejes estratégicos de Vigilancia en Salud Pública y de Gestión de Calidad.
- ✓ **Norma Técnica Colombiana NTC 5034, 2001:** especifica un método horizontal para el recuento de bacterias mesófilas del ácido láctico mediante el recuento de las colonias que crecen después de la incubación a 30°C durante 3 días.
- ✓ **La norma ISO 11133, 2014:** Señala las directrices que debe poseer la Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua. Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo.
- ✓ **La norma ISO 15214, 1998:** señala un método horizontal para la enumeración de bacterias mesófilas del ácido láctico - Técnica de recuento de colonias a 30°C.

3.2 MARCO TEÓRICO

ANTECEDENTES

El concepto de bacterias lácticas como un grupo de microorganismos surgió a mediados del siglo XIX con la significativa contribución de Louis Pasteur, quien en el año de 1857 demostró que los procesos fermentativos (fermentación láctica, alcohólica o butírica) eran causados por distintos tipos de microorganismos. Posteriormente en 1873, Lister aisló el primer cultivo puro de un microorganismo y lo denominó *Bacterium lactis*. En 1884, Hueppe denominó "*Milchsauerbacillus*" a la flora microbiana responsable de la acidificación y coagulación de la leche. Luego a finales del siglo XIX Weigmamn propuso el término "*Bacterium acidi lactici*" e introdujo el empleo de cultivos iniciadores en la elaboración de quesos y de leche agria en las industrias alimentarias de las ciudades de Kiel y Storch (Copenhague), lo que representó el comienzo de la era industrial de las fermentaciones como procesos controlados o dirigidos (Bibel, 1988).

En 1900 Henry Tissier aisló de las heces de un lactante la primera bifidobacteria a la que llamó *Bacillus bifidus*. Se trataba de un organismo Gram positivo y productor de ácido láctico por lo que en la primera clasificación se incluyó con las bacterias lácticas. En 1917 Winslow propuso la familia *Lactobacillaceae* para agrupar bacterias con los siguientes rasgos: bacilos Gram positivos, a menudo largos y delgados, inmóviles, no esporulados, comúnmente producen ácido láctico a partir de azúcares, pueden producir gas (dióxido de carbono), no producen hidrógeno, ocasionalmente termófilos, difícilmente cultivables en medio gelificado incubado en atmósfera microaerófila. Dentro de esta familia se incluía *Bacillus bifidus*. Durante buena parte del siglo XX se mantuvieron los lactobacilos y las bifidobacterias agrupados en el esquema de clasificación. Por ello, tradicionalmente se ha utilizado el nombre de bacterias lácticas aludiendo a ambos grupos de microorganismos, en cuanto a su capacidad para producir ácido láctico. Sin embargo, a comienzos de los años 30 ya empezaron a obtenerse datos que señalaban que las bifidobacterias estaban más próximas a *Actinomyces* que a los lactobacilos, si bien estos estudios no modificaron el esquema de clasificación. Los estudios moleculares llevados a cabo en los años 60 mostraron que las bifidobacterias eran muy diferentes de las restantes bacterias lácticas a pesar de las similitudes fenotípicas. (Aznar, Zuñiga; 2002).

El grupo de las bacterias lácticas o bacterias del ácido láctico (BAL) fue definido por Orla Jensen (1924) y reúne varios géneros caracterizados por su capacidad de fermentar los glúcidos produciendo ácido láctico.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se pueden caracterizar como bacterias Gram-positivas, aeróbicas o facultativas; bacilos y cocos, que son oxidasa, catalasa y bencidina negativo, carecen de citocromos, no reducen nitratos a nitrito, son negativos a la gelatinasa, y son incapaces de utilizar lactato. Las BAL además

pueden sobrevivir y desarrollarse en presencia de pH bajo, debido a que cuentan con un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que contribuye con la homeostasis del pH interno y origina energía (Vásquez 2009). Las bacterias del ácido láctico, aunque consisten en una serie de géneros diversos, se agrupan como Homofermentadoras o Heterofermentadoras, basado en el producto final de su fermentación. Las homofermentadoras producen ácido láctico como el principal producto de la fermentación de la glucosa. Los heterofermentadoras originan una gran cantidad de productos además del ácido láctico, incluyendo dióxido de carbono, ácido acético y etanol de la fermentación de la glucosa. (Carr, et al, 2002).

En la actualidad lo que se conoce como bacterias lácticas agrupa a bacterias del orden Lactobacillales y bacterias del orden Bifidobacteriales.

Lactobacillus

Taxonómicamente, el género *Lactobacillus* es diverso y contiene al menos 12 grupos filogenéticos separados. Se han nombrado más de 150 especies con el género *Lactobacillus*, que se aislaron principalmente de membranas mucosas humanas y animales y de la superficie de las plantas. Varias cepas de *Lactobacillus* se usan en la preparación de productos lácteos fermentados y en la producción de chucrut, pepinillos y ensilaje. Una de las cepas probióticas más importantes de *Lactobacillus* es *L. rhamnosus* GG, que es la bacteria probiótica más estudiada. *L. rhamnosus* pertenece a un grupo filogenético de *L. casei* junto con *L. casei*, *L. paracasei* y *L. zeae*. Los efectos sobre la salud de *L. rhamnosus* GG se basan en varios mecanismos que se revisaron por separado. Además, la cepa *L. rhamnosus* GG tiene numerosos efectos sobre el sistema inmune del huésped. El mejor beneficio comprobado para la salud de *L. rhamnosus* GG ha disminuido el riesgo y reducido los días de tratamiento para la diarrea aguda en (Guandalini et al., 2000). *L. rhamnosus* GG también puede reducir el riesgo de diarrea asociada con antibióticos y otros efectos secundarios intestinales asociados con el uso de antibióticos.

Bifidobacteria y Propionibacteria

Los otros dos géneros importantes que consisten en cepas probióticas son *Bifidobacterium* y *Propionibacterium*. Las bifidobacterias, habitantes importantes del TGI, se consideran indicadores positivos de salud. La cepa de *Bifidobacterium* probiótica más ampliamente estudiada probablemente sea *B. animalis* subsp. *Lactis* Bb-12, cuyo uso es reducir el riesgo de infecciones respiratorias en los bebés, para tener un efecto protector contra enfermedades como la diarrea en los niños, y también para reducir la gravedad del eczema atópico en los bebés. También son típicamente tolerantes al estrés en comparación con otras especies de *Bifidobacterium*, que es importante para su uso en preparaciones probióticas [8]. Las bacterias propiónicas se utilizan como cultivos iniciadores en la industria láctea, especialmente en los quesos de tipo suizo, y tienen menos propiedades probióticas que las disponibles para las cepas probióticas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Cepa *Propionibacterium* potencialmente probiótica, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii* JS, ha demostrado tener efectos no inflamatorios durante la infección por *Helicobacter pylori* in vitro. Además, se ha demostrado que esta cepa reduce el nivel de proteína C reactiva en suero en adultos sanos. (Vinuskha, 2009).

Las bacterias lácticas propiamente dichas pertenecen a 19 géneros distribuidos en 6 familias dentro del orden Lactobacillales. Forman un grupo muy heterogéneo de bajo contenido en G+C dentro del filo Firmicutes. La mayor parte de estas bacterias comparten el hecho de ser bacilos o cocos Gram-positivos, catalasanegativos (aunque en algunos casos pueden presentar una actividad pseudocatalasa), anaerobios facultativos, microaerófilos o aerotolerantes, desprovistos de citocromos, no esporulados, acidófilos o acidotolerantes, de metabolismo quimioorganotrofo y estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como principal producto final de la fermentación de azúcares.

Los géneros con morfología celular esférica, o cocoide “cocos” son entre otros, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* o *Streptococcus*, con número de especies limitado, y el género que reúne mayor número de especies, *Lactobacillus*, se caracteriza por la forma de bastoncillo “bacilos”.

A pesar de la utilidad que las BAL tienen en la industria, es difícil cultivarlas por la necesidad de una gran cantidad de requerimientos nutricionales. Se utilizan varios medios de cultivo para el aislamiento y recuento de estos microorganismos a partir de alimentos, entre los que se encuentran agar MRS (de Man-RogosaSharpe); agar APT; agar de Lee y el agar de Chalmers (Santillán, 2004).

Las técnicas microbiológicas en el sector de los alimentos, están dirigidas con mayor frecuencia a la detección de microorganismos indicadores de la posible presencia de patógenos o alterantes, los métodos convencionales de detección de microorganismos como la técnica del NMP (Número más probable), filtración por membrana, siembra en profundidad o vertido en placa, requieren en primer lugar que el microorganismo objeto del análisis forme una colonia en un medio de cultivo, lo cual implica su preparación, esterilización de material, mano de obra suficiente, periodos de incubación relativamente largos, el empleo de cultivos de enriquecimiento o de recuperación y se debe disponer de equipos necesarios como incubadoras, neveras, autoclave, etc., (Ercsey, y col., 2012).

La carne es un medio excelente para mantener el desarrollo bacteriano, gracias a sus propiedades biológicas y composición química, entre las que se distinguen un alto contenido de proteínas, pH ligeramente ácido y una elevada actividad de agua. La contaminación microbiana causa serios problemas de seguridad y calidad en la industria cárnica. Los microorganismos presentes en la carne y sus productos son de amplio espectro, desde bacterias hasta levaduras, mohos y virus, según el tipo de producto. Con mucho, los problemas microbianos en la industria de la carne han surgido principalmente debido a las bacterias (Hui, 2012). Según lo revisado por Jayasena y Jo (2013), las principales bacterias de descomposición en la carne incluyen *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Brochothrix thermosphacta*, *Moraxella*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Proteus*. Tras un crecimiento sustancial de esos organismos de descomposición, las proteínas y los lípidos de la carne y los productos cárnicos sufren degradación, cambiando negativamente la apariencia, la textura y el sabor de los productos (Borch, Kant-Muermans, y Blixt, 1996). Normalmente, los microbios de deterioro no afectan perjudicialmente la salud, pero pueden estimular disturbios gastrointestinales cuando se consumen en altas concentraciones (Jayasena y Jo, 2013). La microflora de la carne es usualmente dominada por las bacterias ácido láctico (BAL), debido a que ejercen un efecto modificador en la microflora de la carne, pasando del predominio de los bacilos Gram negativos putrefactivos, tales como *Pseudomonas ssp* y microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, a los microorganismos Gram positivos como el caso de las BAL. (Rondón, et al, 2011). Entre los cambios o daños que pueden hacer las BAL se pueden encontrar: la excesiva acidez de los alimentos, ruptura de las estructuras del mismo y causando cambios estructurales como lo es la formación de polisacáricos y decoloraciones (prolongada fermentación); la fermentación de un alimento que no debió ser fermentado y el deterioro de productos frescos. (García y González; 2017) En el procesamiento de alimentos, las bacterias del ácido láctico pueden ser amigos o enemigos. Mantenidos bajo control, estos organismos ayudan a producir alimentos fermentados que van desde yogures suaves a encurtidos crujientes, e incluso se pueden aprovechar para probióticos; Pero con bajo nivel de oxígeno, baja temperatura y condiciones ácidas, las bacterias pueden causar deterioro, decoloración, paquetes hinchados, texturas, olores y sabores que desagradan a los clientes, desencadenando retiradas y causando desperdicio de comida. (Paul, 2016)

Posibles fuentes de contaminación de LAB

Numerosos taxones de bacterias ácido lácticas, relacionados con el deterioro de los alimentos son omnipresentes en el suelo y las plantas (Axelsson, 2004, Chen et al., 2005), piel y epitelios animales (Lundström y Björkroth, 2011, Rieder et al., 2012), superficies abióticas y alimentos plantas de procesamiento (Bokulich, Bamforth, & Mills, 2012). Hoy en día, debido a la globalización económica, las porciones de carne envasadas se fabrican en instalaciones de procesamiento caracterizadas por un grado significativo de automatización e informatización (Welch & Mitchell, 2000). Esta producción sistemática de alimentos ha corroborado el papel de los entornos industriales de procesamiento de carne y la tecnología en el consorcio microbiano del producto final (Audenaert et al., 2010). Se ha desarrollado una relación recíproca entre las canales manipuladas en la planta y el entorno de producción real. La microbiota autóctona de carne cruda sin procesar se introduce en las instalaciones de producción y puede convertirse en microbios residentes que contaminan las herramientas y superficies de manipulación de carne en la planta, de donde normalmente se transfieren a carne fresca, intermedios o productos finales (De Filippis, La Stora, Villani, & Ercolini, 2013). Pocos estudios se han ocupado de la investigación del origen ambiental de las BAL encontradas en la carne. La contaminación cruzada de los productos minoristas finales por las especies de LAB que se derivan de las materias primas se especula sobre la base de la difusión mediada por el aire y la superficie (Björkroth y Korkeala, 1996, Björkroth y Korkeala, 1997b, Vihavainen y Björkroth, 2009, Vihavainen et al. al., 2007). Además, las condiciones que caracterizan las instalaciones de fabricación de carne favorecen la adaptación de poblaciones de especies de BAL psicotolerantes que colonizan la planta, prosperan a bajas temperaturas y posteriormente contaminan los siguientes lotes de producción (Björkroth, 2005, Björkroth y Korkeala, 1997b, Vihavainen y Björkroth, 2009). , Vihavainen et al., 2007). Esta teoría de la adaptación y la supervivencia como microbiota doméstica ha sido sugerida para otros tipos de alimentos, destacando la presencia de LAB en partes de equipos y sitios de la premisa (Koo et al., 2013, Pothakos et al., 2014a). Por lo tanto, el entorno de procesamiento puede ser una fuente importante de contaminación por LAB para la carne, siempre que se establezcan condiciones de crecimiento adecuadas y disponibilidad de sustrato en el procesamiento de microclimas que puedan favorecer nichos enriquecidos con BAL que se diseminen en la carne.

Las bacterias ácido lácticas no solo presentan un riesgo para los alimentos cárnicos, sino que también han sido utilizadas en gran medida para la fabricación de productos fermentados. La aplicación de bacterias ácido lácticas (BAL) tiene dos objetivos en los alimentos fermentados. Primero, es el desarrollo de sabores y olores característicos durante la fermentación; y, segundo, inhibir la microflora competitiva mediante la reducción del pH del medio. De este modo, las BAL tienen un papel muy importante en la conservación de alimentos fermentados provocando cambios en olores, sabores y textura, además de su mencionada acción preservativa (Holzapfel et al., 1995). En los productos cárnicos cocidos el

tratamiento térmico reduce considerablemente la carga de microorganismos. Debido a que las BAL son la microflora predominante de manera natural en la carne y mataderos, algunas de estas bacterias pueden sobrevivir al tratamiento térmico.

Las BAL tienen cierta capacidad de inhibición para ciertos patógenos, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella sp* (Hammes y Tichackzek, 1994). La inhibición de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* por ciertas especies de BAL debido a la producción de bacteriocinas ha sido también reportada (Harris et al., 1989). La presencia y sobrevivencia de BAL no afecta las características organolépticas de los productos cárnicos cocidos. Leisner et al. (1995) determinaron el efecto de BAL en carne de bovino almacenadas a 2 °C, donde *Lactobacillus sake* creció rápidamente durante las primeras tres semanas de almacenamiento, mientras que *Leuconostoc gelidum* creció de forma moderada. El desarrollo de las cepas de BAL no causó ningún deterioro en las características de olor y color de las muestras empacadas al vacío. Garriga et al. (1998) estudiaron la competitividad de varias cepas de lactobacilos seleccionadas por su actividad inhibitoria contra *Salmonella spp* en un producto cárnico, valorándolos como cultivos bioprotectores. Sensorialmente los productos inoculados fueron mejor que los productos sin inocular. (León, et al; 2005)

Por lo anterior se hace necesario que en todo proceso productivo que implique el uso de carne, se realice un control y recuento de estas bacterias, logrando así establecer características físicas y microbiológicas en la materia prima y en todo el equipo técnico y tecnológico implicado.

A su vez para el recuento de BAL (bacterias ácido lácticas) en el laboratorio se utilizan ciertos métodos tradicionales como la siembra en profundidad que consiste en depositar en una placa de Petri vacía un pequeño volumen conocido de muestra y a continuación añadir el medio de cultivo fundido y atemperado, mezclando por rotación suave de la placa.

De esta forma los microorganismos se distribuirán homogéneamente en el medio de cultivo, permitiendo el desarrollo de colonias separadas por todo el agar APT, el cual es un medio utilizado para el cultivo, aislamiento y cuenta de Lactobacilos heterofermentativos y otros microorganismos exigentes que requieren de un alto contenido de tiamina. La tiamina es una de las pocas vitaminas para las cuales los laboratorios analíticos generalmente emplean una sustancia química en lugar de un método microbiológico para ensayo cuantitativo. Sin embargo, cada uno de estos métodos propuestos sufre de uno o más inconvenientes como la falta de especificidad, la interferencia inhibitoria de sustancias, sustancias estimulantes inespecíficas, o complejidad de medio y procedimiento (Deibel et al, 1957).

El medio APT contiene una mezcla de peptona, que actúa como una fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. Extracto de levadura que proporciona vitaminas y nutrientes del complejo B, que se requieren para el crecimiento de

bacterias. La dextrosa es el carbohidrato fuente. El cloruro de manganeso, el sulfato de magnesio y el sulfato ferroso son esenciales para la replicación de lactobacilos y estreptococos del ácido láctico. El polisorbato es una fuente de ácidos grasos requerida por los lactobacilos. El citrato de sodio inhibe parcialmente el crecimiento de bacterias Gram negativas. (Evans and Niven, 1951). A pesar de ser utilizada la mayoría de las veces, esta técnica demanda una mayor cantidad de tiempo en la preparación del medio y una difícil diferenciación entre las bacterias ácido lácticas homo y hetero-fermentativas. Para contrarrestar estos problemas se ha venido implementando el uso de Petrifilm que genera una mayor facilidad de recuento, diferenciación y disminución en material, este es un sistema constituido por un medio de cultivo listo para usarse, que contiene nutrientes, agentes selectivos, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de tetrazolio (TTC) que facilita el recuento de colonias. La placa contiene compuestos que eliminan el oxígeno, creando un ambiente anaeróbico para la recuperación de bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativas en las industrias de alimentos y bebidas.

Ambas versiones, sólida y líquida, han demostrado su eficacia en detectar lactobacilos que producen enverdecimiento de la carne. Por otra parte, si el medio se complementa con un 5% de jugo de fruta, como APHA declara, se convierte en un medio de crecimiento para muchos bio modificadores de alimentos. Sin la inclusión de un agente inhibidor en la formulación, el medio no tiene capacidad selectiva y puede soportar el crecimiento de casi todos los tipos de microorganismos. (Scharlab).

La norma existente para el recuento de BAL en alimentos es la ISO 15214 de 1998. Esta norma internacional especifica un método horizontal para la enumeración de bacterias de ácido láctico mesófilas viables mediante el recuento de las colonias que crecen en un medio sólido Man, Rogosa, Sharpe (MRS) después de la incubación a 30 ° C durante 3 días, a partir de lo cual Colombia adoptó la norma técnica 5034 que trata del mismo procedimiento para el recuento de estos microorganismos en los alimentos. En este caso se especifica el uso del medio MRS en la normativa debido a que permite el crecimiento de bacterias ácido lácticas en alimentos, especialmente en productos lácteos, mientras que para el análisis de productos cárnicos se recomienda el uso de medio APT.

DIFERENCIACIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS Y NO PRODUCTORAS DE GAS.

El método de las Placas Petrifilm AC con caldo MRS e incubación anaeróbica ha sido comparado con el método de agar MRS para la recuperación de Bacterias Ácido Lácticas en 161 muestras de alimentos naturalmente contaminados. El Método de la Placa Petrifilm es más sensible que el método de tubos de MRS e identifica la producción de gas de los organismos heterofermentativos obligados y facultativos.

Las placas Petrifilm utilizadas hoy en día por la mayoría de laboratorios de alimentos para el recuento de bacterias ácido lácticas presentan las siguientes características:

- Entorno anaeróbico autónomo habilitado por la tecnología de eliminación de oxígeno y películas de barrera de oxígeno. No se necesitan paquetes de gas, cámaras o incubadoras de CO₂.
- Resultados en 48 horas de tiempo de incubación.
- Las placas listas para usar eliminan la necesidad de una preparación de medios que requiera mucha mano de obra, diluyentes especiales y ajuste del pH de la muestra.
- Método todo en uno para la diferenciación de colonias productoras de gas sin tubos Durham o pasos adicionales.
- Las placas Petrifilm™ de 3M™ utilizan un 75% menos de energía, usan un 79% menos de agua, producen un 75% menos de gases de efecto invernadero y un 66% menos de desecho (en peso y volumen) en comparación con los métodos de agar competitivos.

MEDIOS DE CULTIVO

Los microorganismos por lo general pueden vivir y multiplicarse sobre substratos nutritivos preparados en el laboratorio, denominados medios de cultivo. Los Medios de Cultivo son preparados estériles que contienen sustancias necesarias para el desarrollo de los microorganismos.

Todos los microorganismos requieren agua, carbono, nitrógeno, hidrógeno, calcio, fósforo y hierro como elementos vitales. Los microorganismos exigentes requieren además factores de crecimiento como aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias que no son capaces de sintetizar.

CONDICIONES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

1. Contener sustancias nutritivas necesarias para el desarrollo de los microorganismos (tales como aminoácidos, carbohidratos, polialcoholes, vitaminas, minerales).
2. Tener un pH que permita un desarrollo óptimo, por lo general las bacterias patógenas necesitan un pH neutro o ligeramente alcalino (7.0 – 7.4), en cambio las levaduras y hongos requieren un pH ácido (5.0).
3. Estar previamente esterilizados o preparados en condiciones asépticas.

UTILIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

1. Aislamiento de bacterias desde una muestra o material patógeno (secreción purulenta, orina, órgano, etc.) o de un alimento (leche, carne, etc.)

2. Estudio morfológico de las colonias.
3. Conservación de cepas identificadas (colección de cepas microbianas o cepario).
4. Clasificación y tipificación de bacterias por estudio de sus propiedades bioquímicas en medios diferenciales.
5. Obtención de toxinas o investigación de sus características.
6. Cultivo y cosecha de bacterias para la elaboración de productos biológicos (vacunas, antígenos, bactericinas, toxoides, etc.).

SIEMBRA EN PROFUNDIDAD

Esta técnica tiene la ventaja de permitir el cálculo del número de bacterias presentes en la muestra, si se trabaja con exactitud. Las colonias aparecen distribuidas por toda la masa del agar. Aquellas que están en la superficie tendrán distintas características, dependiendo del tipo microbiano, mientras que las colonias que se desarrollan en el interior, bajo la superficie del agar, tienen forma lenticular, aunque los microorganismos que formen las distintas colonias sean de distinto tipo. Por tanto, las colonias que aparecen en la profundidad del agar son siempre biconvexas y no se diferencian unas de otras por su morfología. Aunque con esta técnica se obtienen colonias aisladas, generalmente sólo se utiliza para determinar el número de microorganismos viables en una muestra, cuando éstos son anaerobios facultativos o microaerófilos. (Bonilla, 2016).

MÉTODO RÁPIDO

Se puede decir que un método rápido es aquel que proporciona resultados en un tiempo menor al método convencional y que además es sencillo y confiable. Actualmente en el mercado se encuentran disponibles diferentes productos para la detección rápida y efectiva de microorganismos indicadores en la industria de alimentos (Nero y col., 2006)

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Selección de las cepas control

- ❖ **Selección de las bacterias ácido lácticas utilizadas como control para evaluar los métodos de conteo**

Se ha encontrado una gran cantidad de géneros y especies de BAL en productos cárnicos deteriorados que constituyen una diversidad significativa. Las especies pertenecientes al género *Lactobacillus* (p. Ej., *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus algidus*,

Lactobacillus fuchuensis, *Lactobacillus oligofermentans*) se asocian con acidificación severa, emisión de compuestos con olor desagradable y baba viscosa en el caso de las aves de corral, carne marinada, carne picada y cerdo almacenado al vacío o MAP (Audenaert et al., 2010, Doulgeraki et al., 2010, Jiang et al., 2010, Koort et al., 2005, Lyhs y Björkroth, 2008, Sakala et al., 2002a, Sakala et al., 2002b, Samelis et al., 2000). El género *Leuconostoc* (*p. Ej.*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc mesenteroides*) es muy frecuentemente responsable de la producción de ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético), generación de aroma mantecoso, formación de limo, soplado de paquetes y decoloración verde en todos los tipos de las condiciones de carne y empaque (Diez et al., 2009b, Nieminen et al., 2011, Samelis et al., 2006, Susiluoto et al., 2003, Vihavainen y Björkroth, 2007, Vihavainen y Björkroth, 2009). Además, *Carnobacterium* (*p. Ej.*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium maltaromaticum*) se encuentra muy a menudo en la carne de vacuno, aves de corral y cerdo en envases con bajo O₂ y las manifestaciones de deterioro infligido pueden variar (Casaburi et al., 2011, Ercolini et al., 2010a, Laursen et al., 2005, Nieminen et al., 2011, Rieder et al., 2012). Los miembros del género *Weissella* (*p. Ej.*, *Weissella viridescens*, *Weissella spp.*) Están más frecuentemente relacionados con el abultamiento de los paquetes de carne de pollo o asados y el deterioro de la carne picada, especialmente al vacío (Diez et al., 2009a, Nieminen et al., 2011, Samelis et al., 2006, Zhang et al., 2012). El género *Lactococcus*, aunque generalmente se asocia con procesos de fermentación láctea, abarca especies que deterioran la carne (*p. Ej.*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus raffinolactis*), que causan alteraciones principalmente en la carne almacenada en MAP o al vacío (Jiang et al., 2010, Rahkila et al. al., 2012, Sakala et al., 2002a). También ciertas especies del género *Enterococcus* (*por ejemplo*, *Enterococcus viikkiensis*, *Enterococcus hermannienseis*) se han encontrado en carne dañada, pero en poblaciones más bajas (Björkroth et al., 2005, Koort et al., 2004).

A partir de lo anterior se utilizaron dos cepas control de bacterias ácido lácticas homofermentativas, las cuales fueron *Lactobacillus plantarum* (homofermentativa facultativa) ATCC 8014 y *Lactococcus lactis ssp lactis* (homofermentativa estricta). Ambas cepas se encontraban en pase número 2.

PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN

4.2 Preparación medio APT

- ❖ Se tomaron 29.75 g de medio y se diluyeron en 500 ml de agua destilada, mezclar y fundir a una temperatura entre 95 a 100° C hasta lograr una apariencia translúcida.
- ❖ Una vez homogenizado y fundido, se dejó reposar por 15 minutos y se adicionó 10 g de Sacarosa más 1 ml de Purpura de bromocresol como indicador de pH.
- ❖ Se realizó una esterilización en autoclave a 121°C por 15 minutos y se guardó una temperatura de 59+/- 2°C hasta su utilización.

4.3 Siembra en agar APT

- ❖ Se toma 1 ml de las diluciones a trabajar tanto con las cepas control como con las muestras cárnicas y no cárnicas (- 1 y -3), se sembró en profundidad en cajas estériles, se adicionó 20 +/- 5 ml de agar APT en cada caja y dejar solidificar el medio.
- ❖ Se siembra a 35 +/- 2 °C por 48 horas.
- ❖ Hacer recuento de aquellas colonias que presenten una zona de color amarillo, debido a la presencia de ácido e indicado por el púrpura de bromocresol.

4.4 Siembra en placa Petrifilm 3M LAB

- ❖ Se coloca la placa Petrifilm 3M LAB en una superficie plana y nivelada, levantar la película superior.
- ❖ Con la pipeta perpendicular a la placa se toma 1 ml de las diluciones a trabajar (-1 y -3) y se deposita el líquido en el centro de la película.
- ❖ Se deja caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formen burbujas.
- ❖ Se coloca suavemente el dispersor sobre la parte central de la placa donde se encuentra la muestra y hacer presión por 30 segundos.
- ❖ Se espera aproximadamente 2 minutos para que se solidifique el gel e incubar a 35 +/- 2°C por 48 horas.
- ❖ Pasado este tiempo se hace recuento de aquellas colonias que presenten un color rojizo con formación o no de gas.

PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS

4.5 Análisis y comparación de los métodos con las cepas control

- ❖ A partir de las cepas control seleccionadas anteriormente, se realizó un patrón Mac Farlan N°2 (6.08×10^8 células) en 6 ml de solución salina estéril al 0.8% para utilizarse como concentración inicial.
- ❖ Una vez se tiene la concentración inicial, se realizó diluciones seriadas en base diez hasta la dilución -3, logrando de esta manera tener una buena lectura tanto en las placas 3M LAB como en el agar APT.
- ❖ Se tomó 1 ml de las dos diluciones -1 y -3 y se sembró por duplicado en agar APT (sacarosa al 10% + 1 ml de purpura de bromocresol), se hizo lo mismo en placas Petrifilm 3M LAB para bacterias ácido lácticas.
- ❖ Se hizo recuento de los microorganismos característicos para cada método

4.6 Pruebas con matrices cárnicas y no cárnicas sin cepas control

- ❖ Se tomó asépticamente 10 g de una muestra cárnica y no cárnica utilizada en la realización de un producto embutido susceptible a la presencia de bacterias ácido láctico y adicionar 90 ml de APE.
- ❖ Se realizó una homogenización completa utilizando un Stomacher, y realizar dos diluciones seriadas a partir de la primera hecha anteriormente. Sembrar 1 ml de la dilución -1 y -3 en agar APT y placas Petrifilm 3M LAB.

4.7 Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos a partir de los recuentos tanto en placa Petrifilm 3M LAB como en la siembra en agar APT, se utilizó el programa estadístico R. Se realizó un análisis de varianza para observar si hay diferencias entre los métodos y una prueba t de student para ver qué tan significativas son esas diferencias. En este análisis se propone como hipótesis nula que ambos métodos de recuento presentan igualdad de varianzas.

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD/ FECHA	AGOSTO 2018	SEPTIEMB RE 2018	OCTUBRE 2018	NOVIEMBR E 2018	DICIEMBR E 2018	ENERO 2019	FEBRERO 2019
Inducción y entrenamiento al laboratorio de Microbiología							
Preparación de material y medios de cultivo							
Diligenciamiento de Formatos control de calidad de autoclaves, control de preparación de medios de cultivo							
Análisis microbiológico de agua potable							
Análisis microbiológico de producto terminado							
Análisis microbiológico de Patógenos en equipo VIDAS							
Análisis microbiológico de Superficies							
Análisis Microbiológico de ambientes							
Análisis microbiológico superficies <i>Listeria</i> e indicadores							
Análisis microbiológico de estabilidades y seguimientos							

Análisis microbiológico de manipuladores							
Controles internos del Laboratorio							
Mantenimiento cepario							
Control de Calidad Métodos de Análisis y medios de Cultivo							
Presentación proyecto por parte del laboratorio y revisión bibliográfica							
Siembra, recuento y análisis de bacterias ácido lácticas en matrices cárnicas y superficies (APT Y PETRIFILM 3M)							
Desarrollo trabajo escrito							

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Recuento en medio APT y Placa 3M Petrifilm para bacterias ácido lácticas a partir de las cepas de trabajo sin matriz

Tabla 1: Recuento bacterias ácido lácticas a partir de la cepa de control 1 de trabajo *Lactobacillus plantarum* sin matriz.

Esta tabla presenta los valores dados para el recuento de *Lactobacillus plantarum* en medio APT y en Placa Petrifilm durante 7 semanas, para observar la variabilidad que puedan tener estos medios.

<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	SEMANA	RECuento EN PROFUNDIDAD APT 48 H In UFC/ ml		RECuento EN PLACA PETRIFILM 3M 48 H In UFC/ml	
		Dilución 10-6	Dilución 10-6	Dilución 10-6	Dilución 10-6
		1	16,1181	16,30042	16,01274
		17,9899	16,45457	16,30042	16,38046
2		17,28125	16,32511	17,28125	15,2265
		17,55318	17,68671	14,84513	15,09644
3		17,39903	16,951	17,18281	16,75995
		16,951	14,97866	16,70588	16,99356
4		16,30042	15,60727	16,90655	17,34187
		16,1181	16,5881	14,94691	14,84513
5		15,2018	16,30042	14,50866	17,55318
		14,91412	15,60727	17,18281	14,94691
6		16,30042	14,91412	15,2018	15,76142
		15,76142	14,45736	14,55745	17,34187
7		17,90986	16,38046	13,71015	13,45884
		14,50866	16,64872	13,91082	14,45736

Excel, 2010

El recuento observado durante el proceso de siembra a partir de las cepas de trabajo utilizadas *Lactobacillus spp* y *Lactococcus lactis sup lactis* como estándar denota la capacidad que tiene cada método para mantener y aumentar la viabilidad durante el periodo de incubación. En las siguientes tablas se muestran los recuentos dados para cada uno de los microorganismos en las diluciones -1 y -6 siendo esto siembra por duplicado.

Tabla 2: Análisis de varianza para el recuento de *Lactobacillus plantarum*

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Dilución 10-6 AGAR APT	14	225,2002003	16,08572859	0,766250539		
Dilución 10-6 PLACA 3M	14	219,2533709	15,66095506	1,633371455		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los	F	Probabilidad	Valor crítico para F

			<i>cuadrados</i>			
Entre grupos	1,263027848	1	1,263027848	1,052689007	0,314340105	4,225201273
Dentro de los grupos	31,19508592	26	1,199810997			
Total	32,45811377	27				

Programa R, 2018

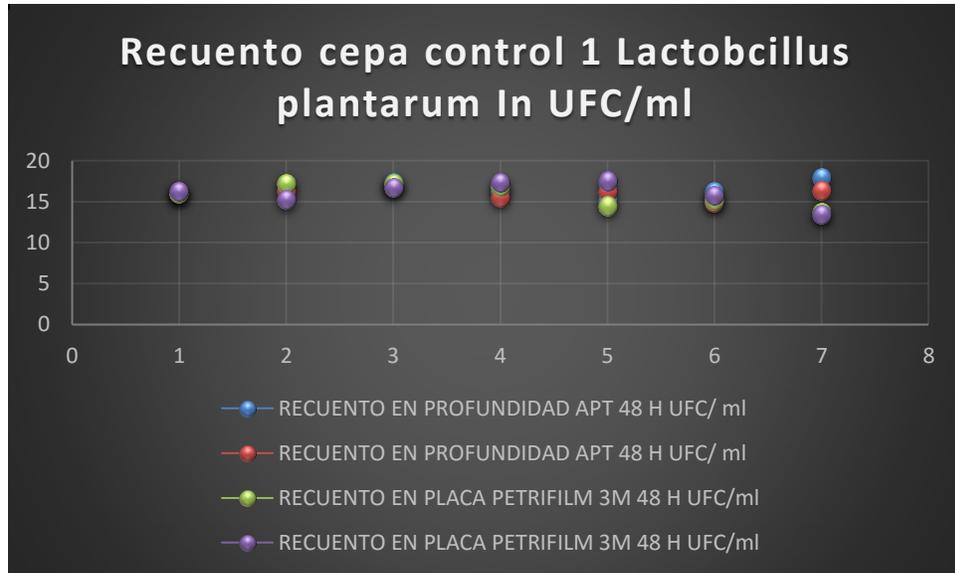
Tabla 3: Prueba t para el recuento de *Lactobacillus plantarum*

	<i>Dilución 10-6 AGAR APT</i>	<i>Dilución 10-6 PLACA 3M</i>
Media	16,08572859	15,66095506
Varianza	0,766250539	1,633371455
Observaciones	14	14
Varianza agrupada	1,199810997	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	26	
Estadístico t	1,026006339	
P(T<=t) una cola	0,157170053	
Valor crítico de t (una cola)	1,70561792	
P(T<=t) dos colas	0,314340105	
Valor crítico de t (dos colas)	2,055529439	

Programa R, 2018

Al analizar la prueba de varianzas se arroja un nivel de significancia o probabilidad de 0.3143, anexándolo a la prueba t que arroja un valor p de 0.1571, siendo este último menor al valor α , por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se concluye que no todas las medias son iguales, por lo que se presentan diferencias significativas entre ambos métodos.

Gráfico 1: Recuento de *Lactobacillus plantarum* en agar APT y Placa Petrifilm, dilución 10-6



Excel, 2010

En la comparación gráfica de ambos métodos demuestra que las placas Petrifilm 3M presentan la mayor recuperación de microorganismos, al tener el número más alto de recuento, además se muestra que entre ambos métodos no hay una gran similitud en el desarrollo y crecimiento de cepa control 1.

La siguiente tabla se denota el recuento obtenido a partir de la siembra de la segunda cepa control durante siete semanas para la comparación de los métodos de crecimiento.

Tabla 4: Recuento bacterias ácido lácticas a partir de la cepa 2 de trabajo *Lactococcus lactis ssp lactis* sin matriz

<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	SEMANA	RECuento EN PROFUNDIDAD In UFC/ml APT 48 H		RECuento EN PLACA PETRIFILM 3M In UFC/ml 48 H	
		Dilución 10-6	Dilución 10-6	Dilución 10-6	Dilución 10-6
	1	18,909261	18,757153	18,627695	18,852463

		18,792244	18,749984	18,819457	18,933504
	2	18,839391	18,852463	19,316769	18,939475
		18,778355	18,819457	18,812723	18,845948
	3	18,698312	18,635792	19,257928	19,108815
		18,667541	18,603002	19,352845	19,213673
	4	18,799117	18,728165	19,103778	19,046619
		18,675323	18,71335	19,257928	19,051953
	5	18,927498	18,980297	18,884415	18,792244
		18,974566	18,921456	18,939475	18,884415
	6	18,643824	18,627695	19,046619	19,078201
		18,728165	18,683045	18,915377	18,698312
	7	18,865367	18,819457	18,635792	19,262248
		18,619532	18,698312	18,915377	18,771338

Excel, 2010

El recuento para la cepa control 2 *Lactococcus lactis sup lactis* denota que hubo más recuperabilidad en las placas Petrifilm que el agar APT, pero en ambos métodos se distinguen las colonias de manera adecuada y no se presentan problemas en el recuento.

Tabla 5: Análisis de Varianza Recuento *Lactococcus lactis sup lactis*

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Dilución 10-6 Agar APT	14	262,5896296	18,75640211	0,012357156		
Dilución 10-6 Placa Petrifilm	14	265,8861769	18,99186978	0,056937388		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de	Suma de	Grados de	Promedio de	F	Probabilidad	Valor crítico

<i>las variaciones</i>	<i>cuadrados</i>	<i>libertad</i>	<i>los cuadrados</i>			<i>para F</i>
Entre grupos	0,388115157	1	0,388115157	11,20189654	0,002496986	4,225201273
Dentro de los grupos	0,900829073	26	0,034647272			
Total	1,28894423	27				

Programa R, 2018

Tabla 6: Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

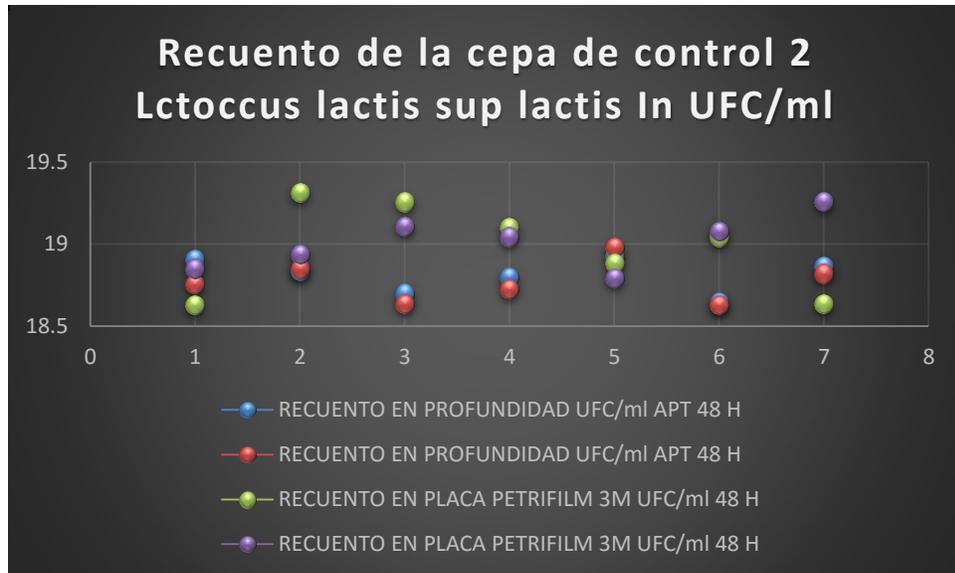
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	<i>Dilución 10-6 Agar APT</i>	<i>Dilución 10-6 Placa Petrifilm</i>
Media	18,7564021	18,9918698
Varianza	0,01235716	0,05693739
Observaciones	14	14
Varianza agrupada	0,03464727	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	26	
Estadístico t	-3,34692344	
P(T<=t) una cola	0,00124849	
Valor crítico de t (una cola)	1,70561792	
P(T<=t) dos colas	0,00249699	
Valor crítico de t (dos colas)	2,05552944	

Programa R, 2018

De nuevo en el análisis del recuento para segunda cepa control, se puede observar que el nivel de significancia es de 0,002496 en la prueba Anova es mayor que el valor p reflejado en la prueba t que es de 0,001248, por lo cual también se rechaza la hipótesis nula y se confirma que hay diferencias entre ambos métodos.

Gráfico 2: Recuento *Lactococcus lactis sup lactis* en agar APT y placa Petrifim



Excel, 2010

El análisis gráfico presenta una mayor variación en el recuento de la segunda cepa control (*Lactococcus lactis sup lactis*), en comparación con la primera cepa control (*Lactobacillus plantarum*), pero para ambos microorganismos el método que presenta mayor desarrollo y recuperabilidad son las placas Petrifilm 3M LAB, y además se puede comprobar que si existen diferencias entre ambos métodos ya que hay dispersión entre los diferentes recuentos en las siete semanas de estudio.

6.2 Recuento en medio APT y placa 3M Petrifilm para bacterias ácido lácticas a partir de matrices cárnicas y no cárnicas

Tabla 7: Recuento de bacterias ácido lácticas a partir de matrices cárnicas y no cárnicas

MNPC: Muy numeroso para contar

BAL: Bacterias ácido lácticas

SEMANA	MATRIZ	RECUENTO EN PROFUNDIDAD APT 48 H		RECUENTO EN PLACA PETRIFILM 3M 48 H	
		Dilución 10-1	Dilución 10-3	Dilución 10-1	Dilución 10-3
1	Albóndigas	<10	<10	73000	100000
	Hamburguesa de soya	4000	<10	5000	<10
	Salchicha Rellena de Queso	135000	50000	178000	7700000
2	Salchicha	6880	31000	MNPC	14000
	Albóndigas	5800	128000	MNPC	300000
	Hamburguesa de soya	MNP, Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	920000	MNPC	580000
	Hamburguesa de soya	MNPC, Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	33000	4900	4000
	Hamburguesa de soya	90	<10	40	<10
	Salchicha Rellena de Queso	MNPC, Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10	MNPC	1440000
	Salchicha Rellena de Queso	MNPC, Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	380000	MNPC	11000
	Hamburguesa	2240	<10	<10	<10
	Hamburguesa de soya	MNPC, Crecimiento macroscópico diferente a las	24000	MNPC	<10

		BAL			
	Hamburguesa de soya	MNPC, Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	17000	MNPC	45000
	Salchicha Rellena de Queso	MNPC	488000	MNPC	600000
	Salchicha Rellena de Queso	MNPC	176000	MNPC	380000
	Hamburguesa	MNPC , Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10 Crecimiento otro microorganism o	<10	<10
4	Hamburguesa de soya	MNPC , Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	160000	MNPC	<10
	Salchicha Rellena de Queso	MNPC, Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	1400000	MNPC (Homo y hetero)	4600000 0
	Salchicha Rellena de Queso	MNPC	12800000	MNPC	1290000 0
	Hamburguesa	<10 , Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10 (Crecimiento otro microorganism o)	80	<10
	Salchicha	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	Crecimiento otro microorganism o	<10	<10
	Albóndigas	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	Crecimiento otro microorganism o	<10	<10

	Salchicha	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10	<10
5	Salchicha	<10	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10	<10
	Salchicha	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10	<10
	Salchicha	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10	<10
	Salchichón cervecero	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10	<10
	Costilla de Cerdo	3680, Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	40000	18000	50000
	Mezcla Ahumado Especial Líquido	<10	<10	<10	<10
	Ajo en Polvo	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	4000	<10
	Cebolla en Polvo	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	MNPC	600000
	Pimienta Negra Molida	MNPC	5000	MNPC	3800000
	Mezcla Saborizar Paprika Soluble	<10	<10	<10	<10

	Dextrosa Monohidratada	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10	<10
	Pimienta Liquida Concentrada	<10	<10	<10	<10
	Salmuera Inicial	MNPC	21600	MNPC	64000
	Salmuera Final	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	23200	MNPC	84000
	Producto durante proceso	MNPC	4200	MNPC	600000
	Salida Colgado	MNPC	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	MNPC	360000
	Salida Proceso Térmico	<10	<10	<10	<10
	Costilla durante Proceso Frio Intensivo	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10	<10	<10
	Salida Proceso Descuelgue Costilla	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10	<10	<10
	Salida Proceso Corte Costilla	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10	<10	<10
	Salida Proceso Pesaje y Embolsado costilla	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10	<10	<10
	Salida Almacenamiento en cava costilla	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10	<10	<10
	Costilla	Crecimiento macroscópico	<10	<10	1000

		diferente a las BAL			
7	Salchicha	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10	<10	<10
	Salchicha	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10	<10	<10
	Salchicha	Crecimiento macroscópico diferente a las BAL	<10	<10	<10

Excel, 2010

Tabla 8: Análisis de varianza recuento bacterias ácido lácticas en matrices cárnicas y no cárnicas

RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Dilución 10-1	49	308,9088101	6,304261432	74,56472378		
Dilución 10-3	49	191,2511667	3,903085034	27,48895794		
Dilución 10-1	49	678,58532	13,84868	285,2444935		
Dilución 10-3	49	260,1490478	5,309164241	41,35234288		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>

es						
Entre grupos	2909,2447 26	3	969,74824 21	9,0493136 13	1,23868E- 05	2,651640 33
Dentro de los grupos	20575,224 87	192	107,16262 95			
Total	23484,469 59	195				

Programa R, 2018

Tabla 9: Prueba t en el recuento de bacterias ácido lácticas en matrices cárnicas y no cárnicas

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	<i>Dilución 10-3</i>	<i>Dilución 10-1</i>
Media	6,850238085	20,08264866
Varianza	28,58063021	147,5281073
Observaciones	14	14
Varianza agrupada	88,05436878	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	26	
Estadístico t	-3,730890764	
P(T<=t) una cola	0,000469699	
Valor crítico de t (una cola)	1,70561792	
P(T<=t) dos colas	0,000939397	
Valor crítico de t (dos colas)	2,055529439	

Programa R, 2018

El valor p para el análisis del recuento de bacterias ácido lácticas en matrices cárnicas y no cárnicas, es menor al nivel de significancia encontrado en el test t, con lo cual también se rechaza la hipótesis de igualdad entre los métodos. A partir de lo cual se puede confirmar que ambos métodos no determinan los mismos resultados, y al hacer la comparación se muestra que en el agar APT hay

crecimiento de otro tipo de microorganismo diferente a las bacterias ácido lácticas que son el microorganismo objetivo en este caso; además no permite la diferenciación entre ambos tipos de BAL. En este caso, se puede determinar que la mejor opción para determinar estas bacterias en la producción de alimentos cárnicos podría ser el uso de placas Petrifilm 3M LAB.

Gráfico 3: Recuento de bacterias ácido lácticas en agar APT y placa Petrifilm a partir de matrices cárnicas y no cárnicas



Excel, 2010

La gráfica demuestra que el crecimiento es mayor en las placas Petrifilm 3M LAB en comparación con el agar APT, además que estas placas al tener componentes selectivos solo permiten el crecimiento de BAL y crean un ambiente adecuado para su desarrollo.

Tabla 10: Porcentajes de crecimiento de Bacterias ácido Lácticas en medio APT y en Placas Petrifilm

MICROORGANISMO CONTROL	PROMEDIO RECUESTO MEDIO APT UFC In/ml	PROMEDIO RECUESTO PLACAS PETRIFILM UFC In/ml
Microorganismo 1	16.26812307	15.77250994
Microorganismo 2	16.27265128	18.9773352
Recuento con matrices cárnicas y no cárnicas	13.46210467	14.77778437
Porcentaje de recuperación en los medios	38%	40,92%

Excel, 2010

Al realizar la comparación estadística de los porcentajes de crecimiento para ambos métodos, evidenciada en la tabla 10, se observa que las bacterias ácido lácticas presentan un porcentaje de desarrollo mayor en las placas Petrifilm 3M LAB en comparación con el medio APT (2.92% más alto), además que en ellas solo se presenta el crecimiento de colonias características a las BAL, mientras que en el medio APT hubo crecimiento macroscópico diferente al esperado.

En las imágenes 1 y 2 se puede observar que el crecimiento de bacterias ácido lácticas va disminuyendo conforme se realiza el proceso térmico de los productos embutidos, durante este cambio de fases la viabilidad de los microorganismos disminuye. La mayoría de productos que presentaron un proceso térmico no presentó crecimiento de BAL en ninguno de los dos métodos, lo cual indica que su persistencia en alimentos puede variar dependiendo el ambiente y las condiciones en las cuales se pueda encontrar.

En la imagen 1 se observa el crecimiento de BAL en ambos medios de crecimiento, pero las placas Petrifilm generan un mejor recuento que el medio APT, ya que este medio al no tener una sustancia selectiva y tener mayor cantidad de fuente de carbono con la sacarosa adicionada, permite el crecimiento de diferentes grupos de microorganismos, lo cual no sucede en las placas Petrifilm. En la imagen 2 se observa crecimiento solo en el medio APT, con morfología macroscópica atípica al desarrollo de BAL en este medio, lo que indica que posiblemente se trate de un microorganismo diferente a este grupo de bacterias que interfiere en el recuento y reconocimiento de las mismas.

En cuanto a los procesos de salmuera se observa el crecimiento en ambas técnicas, lo que puede sugerir que pueden sobrevivir ambientes diferentes a condiciones de salinidad anormal. Sugiriendo así que estos microorganismos pueden cambiar las características físicas. Las matrices cárnicas crudas

presentan una carga microbiana alta lo cual es un problema a la hora de hacer la siembra en agar APT, pues es un medio adecuado para todo tipo de microorganismo y no permite una fácil identificación de las bacterias objetivo.

Uno de los productos no cárnicos donde se observó mayor crecimiento de BAL fue en la pimienta, como se observa en la Imagen 6, a la hora de realizar el recuento no fue posible distinguir las colonias en agar APT ya que esta matriz presenta alta carga microbiana y el medio permitió el crecimiento de esta microbiota impidiendo así el conteo y distinción de las bacterias ácido lácticas, lo que no ocurrió en las placas Petrifilm.

Las imágenes 8, 9 y 10 muestran el crecimiento en matrices no cárnicas que son utilizadas en la fabricación de embutidos, mostrando así que otros componentes diferentes a la carne pueden aumentar el desarrollo de BAL. Además en la Imagen 10 se observa que en las placas Petrifilm puede verse la distinción y diferenciación de bacterias ácido lácticas homo y heterofermentativas, sugiriendo que si se desea observar esta clasificación es mejor la utilización de estas placas, aunque se hace necesario verificar con una cepa control Heterofermentativa. En la imagen 10 y 11 la diferenciación entre los tipos de bacterias homofermentativas y heterofermentativas se logra observar en las placas Petrifilm debido a la formación de gas y las burbujas presentes en las mismas. Mientras que comparándolo con el método tradicional en agar APT no se puede diferenciar, además que el agar se presenta contaminado evitando así un buen recuento.

Los productos terminados, que han tenido varios procesos térmicos, ya no presentan crecimiento de bacterias ácido lácticas, en ninguno de los dos métodos de recuento. (Imágenes 14-19)

Uno de los principales problemas que se presentan en las cajas de agar APT, es el crecimiento por parte de otros microorganismos, como se logra ver en las imágenes 20 y 21, ya que este medio al ser rico nutritivamente y al no tener sustancias selectivas, aporta el ambiente adecuado para el desarrollo de otros organismos presentes en las muestras.

Las evidencias gráficas denotan con claridad que el crecimiento de bacterias ácido lácticas en ambos métodos es buena, pero se debe tener en cuenta que el agar APT genera crecimiento de otros microorganismos evitando una buena lectura, además en este medio no se logra diferenciar entre las bacterias homofermentativas de las heterofermentativas, siendo posiblemente viable en las placas Petrifilm.

Se reconocen las bacterias ácido lácticas en ambos métodos, las placas Petrifilm 3M LAB generan colonias rojas con o sin gas dependiendo si son homo o heterofermentativas, en el agar APT las colonias características crecen de forma ovalada con halo amarillo debido al indicador de pH que es el purpura de bromocresol.

En las imágenes 31 y 32 se observan los crecimientos de las cepas utilizadas como control, ambos métodos presentaron un desarrollo positivo para ambos microorganismos, esto se debió en parte a que al estar las cepas puras y libres de contaminación no se presentó ningún otro crecimiento en el agar APT, lo cual favoreció su recuento y reconocimiento de las respectivas colonias en el agar. Tanto en la siembra en profundidad, como en la placa Petrifilm se pueden realizar los recuentos favorablemente, cosa que no sucede cuando se utilizan matrices cárnica y no cárnica en el agar APT, ya que al contener una carga microbiana diversa puede inhibir o interferir en el desarrollo y recuento de BAL.

Se hace necesario que para próximas investigaciones, se utilice una cepa control que sea heterofermentativa con lo cual se podrá confirmar asertivamente la capacidad de ambos medios de diferenciar los tipos de BAL presentes en las muestras a analizar.

Conclusiones

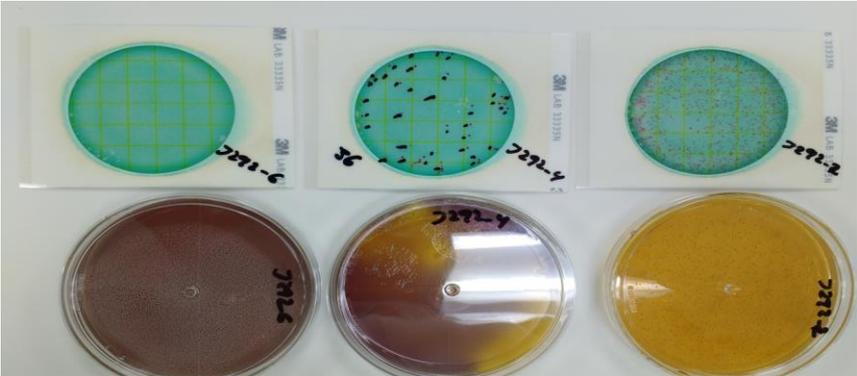
- Al realizar la comparación de ambos métodos de recuento para el estudio de bacterias ácido lácticas se observó que es mejor utilizar las placas Petrifilm frente al agar APT en el análisis de matrices cárnicas y no cárnicas, ya que crea un mejor ambiente de desarrollo para estos microorganismos y le permite al investigador un correcto recuento a la hora de realizar análisis en productos cárnicos.
- Se comprobó que existen diferencias significativas entre ambos métodos de recuento, donde hay mayor recuperación en las placas Petrifilm (40.92%) en comparación con el agar APT (38%) donde no hay selectividad en productos complejos. Además, que las placas Petrifilm presentan certificado de calidad y aprobación AFNOR, mientras que el uso de agar APT tiene muy poca información y no está avalado por ninguna institución.
- Las placas Petrifilm presentan una alta capacidad de diferenciación entre bacterias homo y heterofermentativas, gracias a que pueden crear un ambiente anaerobio, mientras que el método de siembra en profundidad por agar APT no permite hacer una clara distinción de las dos clases de bacterias ácido lácticas y genera problemas de lectura al permitir el crecimiento de un sinnúmero de microorganismos.
- Al realizar el trabajo, se puede deducir que para el análisis de bacterias ácido lácticas en productos cárnicos el método más confiable es el uso de placas Petrifilm, en primer lugar porque muestran mayor recuperabilidad que el agar APT, no se gastan más materiales ni tiempo debido a que se evita el proceso de elaboración del medio, ocupan menos espacios que las cajas de Petri, al igual que se generan menos desechos y pueden permitir la diferenciación de este tipo de bacterias para futuros experimentos o estudios a partir de las mismas.

Recomendaciones:

- Es importante que a la hora de utilizar las placas se presione bien la película superior para expandir totalmente el líquido sobre el medio.
- La dilución de la muestra es importante para lograr un mejor recuento de las bacterias ácido lácticas.
- No colocar más de 20 placas juntas a la hora de incubar.
- Se hace necesario que el laboratorio cuente con un método que sea avalado por instituciones reconocidas para futuras auditorias.
- Es de gran importancia corroborar la capacidad de diferenciación de Bacterias ácido Lácticas en el laboratorio con la utilización de una cepa Heterofermentativa control.

ANEXOS

Imagen 1: Costilla



Laboratorio microbiología, 2018

Imagen2: Costilla con proceso Térmico

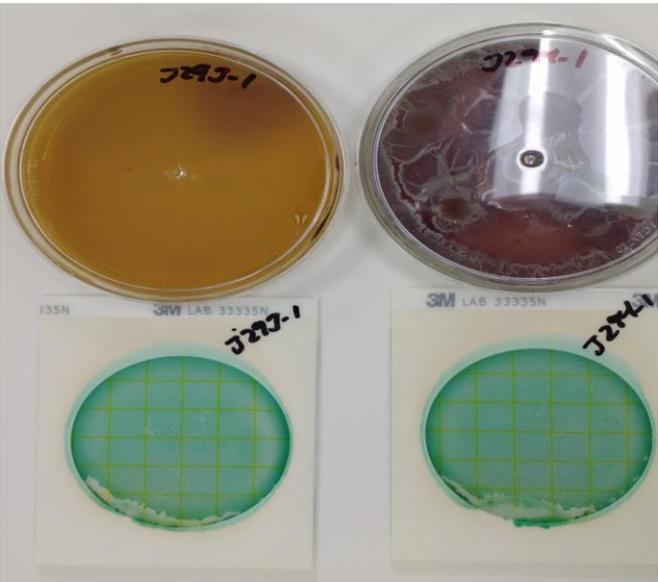
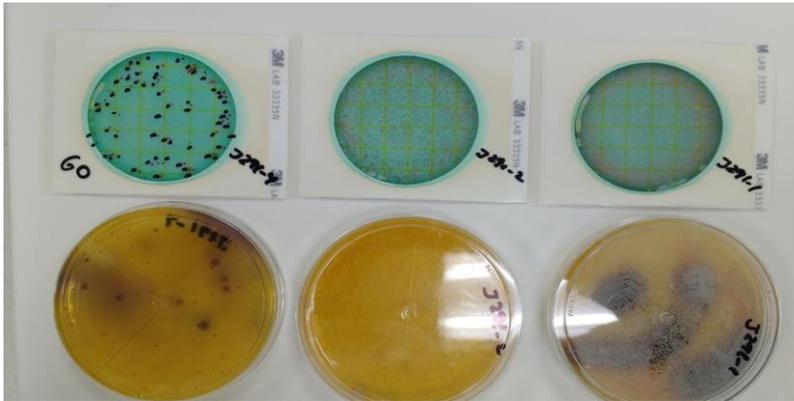
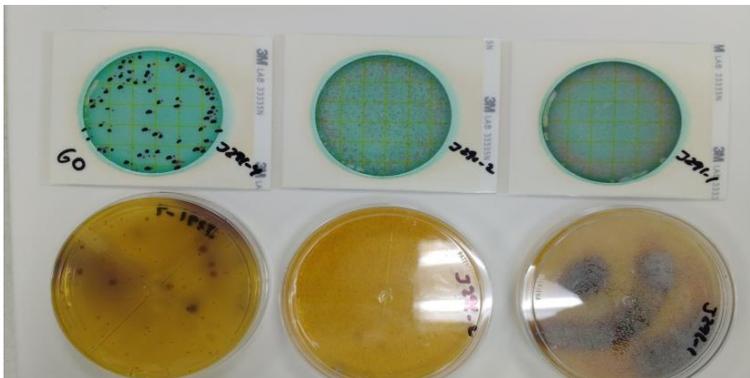


Imagen 3: Salida Proceso Frio Intensivo



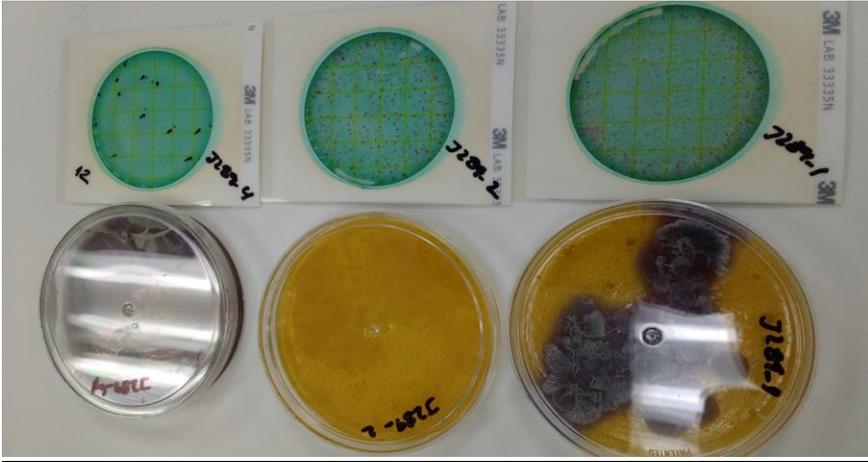
Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 4: Proceso salmuera final de la costilla



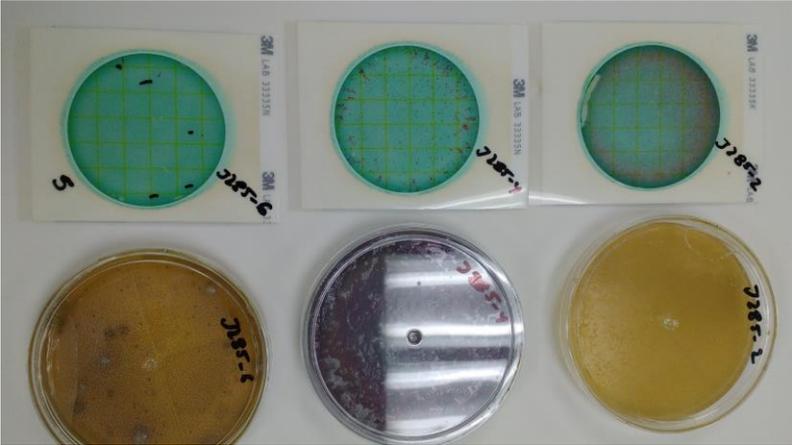
Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 5: Salmuera Inicial Costilla



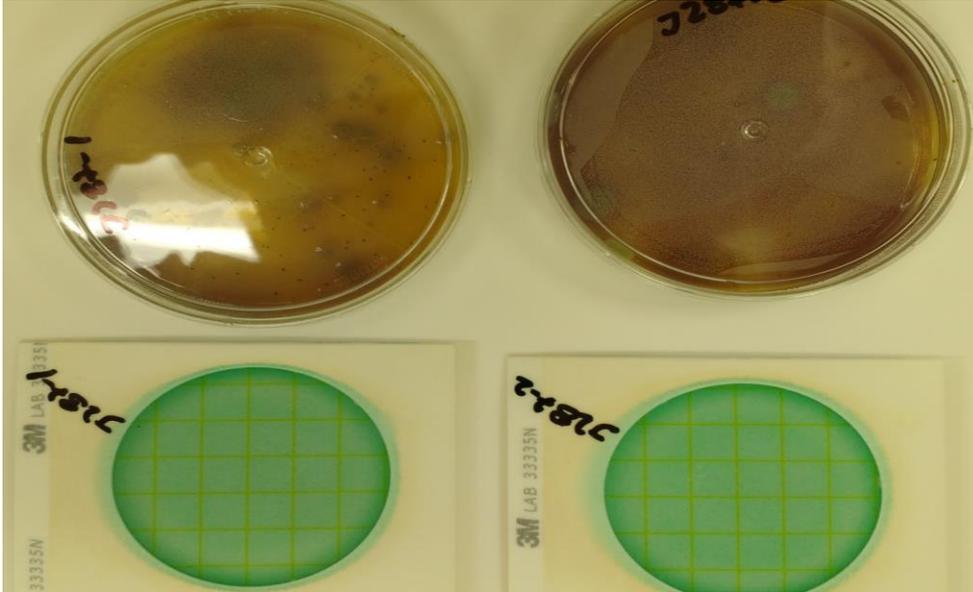
Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 6: Pimienta Liquida Concentrada



Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 7: Dextrosa Monohidratada



Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 8: Mezcla Saborizante Paprika Soluble

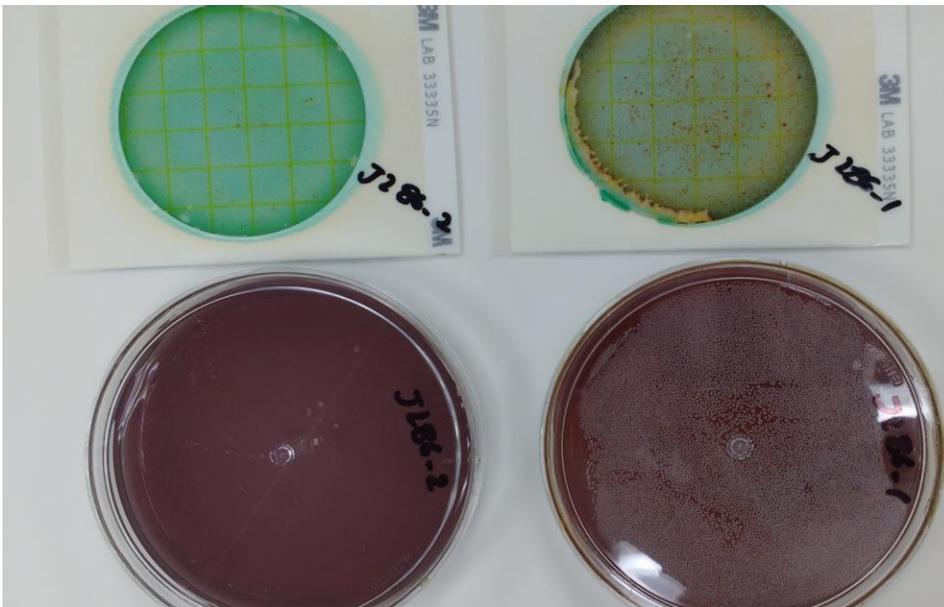
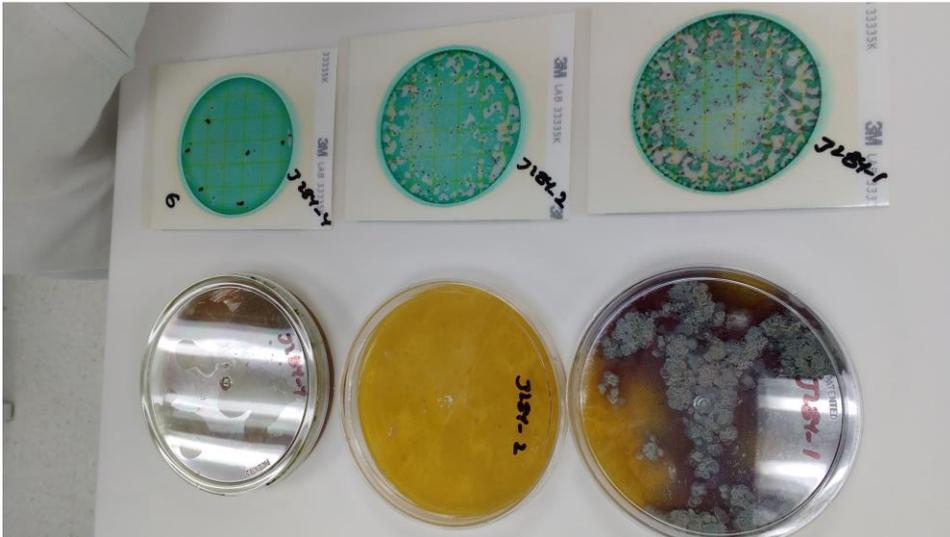
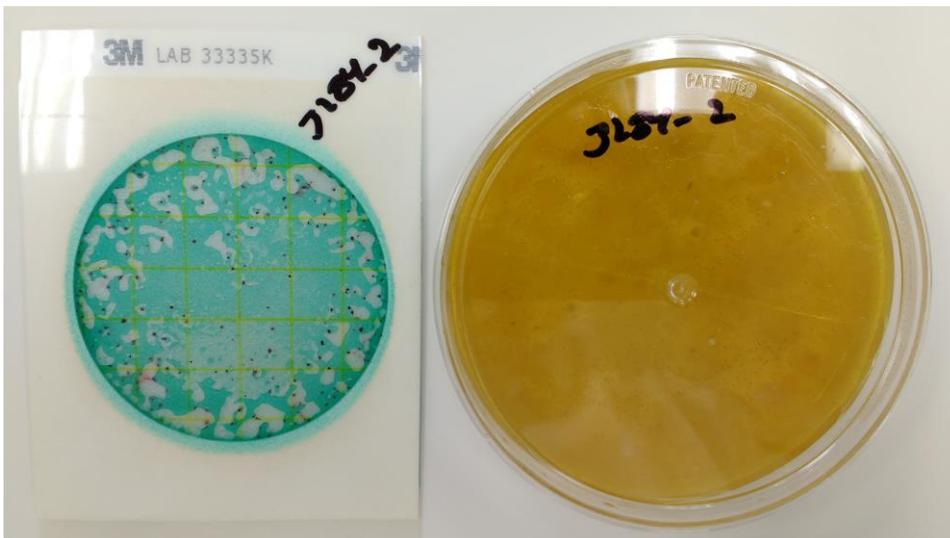


Imagen 9: Pimienta Negra Molida



Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 10: Cebolla en Polvo (Diferenciación de BAL homo y hetero fermentativas)



Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 11: Placa Petrifilm con crecimiento de bacterias ácido lácticas heterofermentativas



Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 12: Cebolla en Polvo con diferentes diluciones

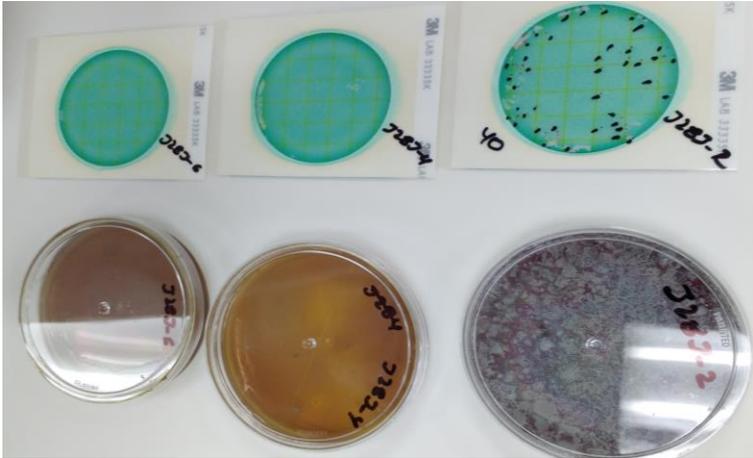
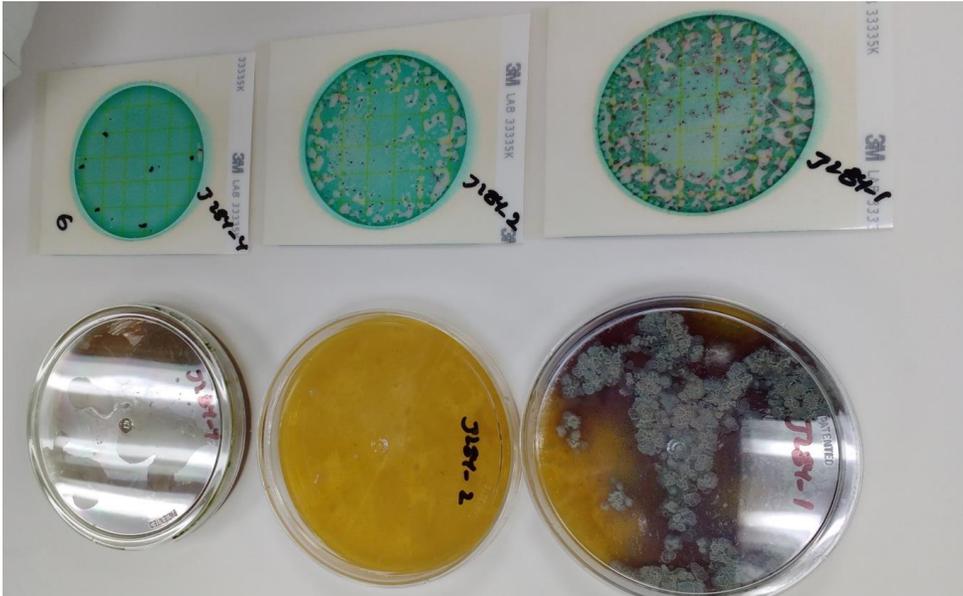
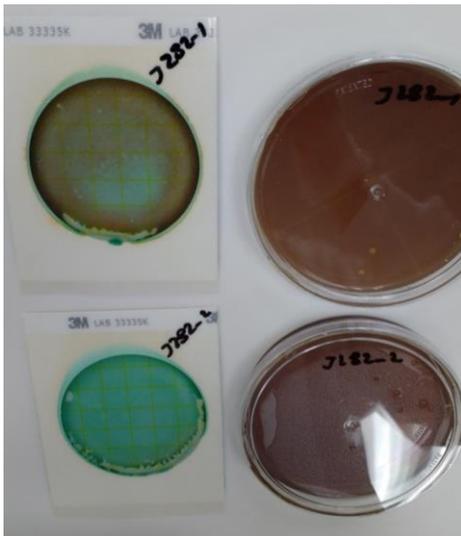


Imagen 13: Ajo en Polvo



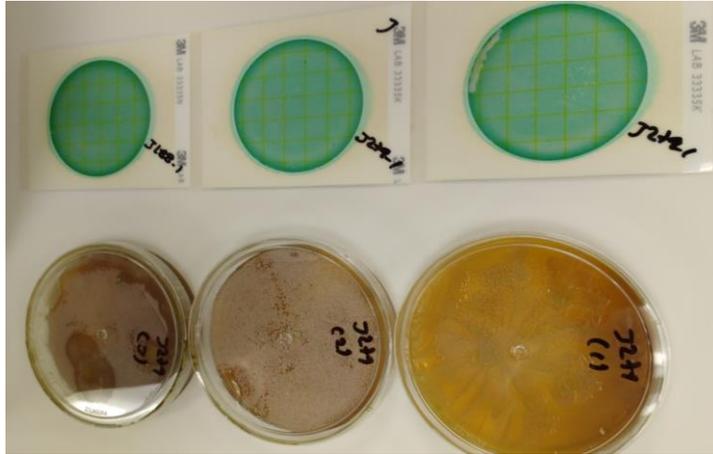
Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 14: Mezcla Ahumado Especial Líquido



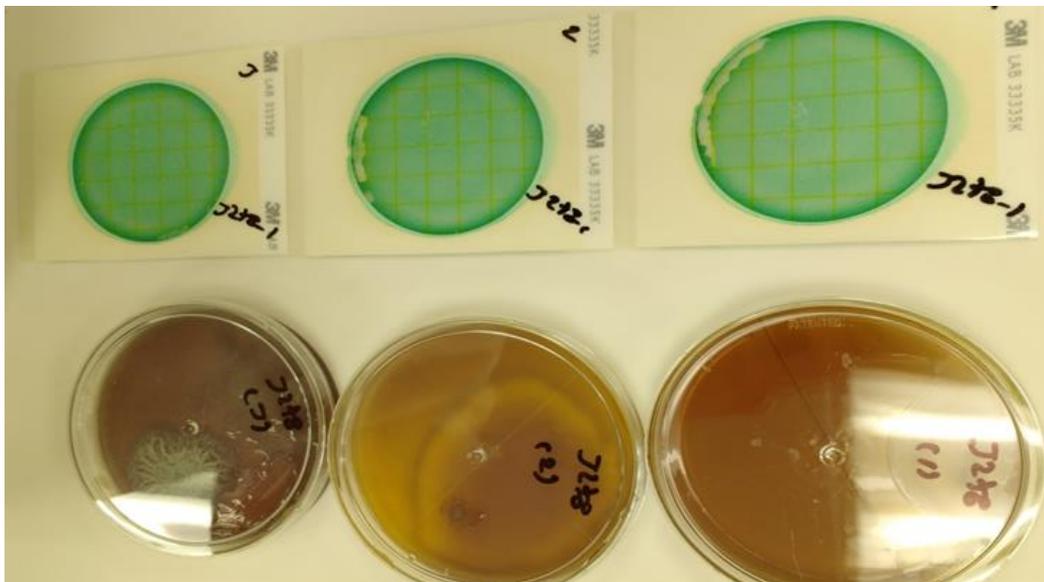
Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 15: Costilla de Cerdo



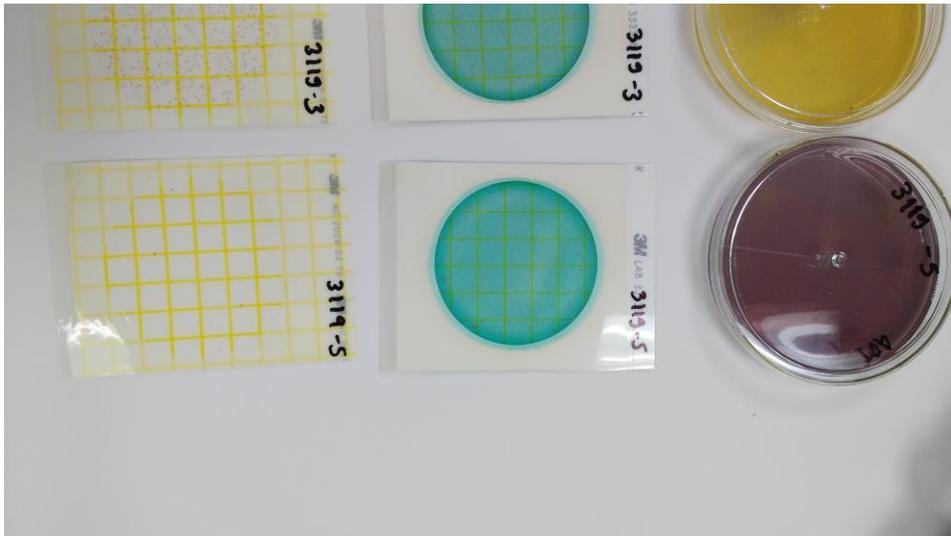
Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 17: Salchichón tradicional



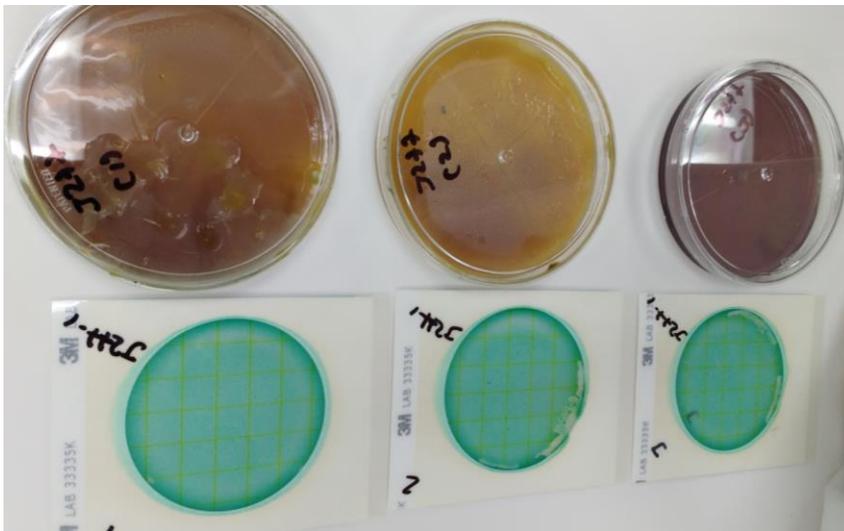
Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 18: Salchicha Perro caliente



Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 19: Salchicha Perro caliente



Laboratorio microbiología, 2018

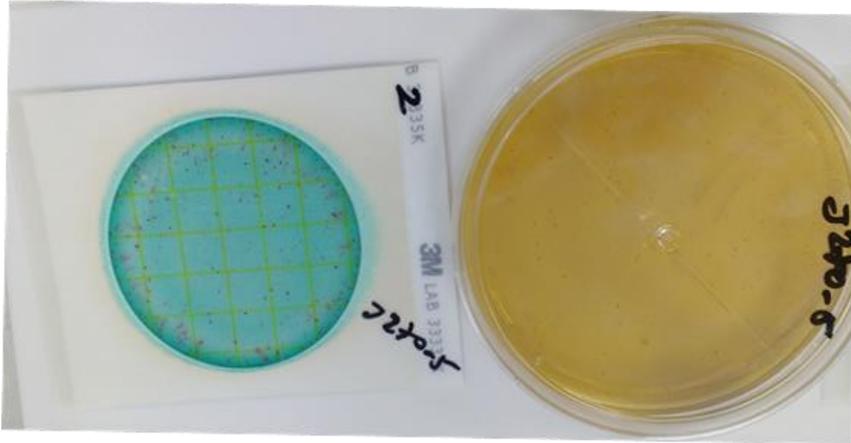
Imagen 20: Contaminación en el agar APT



Imagen 21: Contaminación agar APT, difícil recuento.

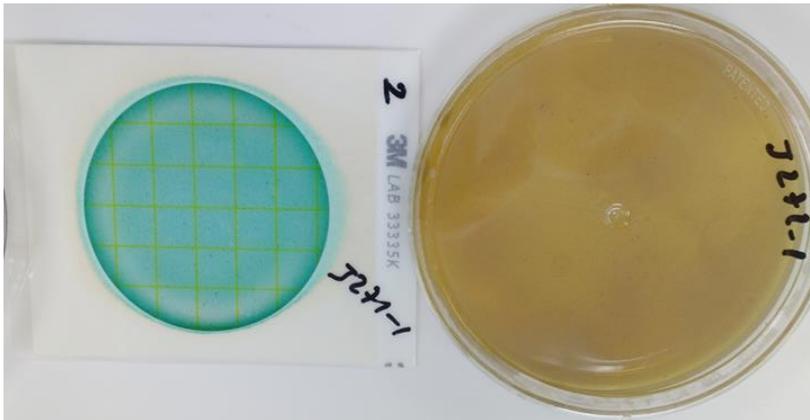


Imagen 22: Hamburguesa cocida



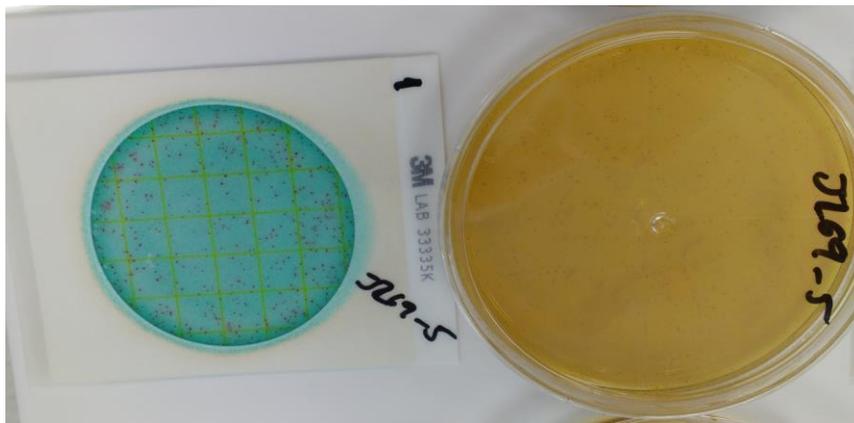
Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 24: Salchicha rellena queso



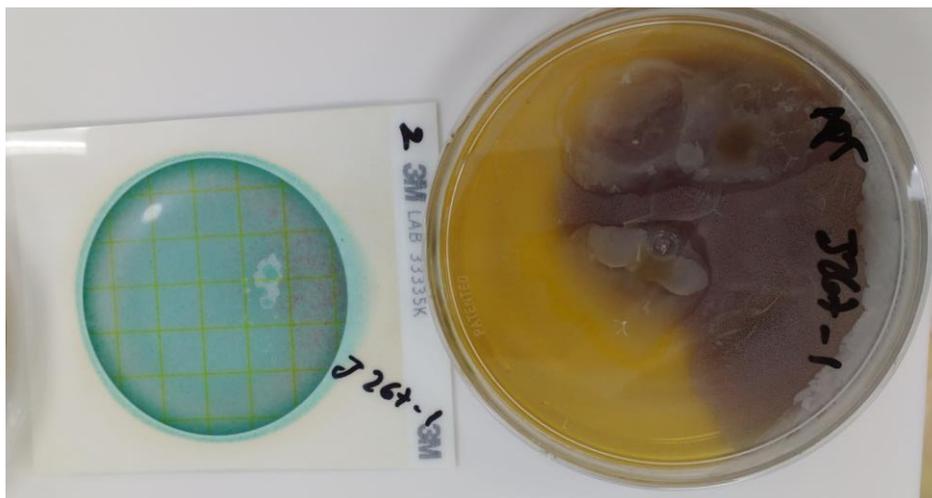
Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 23: Paleta de Cerdo



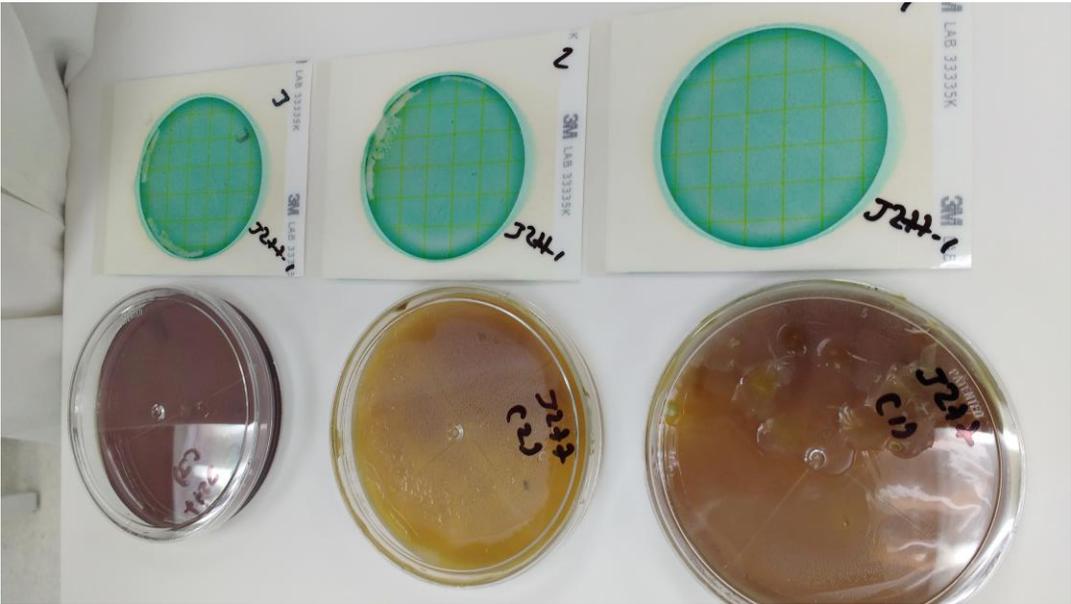
Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 25: Salchicha rellena queso



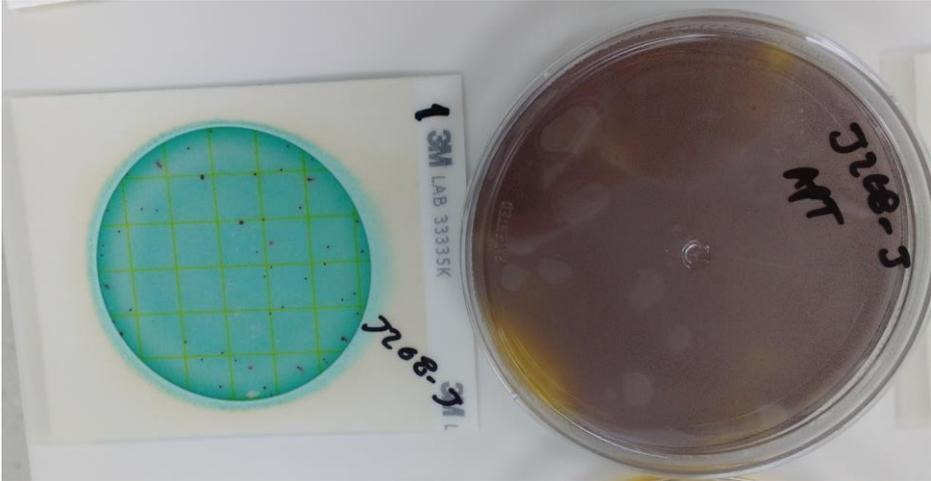
Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 26: Albóndiga Proteína de soya

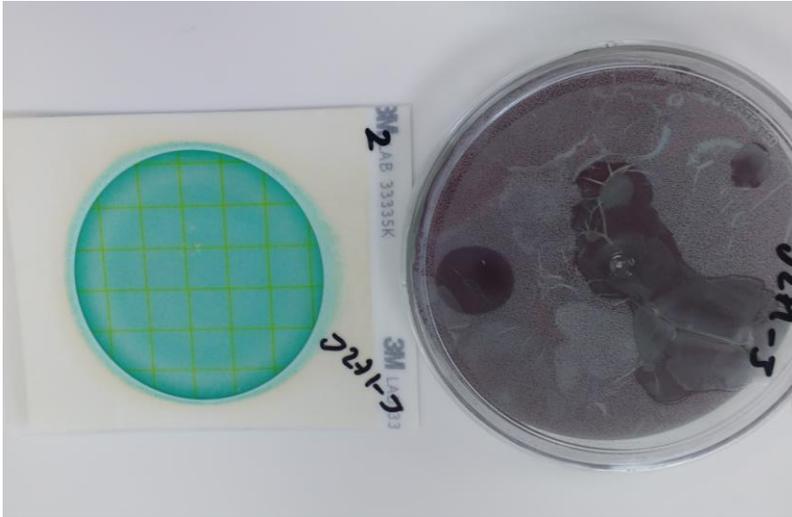


Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 27: Hamburguesa proteína de Soya



magen 28: Hamburguesa precocida



Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 29: Salchicha rellena de queso

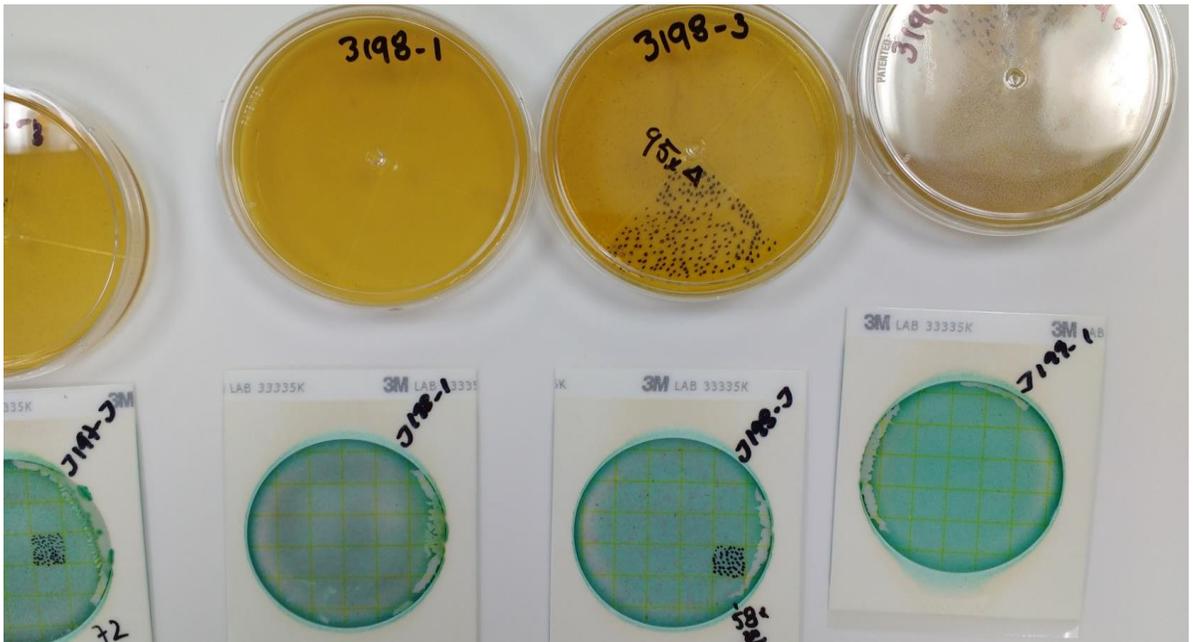
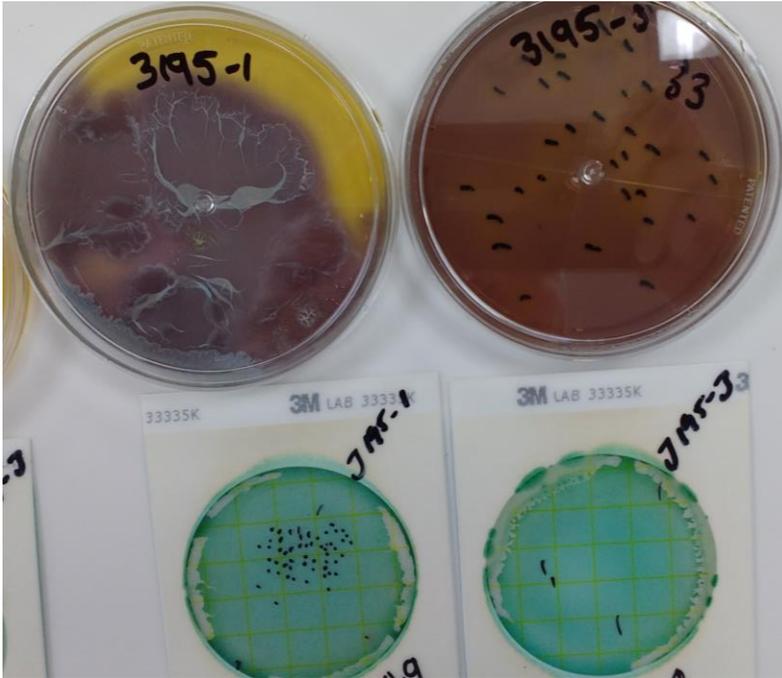


Imagen 30: Hamburguesa proteína de soya



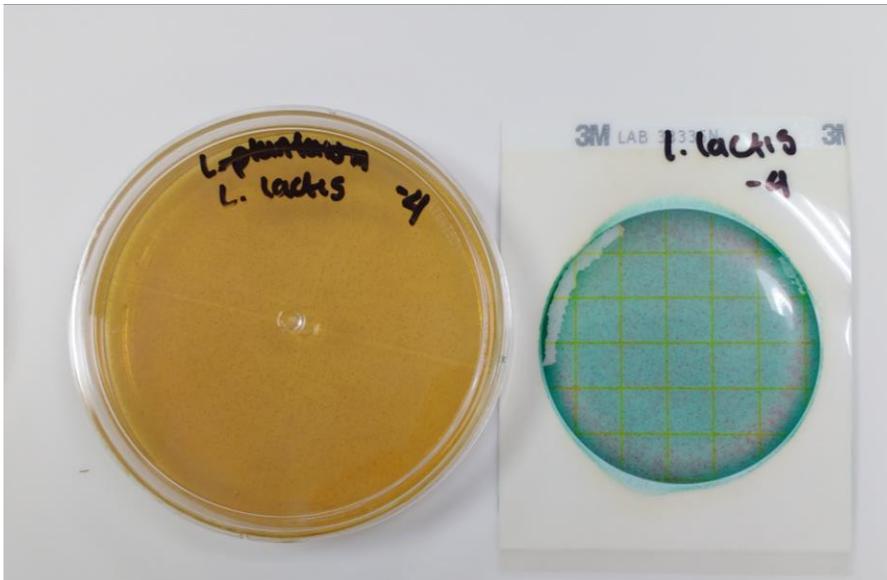
Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 31: Crecimiento *Lactobacillus plantarum*



Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 32: Crecimiento *Lactococcus lactis sup lactis*



Laboratorio microbiología, 2018

Imagen 33: Escala Patrón Mac Farlan

ESCALA MCFARLAND

Nº	BaCl ₂ 0,048M ml	H ₂ SO ₄ 0,36M ml	Vf ml	Nº Células
0,5	0,05	9,95	10	1,5 · 10 ⁸
1	0,1	9,9	10	3 · 10 ⁸
2	0,2	9,8	10	6 · 10 ⁸
3	0,3	9,7	10	9 · 10 ⁸
4	0,4	9,6	10	12 · 10 ⁸
5	0,5	9,5	10	15 · 10 ⁸
6	0,6	9,4	10	18 · 10 ⁸
7	0,7	9,3	10	21 · 10 ⁸
8	0,8	9,2	10	24 · 10 ⁸
9	0,9	9,1	10	27 · 10 ⁸
10	1	9	10	30 · 10 ⁸

Bibliografía:

- Ashbolt, N.J., W.O.K. Grabow and M. Snozzi (2001). Indicators of microbial water quality. In Fewtrell, L. and Bartram, J. (ed.), *Water Quality: Guidelines, Standards and Health. Risk assessment and management for water-related infectious disease*.
- Bibel D (1988); *Elie Metchnikoffs bacillus of long life*; *American Society for Microbiology* 54: 661-665.
- Carr, Chill and Maida, 2002; *The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey*; *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4):281–370, Brighton Ave, San Francisco.
- Deibel, Evans and Niven, 1957; *Microbiological Assay For Thiamin Using Lactobacillus Viridescens*; *Division of Bacteriology, American Meat Institute Foundation, The University of Chicago, Chicago, Illinois*
- Evans and Niven, 1951; *Nutrition Of The Heterofermentative Lactobacilli That Cause Greening Of Cured Meat Products*; *Division of Bacteriology, American Meat Institute Foundation and the Department of Bacteriology and Parasitology, University of Chicago, Chicago, Illinois*.
- Ercsey, R. M., Toroczka, Z., Lakner, Z., & Baranyi, J. (2012). Complexity of the International Agro-Food Trade Network and Its Impact on Food Safety. *PLOS One*, vol.7
- Fátima Leticia, 2015; *Comparación De Métodos De Siembra En El Análisis Microbiológico De Pescado*; *Universidad Pública de Navarra, Pamplona, España*.
- García Yazmín, González Gustavo; 2017; *Bacterias que enferman a los alimentos*; *Food Safety en 3M México*.
- Gaspar, 2016; *Bacteriocinogenic activity of Lactic acid bacteria isolates against potential pathogenic microbiota and evaluation of EK13 enterocin on the survival of Listeria innocua*; *Universidad de Lisboa*.
- Higuera-Ciapara, I. y Noriega-Orozco L.O. 2000. Mandatory aspects of the seafood HACCP system for the USA, Mexico and Europe. *Food Control*, 11: 225-229.
- Holzapfel, Brian J.B. Wood, 1995, *The Genera of Lactic Acid Bacteria*; XVIII, 398.
- León v; Totosaus A; Guerrero I; Perez B; 2005; *Efecto De Bacterias Ácido Lácticas Termoresistentes En Salchichas Cocidas*; *Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Apartado Postal 55-535, Ciudad de México 09340, México*
- Nero, L. A., Beloti, V., Ferreira, B. M., Tassinari, O. M., Tamanini, R., & Gombossy, d. M. (2006). Comparison of Petrifilm Aerobic Count Plates and de Man–Rogosa–Sharpe agar for Enumeration of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*

- Photakos, Devlieghere, Villani, Bjork, Ercolini;2015; Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage; Laboratory of Food Microbiology and Food Preservation, Department of Food Safety and Food Quality; Bélgica
- Rondón, et al, 2011; Tiempo de almacenamiento e identificación de bacterias ácido lácticas en carnes de res picada empacadas al vacío; Revista Científica, vol. XXI, núm.,pp. 425-433, Universidad del Zulia Maracaibo, Venezuela.
- Rosa Aznar, Manuel Zúñiga; 2011; ¿Qué son las bacterias lácticas?; Microbiología y Ecología. Fac. C. Biológicas. Univ. Valencia.
- Rosario Martín De Santos; Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos; Capítulo 3; Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- Santillán, M. A. (2004). Aislamiento y caracterización de cepas bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Scharlab magyarország, APT Agar Art. No. 01-026.
- Vásquez S, Suárez H, Zapata S (2009) Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Revista Chilena de Nutrición 36(1): 64-71
- Vinusha^aK .Deepika^aT. Sudhakar Johnson^a, Proteomic studies on lactic acid bacteria: A review; Biochemistry and Biophysics Reports, Volume 14, July 2018, Pages 140-148.
- Woraprayote, Yuwares, Supaluk, Woonop; 2016; Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Tailandia.
- Icontec, Norma Técnica Colombiana-NTC-1486, Documentación, presentación de tesis, trabajos de grados, y otros trabajos de investigación.