

MIGUEL ÁNGEL TORREALBA PIÑA

Fundamentos de Microbiología General



UNELLEZ

UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL
DE LOS LLANOS OCCIDENTALES
EZBQUEL ZAMORA

La Universidad que Siembra



Serie: Investigación No. 13

Publicaciones del Área de Estudios de Postgrado

UNELLEZ



La Universidad Que Siembra

**UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL
DE LOS LLANOS OCCIDENTALES
“EZEQUIEL ZAMORA”
VICERRECTORADO DE INFRAESTRUCTURA Y
PROCESOS INDUSTRIALES**



FUNDAMENTOS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL

MIGUEL ÁNGEL TORREALBA PIÑA

San Carlos, Cojedes, Venezuela 2019

TÍTULO: FUNDAMENTOS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL

EDICIÓN: Fondo Editorial de la Universidad Nacional Experimental de Los Llanos Occidentales “Ezequiel Zamora” (FEDUEZ).

AUTOR: Miguel Ángel Torrealba Piña

EDITOR: JUAN JOSÉ FERNÁNDEZ MOLINA

SERIE: Investigación No. 13.

CONCEPTO Y DISEÑO DE LA EDICIÓN: Miguel Ángel Torrealba Piña.

DISEÑO DE CARÁTULA: William Zambrano

DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN:

EDITORIAL: Fondo Editorial de la Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales “Ezequiel Zamora” (FEDUEZ). Avenida 23 de enero. Redoma de Punto Fresco. Barinas, estado Barinas.

DEPÓSITO LEGAL: BA2019000044

ISBN: 978-980-248-233-7

TIRAJE: Digital

DIRECCIÓN: Programa Ciencias del Agro y del Mar. Vicerrectorado de Infraestructura y Procesos Industriales. UNELLEZ. Km 4 vía Manrique. San Carlos, Cojedes, Venezuela.

REVISORES:

Jacovelyn Morales

Patricia Rojas

William Zambrano

VERSIÓN ELECTRÓNICA: Juan José Fernandez Molina



SERIE INVESTIGACIÓN: Bajo esta Serie se publicarán resultados de investigaciones de alta pertinencia científica y/o libros texto de los docentes del Vicerrectorado de Infraestructura y Procesos Industriales. Los libros deberán estar arbitrados y a su vez aprobados por la Comisión Asesora del Programa Académico de adscripción del autor (es), para su posterior publicación.

En esta serie se han publicado los siguientes libros:

No.	TÍTULO
1	NOCIONES ELEMENTALES DE LA CLIMATOLOGÍA E HIDROLOGÍA DEL ESTACOJEDES. <i>Franklin Paredes Trejo. Año 2009.</i>
2	VIDA ÚTIL DE LOS ALIMENTOS. Juan Fernández Molina & Tonny GraciaRujano. Año 2010.
3	EL MÉTODO DE LA NUEVA CIENCIA, SUS PRINCIPIOS Y ESTRATEGIAS OPERACIONALES. <i>Gerardo Antonio Molina Mora. Año. 2012.</i>
4	100 CACHOS: ANTOLOGÍA DE LA NARRATIVA FANTÁSTICA ORAL DE COJEDES. <i>Isaías Medina López. Año 2013.</i>
5	PRINCIPIOS DE ECOLOGÍA APLICA / Carmen A. Morante Ascanio. Año 2013.
6	COMPOSICIÓN ESCRITA DE TEXTOS ACADÉMICOS EN LA UNIVERSIDAD: TEORÍA Y REFLEXIÓN. <i>Glenys Pérez de Sánchez. Año 2014.</i>
7	COMPOSICIÓN ESCRITA DE TEXTOS ACADÉMICOS EN LA UNIVERSIDAD: TEORÍA Y REFLEXIÓN. <i>Glenys Pérez de Sánchez. Año 2014.</i>
8	LA GESTIÓN DE LAS TIC'S EN LAS PYMES VENEZOLANAS, TEORÍA APROXIMATIVA A SU VINCULACIÓN. <i>Antonio Flores. Año 2016.</i>
9	EL PENSAMIENTO ESTRATÉGICO PROSPECTIVO. HACIA UNA GERENCIA MUNICIPAL TRANSFORMADORA. <i>Gustavo Alonzo Jaime Gámez. AÑO 2017.</i>
10	COMPUESTOS VOLÁTILES Y NO VOLÁTILES DEL CAFÉ ARÁBICO Y SU ASOCIACIÓN CON LA CALIDAD SENSORIAL. <i>Wilmer Salazar Santana & Juan Fernández Molina. Año 2017.</i>
11	TRANSFORMACIÓN DEL MODO DE HACER INVESTIGACIÓN DE LOS DOCENTES DEL PROGRAMA CIENCIAS SOCIALES Y JURÍDICAS DE LA UNELLEZ SAN CARLOS. <i>Yelitza Lara. Año 2018.</i>
12	EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN ACCIÓN PARTICIPATIVA EN EDUCACIÓN. TEORÍA Y PRÁCTICA. <i>Gerardo Antonio Molina Mora. Año 2019.</i>



AUTORIDADES DE LAUNELLEZ

Dr. Alberto José Quintero
Rector

Prof. Oscar Ernesto Hurtado Jara
Secretario

Prof. Humberto Rivero (E)
Vice-Rector de Servicios

Dra. Yajaira Pujol (E)
Vice-Rectora de Planificación y Desarrollo Social
Barinas, estado Barinas

Prof. Héctor Montes
Vice-Rector de Producción Agrícola
Guanare, estado Portuguesa

Dr. Wilmer J. Salazar
Vice-Rector de Infraestructura y Procesos Industriales
San Carlos, estado Cojedes

Profa. Marys Orasma
Vice-Rectora de Planificación y Desarrollo Regional
San Fernando de Apure, estado Apure

Dra. María Andueza
Directora de Creación Intelectual
Barinas, estado Barinas

MSc. Ana Iris Peña
Directora de Estudios Avanzados
Barinas, estado Barinas

Dra. Zoleida Lovera
Directora-Gerente FEDUEZ
Barinas, estado Barinas

Dra. Jacqueline Pérez
Directora de Vinculación Socio-Comunitaria
Barinas, estado Barinas

AUTORIDADES DE LAUNELLEZ SANCARLOS

Dr. Wilmer Salazar Santana
VICE-RECTOR DE ÁREA

Dr. Gustavo Alonzo Jaime
JEFE PROGRAMA ESTUDIOS AVANZADOS

Ing. Maria Eugenia Paredes
JEFE PROGRAMA INGENIERÍA, TECNOLOGÍA Y ARQUITECTURA

MSc. Jordy Gámez V.
JEFE PROGRAMA CIENCIAS DEL AGRO Y DEL MAR

Dr. Antonio Flores Diaz
JEFE PROGRAMA CIENCIAS SOCIALES

MSc. Víctor Mendoza
JEFE PROGRAMA CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN

Ph.D. Juan José Fernández Molina
JEFE PROGRAMA- SUBGERENCIA DE PUBLICACIONES COJEDES

Leda. Loredana Giust
SECRETARIA DEL CONSEJO ACADÉMICO

MSc. Patricia Rojas
JEFE PROGRAMA CREACION INTELECTUAL

Ing. Yessica Aguirre
JEFE PROGRAMA VINCULACION SOCIO-COMUNITARIA

Lcdo. Efrain García
COORDINADOR DE CULTURA

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso

A mis padres

A mi esposa

A mis hijos

A mis nietos

A mis hermanos

A mis familiares

A la insigne UNELLEZ

A mi amada Venezuela

A mis compañeros de trabajo

A mi comunidad del camino Neocatecumenal

PREFACIO

La Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales “Ezequiel Zamora” (UNELLEZ), en el deseo de formar talento humano para el país, ha puesto énfasis en producir artículos académicos – científicos, orientados a desarrollar epistemología en diversas áreas del saber. En esta oportunidad presenta una creación del Doctor Miguel Ángel Torrealba Piña, Profesor Adscrito al Programa Ciencias del Agro y del Mar del Vicerrectorado de Infraestructura y Procesos Industriales, quien ha participado por más de veinte años en la docencia, creación intelectual y vinculación sociocomunitaria, de la cátedra Microbiología General y Microbiología Aplicada.

El colega y amigo, una vez más demuestra su sentido de pertenencia y pertinencia con la universidad, comprometido siempre en la formación de profesionales en las carreras TSU Agroindustrial Mención Granos y Semillas, TSU para la Industria de los Alimentos, Medicina Veterinaria e Ingeniería Agroindustrial; impartiendo magistralidad en cada uno de los subproyectos que están bajo su responsabilidad. Basta con preguntarles a sus estudiantes sobre el dominio que tiene el profesor en esta área y de la dedicación que aporta para que este grupo de individuos puedan aprender y aprehender aspectos básicos de la microbiología y así ellos puedan ejercer su profesión con anhelo, confianza, destreza, sabiduría y dignidad.

La microbiología es una ciencia que estudia a los seres vivos de diminuto tamaño, no perceptible por la visión normal de cualquier humano, que entre otras cosas, abarca sus funciones metabólicas y los efectos que ocasionan en determinados alimentos, dependiendo de su composición. Es un área científica de mucha relevancia para los egresados en estas carreras de transformación de materias primas de origen animal y vegetal, en la que se requieren horas de trabajo con cada uno de los grupos que conforman las cohortes en este programa de agro y mar, que definitivamente necesita de facilitadores comprometidos con el aprendizaje del estudiantado, para dirigir un acompañamiento holístico, en el que la meta sea “desarrollar un Unellista de alta capacidad integral”.

Como parte de este compromiso institucional, el autor de esta obra presenta un compendio de temáticas que van alineadas con el contenido programático del subproyecto Microbiología General, impartido en el tercer semestre de las carreras antes especificadas; lo que hace este producto, un artículo científico de gran aplicabilidad para el estudio y aprendizaje de los fundamentos básicos de esta ciencia, en la que se hace necesario llevar un orden pedagógico de los objetivos previstos, para que así el participante pueda ir internalizando aspectos inherentes al conocimiento de los diversos grupos que conforman este ecosistema microbiano, y de manera “inteligente” poder tomar las decisiones adecuadas de su utilidad industrial, bien

sea para favorecer el desarrollo de estos seres vivos, por aprovechamiento de los metabolitos que generan; o por lo contrario, para inhibir o destruir su crecimiento, por los perjuicios y deterioros que pueden ocasionar en un alimento y en un huésped.

Finalmente, quiero manifestarle estimados lectores, que esta producción académica les puede servir de complemento en su formación como profesionales en la ciencia y tecnología de alimentos, representando un estímulo para muchos de los estudiantes a adquirir saberes en lo que a inocuidad de los productos obtenidos de materias primas vegetales y animales se refiere, basados en la adopción de elementos heurísticos que van a servir de apoyo a los profesionales e investigadores de la agroindustria.

MSc. Víctor Pérez Guaina
Profesor de Microbiología General y
Microbiología Aplicada
UNELLEZ - VIPI

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	14
ÍNDICE DE FIGURAS.....	15
Capítulo I	
PRINCIPIOS DE MICROBIOLOGÍA	
INTRODUCCIÓN.....	19
1.1. Microbiología.....	19
1.1.1. Aspectos importantes para la iniciación en la microbiología.....	20
--	
1.1.2. Importancia de la microbiología.....	23
1.1.3. Microorganismo y enfermedad.....	24
1.1.4. Seguridad alimentaria.....	24
1.1.5. Cambios en los sustratos.....	26
1.1.6. Microorganismo y agricultura.....	27
1.1.7. Microorganismo y ambiente.....	29
1.1.8. Microorganismo y biotecnología.....	31
1.1.9. Microorganismo y alimentos.....	32
1.1.10. Microbiología y calidad.....	33
1.2. Microorganismos.....	35
1.3. Reino protista.....	37
1.3.1. Protistas superiores o eucariotas.....	38
1.3.2. Protistas inferiores o procariotas.....	38
1.4. Los cinco reinos.....	39
1.5. Los tres dominios.....	39
1.6. Principales grupos microbianos de interés para la industria de los alimentos.....	39
1.6.1. Características generales de las bacterias.....	39
--	
1.6.2. Características generales de los hongos: Mohos y levaduras.....	51
-	

1.6.3. Características generales de los protozoos.....	57
--	
1.6.4. Características generales de las algas.....	59
-	
1.6.5. Características generales de los virus.....	60
-	
1.7. Precursores de la microbiología.....	65
1.7.1. Aristóteles y la biogénesis.....	66
1.7.2. Francisco Redi.....	66
1.7.3. Girolano Fracastoro.....	66
1.7.4. Anton Van Leeuwenhoek.....	67
1.7.5. Louis Pasteur.....	67
1.7.6. Joseph Lister.....	71
1.7.7. Robert Koch.....	72
1.7.8. Ignaz Semmelweis.....	73
1.7.9. Martinus Beijerinck.....	74
1.7.10. Sergei Winogradsky.....	74
1.7.11. Alexander Fleming.....	74
1.7.12. Gerhard Domagk.....	75
1.7.13. Hans Christian Gram.....	75
1.7.14. Jacinto Convit.....	76
1.8. Enzimas microbianas.....	76

Capítulo II

MICROSCOPIA

INTRODUCCIÓN.....	83
2.1. El microscopio.....	83
2.1.1. Historia del microscopio.....	84
2.1.2. Tipos de microscopios.....	87
2.1.3. Componentes básicos del microscopio.....	92
2.2. Técnicas para observar microorganismos.....	97
2.2.1. Suspensiones de microorganismos en líquidos.....	97
-	

2.2.2. Técnicas de tinción.....	98
2.3. Colorantes.....	112
2.3.1. Clases de colorantes.....	112
2.3.2. Colorantes empleados en microbiología para tinciones.....	112
--	
2.4. Morfología microbiana.....	113
2.4.1. Morfología bacteriana.....	113
2.4.2. Morfología de mohos y levaduras.....	115
2.4.3. Morfología de protozoos.....	117
2.4.4. Morfología de algas.....	117
2.4.5. Morfología de virus.....	118
2.5. Agrupaciones bacterianas.....	118
2.5.1. Oval o esférica.....	118
2.5.2. Bacilar o bastón.....	119

Capítulo III

CRECIMIENTO MICROBIANO

INTRODUCCIÓN.....	121
3.1. Principios básicos del crecimiento microbiano.....	121
-	
3.2. Crecimiento de las poblaciones.....	122
3.3. Técnicas para determinar crecimiento microbiano.....	125
3.3.1. Recuento en placas.....	125
3.3.2. Valoración turbidimétrica.....	129
3.3.3. Recuento directo al microscópico.....	130
3.3.4. Recuento directo mediante contadores electrónicos.....	132
-	
3.3.5. Conteo por filtros de membrana.....	133
3.3.6. Determinación del contenido de nitrógeno.....	134
3.3.7. Determinación por peso húmedo y peso seco celular.....	134
-	
3.3.8. Determinación por cambios químicos del medio.....	134
3.3.9. Contaje por múltiples tubos.....	135

3.3.10. Métodos rápidos de determinación.....	139
3.4. Métodos para aislar microorganismos.....	143
3.5. Medios de cultivo para el análisis microbiológico.....	147
3.5.1. Condiciones generales para el cultivo de microorganismos.....	147
3.5.2. Tipos de medios de cultivo.....	149
3.6. Curva de crecimiento microbiano.....	150
3.7. Factores que influyen en el crecimiento microbiano.....	153
3.7.1. Factores intrínsecos.....	154
3.7.2. Factores extrínsecos.....	163
Capítulo IV	
MÉTODOS DE CONTROL DEL CRECIMIENTO MICROBIANO	
INTRODUCCIÓN.....	175
4.1. Fundamentos de los métodos de control de crecimiento microbiano.....	175
4.2. Métodos de inhibición.....	176
4.2.1. Por frío.....	176
4.2.2. Sustancias químicas.....	180
4.2.3. Presión osmótica/Actividad de agua.....	184
4.2.4. Deshidratación.....	185
4.2.5. Fermentación.....	187
4.2.6. Envasado con oxígeno reducido.....	188
4.2.7. Método de barreras o tecnología de obstáculos.....	189
4.3. Métodos de destrucción.....	191
4.3.1. Esterilización.....	191
4.3.2. Pasteurización.....	208
Capítulo V	
MICROORGANISMO Y ENFERMEDAD	
INTRODUCCIÓN.....	217
5.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).....	217

5.2. Principales fuentes de peligros microbiológicos.....	219
5.3. Toxinas microbianas.....	222
5.3.1. Tipos de toxinas microbianas.....	223
5.4. Enfermedades alimentarias de origen bacteriano.....	225

ÍNDICE DE TABLAS

1. Virus de ADN.....	63
2. Virus de ARN.....	64
3. Tamaños de partículas y algunas células.....	84
4. Tipos de microscopios.....	93
5. Consecuencias de la aplicación de colorantes en la tinción de Gram.....	104
6. Principales diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas...	105
7. Principales componentes de las paredes celulares de bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	106
8. Técnicas de tinción para bacterias.....	111
9. Resultados del conteo de colonias por dilución en una muestra de queso.	127
10. Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se utilizan 3 alicuotas de 10 ml, 3 de 1 ml y 3 de 0,1 ml.....	136
11. Pruebas de diferenciación bioquímica de las bacterias <i>E. coli</i> y <i>E. aerogenes</i>	138
12. Diferenciación de colonias típicas de las bacterias <i>E. coli</i> y <i>E. aerogenes</i> ..	139
13. Clasificación de los microorganismos de acuerdo a las temperaturas de incubación o ambiental.....	164
14. Longitudes de onda por radiaciones electromagnéticas.....	171
15. Tipos y técnicas de congelación.....	180
16. Características de congelación de grupos de alimentos.....	181
17. Variaciones de termorresistencia de algunos microorganismos de acuerdo a condiciones del sustrato.....	194
18. Tiempo de destrucción térmica de algunas bacterias y esporas.....	196
19. Influencia de la temperatura de calentamiento sobre el tiempo para destruir esporas del agriado plano.....	197

20. Uso de halógenos y sus componentes.....	202
21. Dosis infectiva de algunos patógenos entéricos.....	210
22. Principales diferencias entre exo y endotoxinas.....	226
23. Mohos y micotoxinas en diversos alimentos.....	244
24. Principales micotoxinas y sus signos clínicos en animales infectados.....	244
25. Principales efectos tóxicos de las micotoxinas en humanos y animales.....	245
26. Impacto de las micotoxinas en ganado lechero, cerdos y aves.....	245
27. Número de países con límites permisibles de aflatoxinas totales (AFT) y aflatoxinas B ₁ (AFB ₁) en alimentos.....	247
28. Límites máximos en ppb para alimentos de 12% de humedad.....	248

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Morfología de las bacterias.....	40
2. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	41
3. <i>Acetobacter aceti</i>	42
4. <i>Holoferax volcanii</i>	42
5. <i>Vibrio cholerae</i>	43
6. Coloración de Gram de Enterobacterias.....	44
7. <i>Staphylococcus aureus</i>	44
8. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	45
9. <i>Streptococcus pyogenes</i>	46
10. <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	46
11. <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	47
12. <i>Bacillus subtilis</i> esporulado.....	48
13. <i>Streptomyces spp</i>	48
14. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	49
15. <i>Propionibacterium acnes</i>	49
16. <i>Microbacterium oxydans</i>	50
17. <i>Brevibacterium casei</i>	50
18. <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	51

FUNDAMENTOS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL

19. Estructura de los mohos: <i>Rhizopus</i> <i>Penicillium</i>	52
20. Estructura de diversos mohos.....	53
21. Diversos mohos: <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> <i>Aspergillus</i>	54
22. Diversos mohos: <i>Penicillium</i> y <i>Sporotrichum</i>	54
23. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
24. <i>Candida albicans</i>	56
25. <i>Pichia kudriavzevii</i>	57
26. Diversos protozoos: a. Rizópodos (<i>Entamoeba histolytica</i>); b. Ciliados (<i>Paramecium</i>); c. Flagelados (<i>Trypanosoma cruzi</i>) y d. Esporozoos (<i>Toxoplasma gondii</i>).....	58
27. Algunas especies de algas.....	59
28. Tipos de virus.....	65
29. Microscopio simple de Leewenhoek y las figuras observadas.....	67
30. Microscopios simples de Jansen hacia 1595 y Galileo (1609).....	85
31. Microscopios simples de Robert Hooke y Antonie Van Leeuwenhoek.....	86
32. Microscopio óptico compuesto y microscopio electrónico.....	89
33. Componentes del microscopio óptico compuesto.....	94
34. Técnicas de preparaciones en vivo para observar microorganismos: a. Montaje húmedo; b. Gota pendiente.....	98
35. Preparación y fijación de frotis bacterianos a partir de cultivos sólidos y de líquidos.....	100
36. Procedimiento para la tinción simple.....	101
37. Procedimiento para la tinción de Gram.....	102
38. Secuencia de la coloración de las células de la tinción de Gram.....	104
39. a. Secuencia de la tinción de endoesporas; b. Endoesporas de <i>Bacillus subtilis</i>	109
40. Cápsula de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	109
41. Tinción negativa de <i>Bacillus megaterium</i>	111
42. Morfología de bacterias.....	114
43. Clasificación de algunos mohos y levaduras.....	116
44. Morfología típica de protozoos.....	117

45. Principales grupos de algas microscópicas unicelulares.....	118
46. Morfología de virus comunes.....	118
47. Procedimiento para siembra en superficie y en profundidad.....	129
48. Valoración turbidimétrica del cultivo.....	130
49. Cámara de Petroff – Hausser.....	131
50. Contaje directo al microscopio.....	132
51. Contador electrónico de partículas Coulter.....	133
52. Conteo de microorganismos por filtros de membrana.....	133
53. Determinación de coliformes totales y fecales por técnica del número más probable.....	138
54. Galerías API 20E para identificación de bacterias.....	141
55. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA): Fundamento y galería.....	141
56. Reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el ADN de los microorganismos y facilitar su detección.....	143
57. Procedimiento para la siembra en estrías de bacterias.....	144
58. Crecimiento de especies bacterianas sembradas por agotamiento.....	144
59. Siembra por extensión en placa con varilla angular de vidrio.....	145
60. Siembra de bacterias por técnica de placa vertida.....	146
61. Cultivo de microorganismos por enriquecimiento.....	146
62. Micromanipulación de bacterias para su aislamiento.....	147
63. Medios líquidos, sólidos y semisólidos para la siembra microbiológica.....	148
64. Curva de crecimiento microbiano.....	151
65. Tipos de radiaciones y el aumento de energía presente en ellas.....	172
66. Equipos de congelación de alimentos: Cámara frigorífica y túnel de congelación.....	178
67. Alimento ultracongelado.....	179
68. Liofilizador al vacío para alimentos y frutas.....	187
69. Métodos combinados para la conservación de alimentos.....	190

70. Determinación gráfica del valor D.....	192
71. Determinación gráfica del valor Z.....	193
72. Representación gráfica del tiempo de destrucción térmica (TDT).....	195
73. Autoclave horizontal.....	196
74. Proceso de filtración de la cerveza.....	199
75. Esquema de funcionamiento de una unidad APH (arriba). Equipo de APH (abajo).....	211
76. Equipo de pulsos eléctricos de alta intensidad.....	212
77. Campos magnéticos y oscilantes en la conservación de alimentos.....	217
78. Enfermedades e intoxicaciones alimentarias.....	218
79. Micotoxicosis primaria y secundaria.....	243

CAPÍTULO I

PRINCIPIOS DE MICROBIOLOGÍA

INTRODUCCIÓN

Para un estudiante de cualquier carrera relacionada con la ingeniería y tecnología de alimentos, la microbiología es fundamental en su formación porque se estaría en un proceso de transformación de materias primas de origen animal y vegetal, que en toda su cadena de producción hay una carga de flora de seres microscópicos que pueden influir en cambios significativos de las condiciones organolépticas del alimento, las cuales pueden promover modificaciones sensoriales, nutritivas y presencia de metabolitos primarios y secundarios que pueden representar aportes deteriorativos, patógenos, benéficos y deteriorativos/patogénicos. La microbiología proporciona seguridad en la alimentación del huésped, por ello su importancia en el dominio cognitivo de esta ciencia para garantizar productos, si no libres, que estén con bajos niveles de microorganismos que no constituyan un peligro potencial para la salud.

En este primer capítulo se presentan definiciones de la microbiología, su importancia, principales precursores de esta ciencia, la clasificación de estos seres vivos y los factores que influyen en su crecimiento, como eje imprescindible para el manejo adecuado de los mismos y así proporcionar estrategias al estudiante de aplicar métodos para inhibir y/o destruir a este grupo de células.

1. 1. Microbiología

Es una ciencia que se encarga de estudiar organismos vivos diminutos, no visibles al ojo humano, y todas sus actividades. Su etimología contempla: *mikros* (pequeño), *bio* (vida) y *logía* (estudio, tratado); por lo que requiere del uso del microscopio, bien sea óptico o electrónico, para poder ser observados, dado que sus tamaños están expresados en micrómetros (10^{-6} metros). Incluye a los virus que son microscópicos, pero no celulares.

Por ser seres vivos son capaces de desenvolverse en un medio ambiente específico, teniendo facultades fisiológicas características, en función a su soporte enzimático, de manera que puedan realizar actividades metabólicas sobre determinados grupos de sustratos presentes en el contexto donde se localicen, llegando a ellos por alguna vía típica como aire, agua, suelo, huésped (animales, plantas, humanos), fómites, utensilios, alimentos, agentes contaminantes, entre otros.

Para Yabar (2005), la Microbiología es la ciencia que se encarga del estudio de los organismos más pequeños, minúsculos, invisibles a simple vista, llamados microorganismos o microbios y procede del vocablo griego: Micro = Pequeño; Bios = Vida; Logos = Estudio, tratado. Por lo tanto la microbiología es el estudio de los microorganismos, de su biología, su ecología y, de su utilización en la producción de bienes agrícolas o industriales y su actividad en la alteración y deterioro de dichos bienes.

El conocimiento de la biología y la ecología microbiana son imprescindibles para poder comprender de qué forma los microorganismos interactúan con los seres humanos y qué tipos de relaciones establecen con ellos. Por lo tanto, trata esta ciencia de estudiar también las relaciones de los microorganismos con el medio ambiente, en función a su distribución en la naturaleza, de sus relaciones recíprocas entre ellos y con los demás seres vivos, de los efectos benéficos, perjudiciales, deteriorativos y del sinergismo de los dos últimos; de las transformaciones físicas y químicas que pueden ejercer en el medio circundante, siempre y cuando consigan estos seres diminutos los factores de crecimiento requeridos.

En general, a diferencia de los macroorganismos, los microorganismos son capaces de realizar sus procesos vitales de crecimiento, generación de energía y reproducción, independientemente de otras células, sean de la misma clase o de otra diferente (Madigan y otros, 2015); es por ello que la microbiología se ocupa fundamentalmente de organismos microscópicos unicelulares; es decir, de una sola célula, la cual desarrolla todos sus procesos vitales de manera particular, así como de pequeños agregados celulares equivalentes, dividiéndose en microorganismos procariotas (bacterias y algas azul verdosas) y eucariotas (hongos, algas, excepto las azul verdosas y protozoos). Las procariotas son células sin envoltura nuclear, mientras que las eucariotas si poseen dicha envoltura.

1.1.1. Aspectos importantes para la iniciación en la microbiología

Los microorganismos están en la tierra desde hace aproximadamente 3.800 millones de años, quienes a través de procesos evolutivos han generado una gran diversidad de ellas, representadas en miles de géneros. Aristóteles (384 – 322 a.C), fundador de la lógica y de la biología; promotor de la teoría de la generación espontánea, fue uno de los que mantenía la hipótesis de que en la naturaleza hay animáculos diminutos que ejercen algún tipo de influencia en la naturaleza. Para Madigan y otros (ob. cit), aparecieron mucho antes de las plantas y animales, estableciendo relaciones fisiológicas con organismos superiores en las que se producen beneficios o perjuicios de los mismos; además de ello intervienen en procesos biogeoquímicos del ambiente que se inmiscuyen en el aprovechamiento de compuestos orgánicos e inorgánicos para mantener niveles de elementos esenciales, tales como el nitrógeno, el carbono y algunos minerales.

Por ser los microorganismos sistemas celulares vivos, son estructuras que muestran un metabolismo específico en función a las sustancias químicas del medio que las transforman como mecanismo de

obtención de energía, conservando parte de ella o eliminándola como productos de desecho. Quiere decir que las células microbianas al estar compuestas por cuatro tipos de agentes químicos o macromoléculas: proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos, tienen propiedades esenciales que las diferencian en tamaños, estructura, fisiología, en respuesta a las señales químicas del medio y a las características genéticas de cada una de ellas.

Las células en general, de acuerdo a su dinámica reproductiva y de adaptación, viven en poblaciones derivadas de una de ellas y que por aumentar de tamaño, en condiciones adecuadas, requieren dividirse para formar dos, sino sucedería la autólisis (muerte propia), bajo la biosíntesis permanente de macromoléculas y en la que hay una duplicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), para así generar fidelidad en la reproducción, con un cultivo puro, netamente axénico (genéticamente estable). Es poco probable que las poblaciones celulares estén solas en la naturaleza, más bien se agrupan en diversos hábitats, sean estos ambientes comunes, poco comunes o extremos.

Las poblaciones microbianas se relacionan entre ellas de diversos modos, en las que tales interacciones pueden ser perjudiciales, deteriorativas, beneficiosas, deteriorativas y/o perjudiciales:

a. Perjudiciales: Cuando los compuestos químicos formados por efectos metabólicos de los microorganismos sobre los agentes proporcionados por el sustrato, ocasionan o no un efecto adverso en el ambiente que pueden generar una enfermedad o intoxicación. Un producto contaminado con agentes microbianos puede ser una vía para que estas células puedan ingresar al interior del huésped y así multiplicarse dentro del mismo y desarrollar patologías que pueden inclusive ocasionar la muerte. Todo depende de la especificidad de ese agente causal en invadir uno o más sistemas del individuo, sea este animal, vegetal o humano.

Por otro lado, es probable que los microorganismos estén ya en el ambiente y dentro del mismo; por efectos de su necesidad de obtener energía para biosíntesis, generen productos primarios o secundarios que puedan ocasionar un resultado patógeno en un huésped. Es posible que el producto desarrollado sea tóxico o no; como el alcohol etílico para algunos en determinadas concentraciones y para otros no mucho. Los microorganismos por necesidades de supervivencia, luchan contra el resto de la comunidad por el aprovechamiento de los nutrientes que proporciona el sustrato y ante ello son capaces de liberar toxinas que al quedar presentes en determinadas concentraciones en ese ecosistema, serían perjudiciales; tal es el caso de la toxina botulínica en productos ricos en proteínas, la cual es capaz de causar la muerte en aproximadamente seis días, de no tratarse adecuadamente.

La ventaja para el huésped es que muchos microorganismos cuando están en altas concentraciones en ese medio, son capaces de transformarlo, proporcionando cambios organolépticos perceptibles que dan un alerta de que en el mismo hay un potencial peligro de toxinas; tal es el caso de la alteración termófila

anaerobia, en la que por efectos fermentativos del *Clostridiumbotulinum* hay abombamiento de latas en productos ricos en proteínas confinados dentro de ellas, por generar suficiente CO₂, capaz de vencer la resistencia de las paredes de metal de las mismas. Además de ello hay un mal olor típico.

En otros casos, la transformación del medio donde actúan los microorganismos no es tan perceptible porque los cambios organolépticos fomentan pocas determinaciones sensoriales que pueden engañar al huésped; aún así los metabolitos generados están presentes y pueden ocasionar perjuicio. Un ejemplo de ello lo representa el agriado plano, donde no hay abombamiento de productos enlatados porque los niveles de gases son bajos y no vencen la resistencia de las paredes del envase y a la vez no alertan al consumidor y/o usuario ante un potencial peligro, y así utilicen finalmente el producto e ingresar microorganismos y toxinas de ellos al individuo, ocasionando la patología. Prácticamente hay acidez sin formación de gas.

Otro ejemplo de alta incidencia en alimentos lo representa el queso, en el que el *Staphylococcus aureus* es capaz de generar una enterotoxina en el mismo sin modificar las características organolépticas de este producto, lo que hace ver al interesado que está óptimo para su consumo y de esta forma llega a su interior para producir los efectos espasmódicos en un espacio de cuatro a seis horas.

b. Deteriorativas: Cuando ocasionan una transformación del medio por efecto de los sustratos presentes en el mismo, cuyos cambios son significativos y sin que los niveles de metabolitos sean tan elevados o no estén presentes, que así no representan peligro alguno para que el producto sea consumido con confianza. Desarrollan cambios en el medio que pueden fomentar olores, colores, texturas y sabores que merman los niveles de aceptabilidad o aptitud para el consumidor. Estos cambios van a depender de la capacidad enzimática que tenga el microorganismo para el aprovechamiento de los factores nutricionales que les proporciona el ambiente.

Los cambios pueden ser putrefactivos, fermentativos, de rancidez oxidativa o por acción sobre las pectinas, fundamentalmente, según la naturaleza enzimática del microorganismo:

b.1. Putrefactivos: Por efecto de las enzimas proteolíticas (proteasas), que actúan sobre las proteínas del sustrato y así generan metabolitos como Indol, mercaptanos, ácido sulfhídrico, escatol, amoníaco, aminas y CO₂, entre otros. Los microorganismos (principalmente bacterias proteolíticas) buscan a la proteína para aprovechar el nitrógeno que los aminoácidos proporcionan y así satisfacer esa necesidad nutricional.

Microorganismos + Proteínas = Proteólisis (Putrefacción)

De los géneros bacterianos más representativos están: *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*

b.2. Fermentativos: Por efecto de las enzimas carbohidratasas o sacarolíticas, capaces de hidrolizar o romper los carbohidratos por sus enlaces; como si fuese una cadena que se fragmenta y los libera en azúcares sencillos, ante la necesidad de satisfacer carbono a partir de ellos. El producto final es variable, dependiendo si es bacteriana o por levaduras. Si es bacteriana puede haber una homofermentación o heterofermentación.

En la primera de ellas se genera ácido láctico y CO₂; por otro lado, si es hetero se obtienen diversos ácidos orgánicos como ácido láctico, ácido succínico, ácido fórmico, etanol, algunos polialcoholes como manitol y polisacáridos como dextrano, más CO₂. Dependiendo del tipo de microorganismo se pueden producir otros alcoholes superiores como butanol, propanodiol, además de otros ácidos como butírico. Si es por efecto de levaduras se produce alcohol etílico.

Es importante considerar que para que suceda fermentación se necesita que haya ausencia de oxígeno. Dentro de los microorganismos más representativos están los géneros: *Streptococcus*, *Saccharomyces*, *Lactobacillus*

Microorganismo + Carbohidratos = Fermentación

b.3. Rancidez oxidativa: Por la acción de los microorganismos sobre los lípidos presentes en el medio, obteniéndose ácidos grasos libres y glicerol, que fomentan apariciones de olores y sabores anormales, típicos de la transformación de las grasas y aceites. La enzima que interviene en este proceso es la lipasa, que desagrega las grasas de los alimentos, hidrolizando el triacilglicerol a estos dos componentes.

Microorganismos + Lípidos = Ácidos grasos + Glicerol

Entre los géneros más representativos están: *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*

b.4. Acción sobre las pectinas por microorganismos presentes en el sustrato: Obteniéndose metanol y sustancias pécticas por desmetilización enzimática. De acuerdo a Serrat y otros (2014), las pectinas o sustancias pécticas son polisacáridos que se componen principalmente de ácidos poligalacturónicos coloides (poliuronidos derivados del ácido galacturónico CHO(CHOH)₄COOH). Se hallan en los tejidos de las plantas y son útiles por su capacidad para formar geles o jaleas con compuestos polihidroxilados, como los azúcares o con cantidades diminutas de iones polivalentes.

Microorganismos + Sustancias pécticas = Ácido péctico + Metanol

1.1.2. Importancia de la microbiología

La microbiología por ser una ciencia que estudia a las células de tamaño diminuto y su funcionamiento, trata de su diversidad y analiza lo que estos seres hacen en el ecosistema, contemplando la interpretación de los procesos bioquímicos vitales. Es importante tomar en cuenta que las propiedades de un ecosistema están controladas en gran parte por las actividades microbianas, en el que obtienen nutrientes del medio para sus procesos metabólicos y los usan para formar nuevas células. Por otro lado, al generar metabolitos primarios y secundarios en su etapa de crecimiento, pueden aportar efectos favorables, perjudiciales, patogénicos, y perjudiciales - patogénicos, tal como se especificó anteriormente.

Es por ello que los efectos de los microorganismos entre sí y en su hábitat se relacionan con su ambiente físico y químico, en el que cooperan con otros organismos, pero en muchos casos pueden ocasionar daños a ellos mismos como a otras especies macro y microbianas, por lo que esta ciencia invita a estudiar de forma

exhaustiva todos los procesos metabólicos involucrados en su ciclo de crecimiento para así estimar los beneficios y perjuicios que pudiesen desarrollar en momentos determinados. Al respecto, para Madigan y otros (ob. cit), uno de los objetivos de la microbiología es comprender como trabajan estos seres diminutos y, a través de ese conocimiento, diseñar modos mediante los cuales sus efectos beneficiosos puedan ser aumentados y los perjudiciales reducidos.

1.1.3. Microorganismo y enfermedad

Aunque muchos de los microorganismos son beneficiosos para la humanidad por sus aportes en áreas como alimentos, medicina, ambiente, industrias farmacológicas, cosmetológicas, agrícolas, pecuarias, energéticas, entre otras; otros son causantes de enfermedades infecciosas e intoxicaciones. Desde mucho antes del siglo XX varias de las enfermedades han sido estudiadas y controladas por el conocimiento de las prácticas sanitarias adecuadas y uso de agentes antimicrobianos; aún así los microorganismos constituyen un grupo de patógenos que amenazan la existencia del hospedero. Como lo concluyó Robert Koch (1843 – 1910) en la teoría de la enfermedad: *toda enfermedad está asociada a un agente causal*.

Para Forsythe (ob. cit), las enfermedades transmitidas por alimentos se presentan cuando se ingieren comidas contaminadas con microorganismos patógenos o sus toxinas. Cuando esto ocurre se tiene una “toxiinfección alimentaria”. Establece además que por ser los productos alimenticios a disposición de los consumidores muy variados y que a pesar de los progresos en medicina, ciencia de los alimentos y tecnología de la producción alimentaria, las enfermedades ocasionadas por patógenos siguen siendo causa de alerta en los brotes de toxiinfecciones; por lo que, garantizar inocuidad al consumidor y/o usuario es una necesidad relevante para esta ciencia.

En ciencias de la salud, la microbiología es una especialidad en la cual se logra el diagnóstico de las potenciales causas infecciosas de diversas enfermedades; reconociéndose las afecciones provocadas por bacterias, virus, hongos y parásitos de distintas características. Esta área del conocimiento permite la identificación de los agentes causales de enfermedades y toxiinfecciones en el huésped, mediante técnicas específicas tradicionales u otras denominadas rápidas.

1.1.4. Seguridad alimentaria

Debido a las incidencias de enfermedades e intoxicaciones alimentarias, los consumidores cada día son más exigentes en cuanto a adquirir productos de alta calidad, con preferencias ante aquellos que son lo más orgánicos posibles, seguros pero de mínimo proceso, con una vida útil adecuada para su consumo en un tiempo previsto; a la vez, ante la dinámica de comercialización actual, en la que la globalización es una estrategia de mercado nacional e internacional, estar dentro de las normas es un factor fundamental para garantizar seguridad en el consumo de alimentos.

La seguridad alimentaria no es solo disponer de suficientes cantidades que puedan satisfacer las necesidades nutritivas de una población; es decir, que la oferta mundial se mantenga al ritmo de la demanda. Se basa en sanidad pública de los productos para garantizar inocuidad al consumidor, con la intención de impedir enfermedades por la ingesta de uno o más productos nutritivos, tomando en cuenta que un alimento, desde el punto de vista fisiológico, es toda aquella materia constituida de principios inmediatos que sirven para la obtención de energía para el huésped (Losada, 2001). Comprende las sustancias, los ingredientes, las materias primas, los aditivos y los nutrientes ingeridos por el tracto gastrointestinal, incluidas las bebidas; pero no así las medicinas. El objetivo primordial de estas normativas es mantener dentro de los límites aceptables de la higiene la seguridad, a la producción y a la comercialización de los alimentos.

Para Forsythe (ob. cit), los objetivos de la sanidad pública se concentran en la exposición al máximo nivel de los peligros microbiológicos de los alimentos considerados aptos para el consumo humano. Estos objetivos deben ser en lo posible cuantificables y verificables para reducir la posibilidad de presentación de riesgos inaceptables por la acción de agentes biológicos, químicos y físicos, que estén en el alimento, en la que esa población patógena pueda llegar a la cadena alimentaria y posteriormente distribuirse y atacar durante la producción, distribución y consumo del mismo.

Ante estos peligros de enfermedades e intoxicaciones por la ingesta de cualquier tipo de productos procesados o no, surge el derecho alimentario, en el que se establecen códigos, leyes, reglamentos y normas que regulan todas las actividades de la cadena de obtención de ellos que van desde la producción hasta su consumo. En el artículo 25 de la Declaración Universal de los Derechos Humanos (1948) se establece que: *1. Toda persona tiene derecho a un nivel de vida adecuado que le asegure, así como a su familia, la salud y el bienestar, y en especial la alimentación...*

Para Losada (ob. cit), entre los principales entes internacionales vigilantes de sanidad alimentaria están: La Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, EEUU), la Unión Europea (UE) y la Organización Mundial para el Comercio (OMC), quienes en sinergismo han establecido normas sanitarias, fitosanitarias y alimentarias que garantizan inocuidad de los alimentos, con etiquetado ecológico.

1.1.5. Cambios en los sustratos

Los microorganismos son seres vivos que requieren satisfacer necesidades energéticas, tal cual lo hace cualquier otro organismo inferior o superior; es por ello que demandan ingerir fuentes nutritivas, basadas en moléculas que tengan a disposición sales minerales, fuentes de carbono, de nitrógeno, hidrógeno, para

algunas vitaminas y para toda agua. El microorganismo en general se compone de 70 – 75% de agua y el resto de componentes diversos, dependiendo si es procariota o eucariota.

En función a ello y dependiendo de su “maquinaria” enzimática, van a disponer de exo y endoenzimas capaces de actuar sobre determinados sustratos para romper los enlaces de alto peso molecular y luego llevarla a fracciones más pequeñas, de manera que pueda aprovechar los elementos ofertados y así generar cambios significativos o no en el sustrato. Tomando en cuenta que por ser un ser vivo responde a una curva o ciclo de crecimiento, que inicia con una fase de latencia y culmina en una fase de declive o muerte (ver capítulo III).

En este recorrido de su crecimiento, al culminar su fase de latencia, el microorganismo ya se ha adaptado a las condiciones del medio, por lo que alcanza desarrollar todas las exo y endoenzimas requeridas, y así actuar sobre los componentes del sustrato, a fin de aprovechar los nutrientes que proporciona. En ese momento del ciclo se tiene que hay suficientes elementos nutritivos, más aún si es un sustrato joven, en el que hay poca o ninguna carga microbiana.

Los microorganismos presentes en ese ecosistema desarrollan una serie de cambios biológicos en el sustrato, fundamentados por la generación de metabolitos primarios, que no son más que sustancias químicas que se forman producto de la conversión de los elementos presentes en ese ambiente, los cuales pueden servir de nutrición posterior al propio microorganismo o a otros que lo requieren, pero que además pueden desfavorecer la continuidad del crecimiento de otra especie como la de ellos mismos. Dentro de estos metabolitos se tienen: aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos, alcoholes superiores, polialcoholes, polisacáridos, entre otros.

Para la microbiología industrial este conocimiento es importante porque le va a permitir obtener una serie de productos provenientes de las conversiones biológicas que se llevan a efecto y así darle la aplicabilidad en cualquier área de la ciencia. Por ejemplo, la obtención de alcohol etílico para la industria de bebidas y licores, la fermentación ácido láctica para la industria láctea, la obtención de vitaminas para compensar deficiencias en el huésped, obtención de proteínas unicelulares, obtención de ácidos orgánicos; en fin, una serie de productos de efectos benéficos principalmente.

Por otra parte, al avanzar los microorganismos en su ciclo de vida, ya en la etapa de aceleración negativa, donde va disminuyendo la velocidad de reproducción de los mismos, y donde los nutrientes comienzan a agotarse, más por efectos de los metabolitos primarios desarrollados en el final de la fase de latencia; muchos de ellos se sienten amenazados por falta de moléculas para la obtención de energía y por cambios significativos en el medio, como disminución del potencial de hidrógeno. Todo esto hace que muchas especies liberen a los medios compuestos químicos como toxinas y antibióticos, con la finalidad de impedir

el avance en su ciclo de vida de muchas especies microbianas sensibles a ellos y así aprovechar el remanente del sustrato presente en el ecosistema.

Este conocimiento aporta beneficios significativos para la industria médica y cosmética porque el aporte de antibióticos por parte de mohos y bacterias para el huésped va a favorecer la desaparición de agentes causales de enfermedades; además, las toxinas pueden ser utilizadas en espacios donde la aplicación de ellas puedan favorecer la reducción de zonas afectadas en la piel, como por ejemplo, el uso de toxinas botulínicas para minimizar “arrugas” en la cara de muchas personas. Por otro lado, estas toxinas también ejercen efectos perjudiciales y hasta fatales en quienes la consuman, como por ejemplo la toxina estafilocócica, que aparece mucho en quesos, y la botulínica en productos enlatados, principalmente en aquellos donde se confinan alimentos ricos en proteínas. Esta toxina puede ocasionar la muerte en un espacio cercano a los seis – siete días, de no contrarrestarse a tiempo.

1.1.6. Microorganismo y agricultura

Al hacer referencia a los microorganismos y su importancia para la agricultura, hay que resaltar que el hábitat específico es el suelo, donde su fertilidad es vital para la vida en el planeta a largo plazo, por lo que la actividad biótica edáfica, depende de la disponibilidad de nutrientes y de la energía aportada por los microorganismos del suelo y de los residuos de los cultivos y de los animales.

Para Toalombo (2012), un suelo sano es aquel que es capaz, a través de su actividad biótica y su propia fertilidad, de hacer fructificar cultivos y permanecer productivo durante largos periodos sin necesitar de grandes aportaciones exteriores. Es el sustrato natural para el desarrollo de las plantas y de una gran diversidad de comunidades de microorganismos y microfauna que forman las biocenosis del suelo; creciendo estas poblaciones en la superficie de las partículas, en el interior de los agregados o asociadas a las raíces de las plantas, inmersos en la solución acuosa del suelo y en su atmósfera.

La población microbiana del suelo es muy abundante, y varía según las condiciones del medio y la cantidad de alimento disponible, entre ellas se tienen: bacterias y actinomicetes, hongos, algas, protozoos y virus. Dentro de ellos las bacterias constituyen más del 90% de los microorganismos, quienes por su gran versatilidad bioquímica, son intermediarias de las reacciones metabólicas que permiten incorporar los materiales de la superficie en el mundo viviente y están en la base de toda productividad, por lo que debe darse el papel fundamental que les corresponde en la fertilidad de ellos.

Los hongos, favorecen una buena estructura por estabilizar los agregados en sus redes de micelios y evitando que sean arrastrados por el agua de lluvia u otros agentes responsables de la erosión. Intervienen además en la transformación de materia orgánica, donde las materias carbonadas (azúcares, almidón, celulosa) son la fuente principal de energía de los microorganismos. Para su desarrollo precisan también de

nitrógeno, pues para la descomposición de 30 g de celulosa se precisa 1 g de nitrógeno, por lo que esto permite comprender la importancia de la relación C/N en los aportes orgánicos.

Los microorganismos en conjunto degradan moléculas complejas de materia orgánica, formando humus, el cual se asocia con las arcillas para formar el complejo arcillo-húmico, que favorece la aireación, el almacenamiento de agua y la fertilidad. Este compuesto fomenta la solubilización de los minerales, aportando al suelo elementos como K, Ca, Mn, Mg, entre otros, que pueden también ser solubilizados por los microorganismos edáficos y volverlos asimilables para las plantas.

Otro aspecto de la importancia de los microorganismos en el suelo es que permiten la fijación de nitrógeno atmosférico por grupos de bacterias, tanto libres como simbióticas, en el que los microorganismos desarrollan en la rizosfera (superficie) actividades metabólicas de las que se benefician las plantas: transformaciones de la materia orgánica del mismo, movilización de nutrientes inorgánicos, producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal, antagonismos frente a patógenos, entre otros. De esta manera los microorganismos son capaces de poner a disposición de las plantas los nutrientes no asimilables directamente por ellas y de aquellos retenidos en la materia orgánica del suelo y en compuestos minerales, tales como fósforo, azufre y potasio.

La microbiología aporta los PGPR (microorganismos promotores del crecimiento de las plantas), favoreciendo el desarrollo de ellas por síntesis de fitohormonas (fundamentalmente el ácido indolacético), que promocionan el crecimiento de la raíz y la proliferación de los pelos radicales, así inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos y producen sustancias quelantes del hierro (sideróforos) que aumentan su absorción por parte de las plantas. Además intervienen en la fijación del nitrógeno y aumentan la absorción de agua, nutrientes y fósforo (micorrizas).

La fijación simbiótica del nitrógeno con plantas leguminosas se hace mediante bacterias del tipo *Rhizobium* que viven en los nódulos radiculares de las leguminosas. Cuando los pelos absorbentes de una raíz entran en contacto con una de estas bacterias, los pelos se ensortijan y las paredes de la célula se disuelven bajo la influencia de las enzimas formando un nódulo. Una vez dentro del nódulo la bacteria obtiene los nutrientes necesarios (compuestos del carbono) y el oxígeno de la planta; a su vez la planta recibe compuestos nitrogenados producidos por la bacteria a partir del nitrógeno gaseoso de la atmósfera del suelo.

Algunos grupos microbianos, como las algas, que son fotosintéticas, y otros, como las cianobacterias, son capaces de fijar nitrógeno atmosférico al igual que *Rhizobium*. Cuando las raíces de la planta se descomponen, los compuestos nitrogenados quedan disponibles para otros microorganismos y plantas, fomentando así la absorción de este componente que aporta energía en el desarrollo de las plantas y la producción del alimento que proporciona.

Otro aspecto esencial de esta ciencia para la agricultura es el desarrollo de biofertilizantes, los cuales son insumos formulados con uno o varios microorganismos, que de una forma u otra, proveen o mejoran la disponibilidad de nutrientes cuando se aplican a los cultivos. Generalmente el éxito en su aplicación dependerá del conocimiento de sus requerimientos nutricionales y ambientales, así como de su interacción con otros microorganismos, incluyendo su habilidad para coexistir en agricultura sostenible y convencional. De esta manera se reduce el uso de agrotóxicos en el suelo para que no rompa el equilibrio biológico del ecosistema, además de evitar contaminación del aire y agua, por efectos de lixiviación, erosión y remoción de suelos.

Se tiene también que los microorganismos pueden intervenir en la solubilización del fósforo, en el que la presencia en el suelo de un gran depósito de este elemento que no puede ser utilizado por las plantas, pone de manifiesto la importancia del papel de estos seres vivos en la conversión del fósforo orgánico como elemento combinado en los restos vegetales y en la materia orgánica del suelo, a formas inorgánicas aprovechables por las plantas. Los microorganismos que actúan en la solubilización ocupan el 10% de la población del suelo, en el que el proceso se desarrolla mediante enzimas que separan al fósforo de los sustratos orgánicos y que se denominan fosfatasa, las cuales pueden actuar en muchos sustratos diferentes y con esta actividad los microorganismos pueden aportar a las plantas entre el 30-60% de su necesidades de fósforo. Algunos géneros son: *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Thiobacillus*, *Penicillium* y *Aspergillus*.

Finalmente hay microorganismos promotores del crecimiento, en los que durante su actividad metabólica, son capaces de producir y liberar sustancias reguladoras de crecimiento para las plantas. Entre ellos se tienen los géneros *Fusarium*, *Trichoderma*, *Diplodia*, entre otras.

1.1.7. Microorganismo y ambiente

Esta ciencia permite dar a conocer diferentes aspectos de la participación y aplicación de los microorganismos en los ecosistemas suelo, agua, aire, alimentos, hospedero; y entender la importancia de su intervención, ya sea perjudicial o benéfica en ellos. Permite además conocer los tipos de interacciones existentes entre los diferentes grupos de microorganismos en cada ecosistema y entender los mecanismos que utilizan los microorganismos en el ciclaje de elementos como N, P, C, Fe, S y su efecto en dichos procesos.

También permite reconocer los microorganismos de importancia ambiental en la posible solución de problemas como biorremediación, degradación de xenobióticos y recalcitrantes, bioquímica y genética de la degradación de hidrocarburos, humedales y fitorremediación, tratamiento aeróbico y anaeróbico de aguas residuales, grupos de indicadores relevantes para el estudio de calidad en aguas asociados con contaminación de origen fecal y el uso de diferentes modelos biológicos para evaluar los efectos de los

contaminantes mediante ensayos de toxicidad aguda. Son usados para el desarrollo de tecnologías limpias y sostenibles, como por ejemplo la producción de biocombustibles y bioinsumos agrícolas, y procesos de biorremediación, control biológico y reciclaje; por otro lado, proporcionan técnicas de laboratorio empleadas en la recuperación, aislamiento e identificación de los microorganismos relacionados con los ecosistemas involucrados.

Según el Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (ArgenBio, 2010), la aparición de nuevas tecnologías y un mejor conocimiento de los organismos han permitido producir medicamentos en bacterias, mejorar plantas y emplear microbios para limpiar el ambiente. De eso se trata la biorremediación; es el uso de organismos vivos para eliminar o neutralizar contaminantes del medio ambiente. Al respecto hay microorganismos que pueden degradar petróleo, hidrocarburos e insecticidas.

Asimismo, los metales pesados como el mercurio no son biodegradables, pero las bacterias pueden concentrarlos de tal forma de poder aislarlos más fácilmente. También se pueden emplear plantas para limpiar suelos contaminados, conociéndose este proceso como fitorremediación y se encuentra aún en desarrollo. Se basa en la capacidad que tienen algunas plantas de absorber, acumular o tolerar sustancias tóxicas como los metales pesados (por ej. cromo, plomo o cadmio), explosivos y pesticidas.

Sucede biorremediación cuando se le da una ayuda al medio ambiente en la mejora de los ecosistemas dañados, acelerando dichos procesos naturales. Lo que hacen los microorganismos es degradar los desechos en productos menos tóxicos, además de concentrar e inmovilizar sustancias tóxicas, metales pesados; minimizar desechos industriales y rehabilitar áreas afectadas con diversos contaminantes, donde a veces, biorremediar un ambiente contaminado puede requerir la elaboración de un microorganismo genéticamente modificado que sea eficiente sólo para ese caso.

Un evento más sencillo de biorremediación puede ser el del petróleo. Los derrames de crudo provocan un desequilibrio al aumentar la cantidad de carbono, lo que descompensa los niveles de nitrógeno y fosfato, en esas condiciones metabólicamente no se puede consumir el carbono. La biorremediación de petróleo consiste en verter los mismos nutrientes que están descompensados como fosfato y nitrógeno y dejar que los microorganismos que ya están presentes “hagan su trabajo”.

Los suelos contaminados contienen gran cantidad de microorganismos que pueden incluir un número de bacterias y hongos capaces de utilizar hidrocarburos, que representan un uno por ciento (1%) de la población total de aproximadamente 10^4 a 10^6 células por gramo de suelo. También, se han encontrado cianobacterias y algas capaces de degradar hidrocarburos.

La microbiología aporta un valor significativo en dos grandes áreas. Por un lado, es posible aprovechar la formidable actividad metabólica de los microorganismos para convertir algunos desechos en fuentes de gas utilizable como combustible (biogás). Por otra parte, se ha confirmado que distintas bacterias son

capaces de emplear para su actividad biológica a los productos contaminantes surgidos de los hidrocarburos, por lo cual podrían reducir el riesgo de polución vinculado a los derrames de petróleo en diversos ambientes.

De acuerdo a Loretto (2005), dentro de los principales géneros de bacterias biorremedadoras se tienen: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Spirillum*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Streptomyces*, *Xanthomyces*, entre otras. Dentro de los mohos están: *Penicillium*, *Absidia*, *Mortierella*, *Thichoderma*, *Aspergillus*, y de levaduras se tienen: *Saccharomyces* y *Candida*.

1.1.8. Microorganismo y biotecnología

Según Thieman y Palladino (2010), la **biotecnología** es definida como el conjunto de técnicas, procesos y métodos que utilizan organismos vivos o sus partes para producir una amplia variedad de productos. Consiste en utilizar de manera adecuada los sistemas biológicos de los seres vivos para obtener productos de beneficio para el consumidor y/o usuario y que sea económicamente viable. Se trata de aprovechar la tecnología biológica de los seres vivos para generar compuestos saludables, capaces de satisfacer una o más necesidades, así como contribuir a resolver problemas ambientales, mediante estrategias de biopreención y biorremediación.

En los últimos años se ha incrementado la utilización de microorganismos en aplicaciones biotecnológicas; esto es, en la utilización de los conocimientos sobre la biología molecular y la genética de los microorganismos para poder dirigir en ellos la producción de compuestos de interés, como fármacos, anticuerpos, por ejemplo, y para el desarrollo de técnicas bioquímicas de diagnóstico molecular.

Para Renneberg (2008), por estudiarse de manera integral la tecnología biológica, asociada a las conversiones enzimáticas que desarrollan los microorganismos, la biotecnología aporta las siguientes mejoras:

- . Sintetizan y elaboran compuestos en la que participan microorganismos. Tal es el caso de elaboración de vitamina C, ácido cítrico, aminoácidos para la alimentación animal, enzimas microbianas como proteasas, amilasas, invertasas, entre otras.
- . Utilización de materias primas renovables y fuentes de energía de origen biológico, eliminando la dependencia de fósiles. Tal es el caso de biocombustibles obtenidos a partir de materia prima vegetal, o utilización de biomateriales en lugar de plástico.
- . Aprovechamiento de residuos orgánicos agrícolas, forestales o industriales para su reutilización. Ejemplo: extractos proteicos para elaborar productos de alimentación animal por enzimas microbianas.
- . Disminución de residuos tóxicos por reducción del gasto de energía y de gases de efecto invernadero en la industria. Ejemplo: uso de biodetergentes.
- . Mitigación de degradaciones contaminantes como el caso de vertidos petrolíferos, o producción de metano (biogás) por fermentación de residuos orgánicos.

- . Utilización de bacterias, hongos y virus como bioinsecticidas y biopesticidas.
- . Tratamiento de aguas residuales por microorganismos aeróbicos y anaeróbicos, así como facultativos, bajo condiciones naturales de autopurificación.
- . La biodegradación de polímeros por bacterias *Alcaligeneseutrophus*.
- . Obtención de cobre por biolixiviación de metales a partir de minerales con escasos sulfuros, con el empleo de la bacteria *Acidithiobacillusferrooxidans*.

1.1.9. Microorganismo y alimentos

Los alimentos representan la principal fuente de nutrición de los seres vivos, en el que se pueden tener de forma natural u orgánica, o de forma sintética, sometida a técnicas de elaboración o fabricación, mediante combinaciones de materias primas. Por ser los microorganismos en su mayoría, seres que requieren de elementos nutricionales como el carbono, nitrógeno, hidrógeno, sales minerales y agua, recurren a ocupar ecosistemas que aporten estas necesidades a fin de obtener energía.

Si las condiciones fisicoquímicas del medio son idóneas para los microorganismos, estos van a desarrollar conversiones biológicas, manifestadas en la obtención de metabolitos primarios y/o secundarios, que van a repercutir en la calidad del producto final, bien sea para un beneficio, un perjuicio, un deterioro o un perjuicio junto a deterioro, en función a sus exo y endoenzimas para la degradación del sustrato.

La microbiología de alimentos es una rama de esta ciencia que se encarga del análisis de la composición microbiana de los alimentos, mediante técnicas estandarizadas que permiten la detección de diferentes agentes microbianos. Estudia todos estos cambios para el aprovechamiento industrial de estos metabolitos en la población, o para evitar la proliferación de los mismos. De allí surge la necesidad de que la microbiología de alimentos proporcione los conocimientos adecuados, porque de esta forma se tendría:

- . Control de los alimentos en la aplicación de técnicas de inhibición y/o destrucción de flora microbiana para prolongar la vida útil de los productos y así dar mayor oportunidad de ser comercializarlo, sin o con pocos cambios organolépticos y nutricionales, manteniendo sus condiciones funcionales.
- . Aprovechamiento de materias primas para su transformación por agentes microbiológicos y ser utilizados en la satisfacción de necesidades energéticas en una población.
- . Estudiar la carga microbiana de los alimentos para garantizar inocuidad de los mismos y así decidir si están aptos para ser utilizados como materias primas o como productos finales, sin representar peligro alguno para el consumidor.
- . Desde el punto de vista sanitario, los alimentos pueden ser vehículos de infecciones (ingestión de microorganismos patógenos) o de intoxicaciones (ingestión de toxinas producidas por microorganismos) graves. En este sentido se han desarrollado técnicas de control microbiológico de alimentos, dado que muchas veces la causa de la contaminación del alimento se debe a medidas higiénicas inadecuadas en la

producción, preparación y conservación; lo que facilita la presencia y el desarrollo de microorganismos que producto de su actividad y haciendo uso de las sustancias nutritivas presentes en éste, lo transforman volviéndolo inaceptable para la salud humana.

En este particular Ray y Bhunia (2010), especifican que para el aseguramiento higiénico sanitario de los alimentos no sólo debe de tomarse en cuenta el producir alimentos sanos, organolépticamente aceptables, nutricionalmente adecuados, sino el garantizar que dichos productos no se contaminen a causa de agentes biológicos, químicos y físicos durante la producción, transporte, almacenamiento y distribución, así como durante las fases de su elaboración industrial, manipulación e inmediata preparación para su consumo. Los alimentos sean de origen animal o vegetal pueden fácilmente presentar contaminación por microorganismos, pudiendo presentar un riesgo para la salud.

1.1.10. Microbiología y calidad

Cuando se induce a la calidad de un producto, se hace referencia a la aptitud que este tiene para ser utilizado o consumido sin representar peligro alguno de enfermedad e intoxicación alimentaria (ETA). Por ello es necesario determinar cargas microbianas en un laboratorio, para así poner en práctica una serie de acciones que le permitan asegurar una adecuada técnica en el aislamiento, identificación y caracterización de agentes etiológicos y su correspondiente prueba de susceptibilidad, como una guía de la terapia o acción para minimizar sus efectos.

La microbiología como ente de calidad de los productos orienta a las organizaciones que intervienen en la cadena alimentaria a hacer monitoreos de los agentes etiológicos presentes durante las etapas de recepción de materias primas, productos en proceso y terminados, incluyendo almacenamiento, distribución y despacho, para que se minimicen las poblaciones de ellos y así reducir los casos de ETA en las comunidades.

Por ello, esta ciencia incorpora técnicas de determinación tradicional y rápida de microorganismos, para así conocer los géneros influyentes, las cantidades de ellos, los metabolitos desarrollados en su etapa de crecimiento y los cambios ocasionados en el sustrato. De esta manera se pueden hacer comparaciones con las normas nacionales e internacionales para saber si está apto o no para su consumo, bien sea como materia prima o como producto terminado, en función a los estándares de calidad exigidos por las mismas. Dentro de las normativas de índole internacional y nacional se tienen:

a. La Comisión del Codex Alimentarius: Es un órgano intergubernamental conjunto de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la OMS, integrado por 185 estados miembros y una organización miembro (la UE). Lleva en funcionamiento desde 1963 con la finalidad de crear normas alimentarias internacionales normalizadas, destinadas a proteger la salud de los consumidores y asegurar la aplicación de prácticas comerciales justas. Establece normas alimentarias para que sean más

sanos estos productos a los consumidores y asegura prácticas más justas en el comercio mundial de alimentos, cada vez mayor, en beneficio de los agricultores y otros productores de alimentos.

b. ISO 22000: Es una norma internacional que define los requisitos que debe cumplir un sistema de gestión de seguridad alimentaria para asegurar la inocuidad de los alimentos a lo largo de toda la cadena desde la "granja hasta el tenedor". Combina elementos claves reconocidos normalmente para garantizar la Seguridad Alimentaria en toda la cadena alimentaria, incluyendo los siguientes beneficios:

- . Introducir procesos reconocidos internacionalmente en la empresa.
- . Facilitar el cumplimiento de la legislación con su aplicación.
- . Ofrecer a proveedores y partes interesadas confianza en sus controles de riesgos, de seguridad alimentaria mediante programas de requisitos previos y planes HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point).
- . Controlar de forma eficiente y dinámica los riesgos para la seguridad alimentaria, estableciendo dichos controles en su cadena de suministro.
- . Proporcionar confianza en los consumidores.
- . Introducir transparencia respecto a sus responsabilidades.
- . Comunicación interactiva.
- . Gestión de sistemas.
- . Control de los riesgos. Mejora continua y actualización del sistema de gestión de Seguridad Alimentaria

c. Organización Mundial de la Salud (OMS): Es un organismo compuesto por 194 miembros, que brinda asesoramiento científico independiente de índole internacional acerca de los peligros microbiológicos y químicos. La primera reunión tuvo lugar en Ginebra en 1948. Ese asesoramiento sirve de base al Codex para elaborar normas alimentarias internacionales. Es además un organismo de la Organización de las Naciones Unidas (ONU), especializado en gestionar políticas de prevención, promoción e intervención de la salud en el ámbito mundial.

d. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO): Es un organismo especializado de la ONU que dirige las actividades internacionales encaminadas a erradicar el hambre. Tiene la secretaría de dos importantes organizaciones de establecimiento de normas, reconocidas por el Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización Mundial del Comercio (OMC): el Codex Alimentarius, para la inocuidad de los alimentos; la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF), para la salud vegetal.

e. Comité Venezolano de Normas Industriales (COVENIN): Se conoció así, con ese acrónimo desde 1958 hasta 2004, siendo el ente encargado de velar por la estandarización y normalización bajo lineamientos de calidad en Venezuela. A partir del año 2004, las actividades desarrolladas por este comité pasan a ser ejecutadas por el Fondo para la Normalización y Certificación de Calidad (**FONDONORMA**).

Es una asociación civil sin fines de lucro con personalidad jurídica y patrimonio propio, fue creada en 1973 con el fin de desarrollar en Venezuela las actividades de normalización y certificación en todos los sectores industriales y de servicios, y de formar talento humano en dichas especialidades. Este comité estableció los requisitos mínimos para la elaboración de procedimientos, materiales, productos, actividades y demás aspectos que estas normas rigen. En esta comisión participaron entes gubernamentales y no gubernamentales especialistas en un área.

f. Servicio Autónomo Nacional de Normalización, Calidad, Metrología y Reglamentos Técnicos (SENCAMER): Es una institución pública, adscrita al Ministerio del Poder Popular para el Comercio; hoy día, Ministerio del Poder Popular para la Industria y el Comercio (MPPIC); encargada de proponer, organizar y ejecutar las Políticas del gobierno nacional de conformidad a la Ley del Sistema Venezolano para la Calidad y la Ley de Metrología; realizar acciones para colocar al organismo al servicio de la economía social, el rescate del poder regulatorio del estado y el apoyo al intercambio con justicia entre los pueblos en el marco del Alba. La microbiología juega un papel fundamental en este organismo dado que informaría sobre el cumplimiento o no de los productos en cuanto a los rangos establecidos en las normativas nacionales e internacionales de presencia de agentes biológicos diminutos.

1.2. Microorganismos

Son aquellos seres vivos diminutos que para ser observados se requiere del empleo de un microscopio, dado que su tamaño se manifiesta en micrómetros ($\mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$). Engloba organismos unicelulares y pluricelulares no relacionados evolutivamente entre sí, tanto procariotas (comobacterias), y eucariotas (como protozoos); una parte de las algas y los hongos, e incluso entidades biológicas acelulares de tamaño ultramicroscópico como los virus o los priones. Se encuentran en casi toda la naturaleza (aire, suelo, agua), desde la superficie de la tierra hasta las capas superiores de la atmósfera, e inclusive en sedimentos del fondo del océano.

Aun cuando se estima que sólo se conoce el 3% de los microorganismos y que pocos se han estudiado con profundidad, resulta sorprendente su diversidad en relación con la variedad de plantas y animales. Asimismo, se reconoce que los microorganismos son más diversos y versátiles que los macroorganismos, debido a su historia evolutiva y a su rápida capacidad para adaptarse a los cambios ambientales. De esta forma, la diversidad microbiana, definida como la variedad de microorganismos y de sus amplios mecanismos de adaptación, presentan muchos grupos microbianos como bacterias, hongos (mohos y levaduras), protozoos, algas y virus. En general, de los microorganismos se han descrito 30.800 especies de protozoarios, 70.000 de hongos y 45.000 de bacterias; aunque se pronostican hasta dos millones de especies de hongos y de tres a diez millones de especies bacterianas. Por ejemplo, se estima que hace poco más de

3.300 millones de años las bacterias fueron las primeras formas de vida en colonizar la Tierra, ya que tienen capacidad para usar distintas fuentes de energía.

Antiguamente estos microorganismos se encontraban incluidos en distintas clasificaciones de los seres vivos, siendo inicialmente contenidos en el reino animal y luego en el reino vegetal, pero algunos de ellos presentaban características pertenecientes a ambos reinos, lo que dificultaba su clasificación. Actualmente se acepta el sistema que propuso Woese en 1978, que incluye tres dominios basados en la estructura lipídica de la membrana, sensibilidad en cuanto a los antibióticos y lo más importante la diferencia existente en el ARN ribosómico que incluye tres principales dominios, que son: *bacteria*, *arquea* y *eukarya*.

Aunque se plantean estos tres dominios, para Montaña, Sandoval, Camargo y Sánchez (2010), los microorganismos se agrupan en dos categorías: procarióticos y eucarióticos, tal cual como lo propuso Ernest Haeckel (1834 – 1919), zoólogo danés que estableció en 1866 un tercer reino al que denominó *Protista*. En la primera están las archaeas y las bacterias, mientras que en la segunda se encuentran hongos, algas y protozoarios. No obstante, de manera convencional los virus, viroides y priones son también considerados microorganismos. Desde entonces y hasta la actualidad las bacterias y otros microorganismos pueden crecer en los ambientes más diversos.

Su capacidad y eficiencia metabólica permitieron que ellos colonizaran la superficie terrestre, el aire, los lagos salados y prácticamente todas las regiones geográficas del planeta. Se pueden encontrar desde los polos en ambientes debajo del punto de congelación, hasta ambientes secos como los desiertos, o los muy húmedos como las selvas lluviosas. Otro de sus éxitos evolutivos es que pueden vivir solos o en asociación con otros seres vivos; es así como en las plantas viven hongos y bacterias sin causarles daño, tal como los hongos micorrízicos en las raíces del 97% de las plantas, o la bacteria *Rhizobium*, un simbiote de las leguminosas.

En seres humanos también existen bacterias en elevada densidad, como es el caso de *Escherichiacoli* en el colon del intestino, en mutualismo con el huésped por aprovechar los nutrientes aportados por este sistema y que al adherirse a las paredes intestinales, hacen que el intestino delgado se vuelva ligeramente ácido, retrasando el desarrollo de bacterias indeseables, por lo que el sistema inmunológico se fortalece en la prevención de dolencias en este espacio del sistema abdominal. La *E. coli* estimula la producción de anticuerpos, promoviendo las defensas contra cualquier infección.

1.3. Reino protista

De acuerdo a Vargas y Villazante (2014), a mediados del siglo XVII se realizaron las primeras observaciones de microorganismos haciendo uso de un microscopio simple construido por Antonee Van Leewenhoek. Desde entonces personajes de renombre tales como Louis Pasteur y Robert Koch dedicaron su tiempo y esfuerzo para el conocimiento de sus características, relación de estos organismos con algunas

enfermedades, procedencia y también la manera de clasificarlos. De estas ideas surgen varias clasificaciones de los microorganismos, condicionados a ciertas características y particularidades que les permiten ser designados a grupos o subgrupos según sean sus semejanzas o parentesco evolutivo.

Ya para el siglo XIX se hablaba de dos reinos, el reino animal y el reino vegetal; y dependiendo a las características de los microorganismos, estos eran asignados a uno de estos reinos. Conforme se profundizaba el estudio de estos seres, se descubrió que muchos de ellos presentaban características pertenecientes a ambos reinos por lo que surgió el reino *Protista*. Dentro de las características del reino animal como forma de vida se tienen:

- . Núcleo bien definido.
- . Membrana celular flexible.
- . Movimiento activo.
- . Glucógeno y grasas como sustrato principal.
- . Células sin clorofila.
- . Energía a partir de materia orgánica.
- . Filiación de protozoos.

Por otro lado, dentro de las principales características del reino vegetal se tienen:

- . Núcleo bien definido
- . Paredes celulares rígidas.
- . Sin movimiento activo.
- . Almidón como sustrato principal.
- . Células con clorofila.
- . Energía de origen fotosintética.
- . Filiación de *Thallophytas* (algas, hongos y plantas).

Ante estas características de ambos reinos, había divergencias y disyuntivas en cuanto a la ubicación de los microorganismos dentro de ellos, dado que algunas tienen particularidades de célula animal y otras de célula vegetal, más aún cuando las bacterias no concordaban con la primera diferenciación, debido a que no tienen núcleo definido por una membrana. Debido a ello Haeckel propone el reino protista, caracterizado por:

- . Sin coordinación celular definida.
- . Sin diferenciación celular.
- . Incluyen fotosintéticos y no fotosintéticos.

Es así como este zoólogo divide este reino en protistas superiores o eucariotas y protistas inferiores o procariotas. Su diferenciación se basa en:

1.3.1. Protistas superiores o eucariotas:

- . Algas microscópicas (autótrofos y con pared celular de celulosa), hongos microscópicos (heterótrofos y con pared celular de quitina), protozoos (heterótrofos y sin pared celular).
- . Núcleo delimitado por una membrana bien definida.
- . Célula estructuralmente más compleja.
- . Extenso sistema de membranas internas.
- . Con uno o más cromosomas lineales, por ello mejor distribución genética.

1.3.2. Protistas inferiores o procariotas:

- . Bacterias y algas azul – verdosas.
- . Núcleo de tipo primario, sin membrana claramente definida.
- . Sin división celular mitótica, sino por fisión binaria.
- . Contiene un cromosoma circular, por lo que la distribución de genes no está diferenciada rigurosamente.
- . Estructura más sencilla.
- . No hay nucléolo.

En resumen, la célula procariota es aquella célula u organismo que carece de un núcleo verdadero y presenta su ADN en una sola molécula generalmente en forma circular; mientras que las células eucariotas son aquellas células u organismos que poseen un núcleo verdadero (cromosomas), delimitado por una membrana nuclear y que presentan otras estructuras delimitadas por membranas denominadas organelos como, por ejemplo: mitocondrias, retículo endoplasmático, aparato de golgi, entre otros.

1.4. Los cinco reinos

Posterior a ello, el desarrollo de los microscopios permitieron conocer más características de los microorganismos dando como resultado una nueva propuesta de agrupación hecha por Whittaker (1920 - 1980) en 1969 que esta vez incluía cinco reinos:

- . Monera: En el que se encuentran los organismos procariotas.
- . Protista: Con organismos eucariotas unicelulares.
- . Fungi: Donde se encuentran todos los hongos pluricelulares.
- . Plantae: Correspondiente al reino vegetal con excepción de los hongos.
- . Animalia: Donde se encuentran los organismos pertenecientes al reino animal.

1.5. Los tres dominios

Luego propone Woese (1928 - 2012) en 1978 como nuevo sistema y utilizado actualmente son:

- . Bacteria: Que incluye a procariotas que contienen peptidoglucano en su pared celular.
- . Archaea: Incluye a procariotas que no contienen peptidoglucano en su pared celular.
- . Eukarya: Formado por todas las eucariotas.

1.6. Principales grupos microbianos de interés para la industria de alimentos

Una vez diferenciados los procariotas y los eucariotas, se presentan las principales características de los grupos microbianos presentes en la naturaleza y que ejercen efecto en la industria de alimentos. Entre ellos se tienen: bacterias, hongos, protozoos, algas y virus. De ellos los más incidentes en la industria de los alimentos son las bacterias, hongos y protozoos.

1.6.1. Características generales de las bacterias

Las bacterias constituyen un grupo de procariotas filogenéticamente relacionados y distinto de *Archae*, que presentan un tamaño cercano entre 0,5 a 5 μm de longitud y diversas formas, incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), curvados (vibrios) y hélices (espirilos) (Madigan y otros, ob. cit). Se diferencian de las eucariotas porque no tienen núcleo definido y algunas no presentan orgánulos membranosos internos, disponiendo muchas de flagelos.

Este grupo presenta dos dominios evolutivos según su naturaleza bioquímica y genética: bacterias y *Archae*; en la que la primera dispone en su pared celular de peptidoglicano junto a su composición de lípidos y la segunda no dispone de ellos. Son los organismos más abundantes del planeta, estimándose que hay aproximadamente 5×10^{30} bacterias en el mundo; siendo obicuas en ecosistemas terrestres y acuáticos, en desechos, en alimentos, en el cuerpo humano, en animales, entre otros. Entre sus características fundamentales se tienen:

- . Su tamaño entre 0,5 a 5 μm , con una longitud que oscila entre 1 a 3 μm de largo por 0,41 a 1 μm de ancho, generalmente.
- . Se desarrollan en ambientes de actividad de agua entre 0,995 a 0,999.
- . Rango de temperatura de crecimiento: -5 a 55 °C (Óptima = 37 °C).
- . De acuerdo a las necesidades de oxígeno se clasifican en: aerobios estrictos, anaerobios estrictos, aerobios facultativos y microaerófilos.
- . En función a sus necesidades nutritivas se tiene que son simples, complejas (saprófitos, heterótrofos).
- . Son osmofilicas, halotolerantes y halófilas.
- . Se reproducen por fisión binaria, gemación o esporulación.
- . Algunas de ellas forman endoespora: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina* y *Clostridium*.
- . En función a su morfología se clasifican en cocos, bacilos y espirilos, tal como se muestra en la figura 1.
- . Al aplicárseles tinción diferencial de Gram, se dividen en Gram positivas (azul o violeta) y Gram negativas (rojo o rosado).



Figura 1. Morfología de las bacterias

Fuente: Madigan y otros (ob. cit)

- . Son procariotas.
- . Algunas forman cápsulas.
- . Pueden ser móviles (por flagelos) e inmóviles.
- . Posee como componentes: pared celular, membrana citoplasmática, citoplasma, ribosomas, nucleóide, uno o más flagelos, fimbrias, plásmidos, cápsula en algunas y endosporas (algunas).
- . Hay benéficas (*Lactobacillus*) y deteriorativas (*Clostridium*).
- . Entre las principales familias se tienen:
 - a. Familia *Pseudomonadaceae***
 - . Bacterias Gram negativas, no esporuladas y frecuentemente móviles.
 - . Aerobios estrictos, oxidasas positivas por la presencia de citocromos.
 - . Algunas sintetizan sus propios factores de crecimiento o vitaminas.
 - . Se puede desarrollar a bajas temperaturas, siendo muchos psicotróficas.
 - . Actividades proteolíticas y lipolíticas de algunas especies.
 - . No se desarrollan a altos niveles de actividad de agua (0,97 – 0,98).
 - . Pocos resistentes a la deshidratación.
 - . Son termosensibles, siendo su crecimiento pobre o nulo por encima de 43 °C.
 - . Producen pigmentos verdosos, blancos, cremosos, rojizos, castaños y negros. Otras producen viscosidad en algunas bebidas alcohólicas como cerveza.
 - . Algunas como *Gluconobacter* transforman el glicerol en dihidroxiacetona (DHA), además de que oxidan parcialmente los carbohidratos y los convierten en alcoholes, a través de un proceso de fermentación. El etanol lo oxidan a ácido acético.
 - . Entre los principales géneros se tienen: *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Pseudomonas*, *Rhizobacter*, *Serpens*, entre otras.



Figura 2. *Pseudomonas aeruginosa*

Fuente: Ryan y Ray (2004)

b. Familia *Acetobacteraceae*

- . Bacilos Gram negativos, móviles de metabolismo anaeróbico. Tienen flagelación peritrica.
- . Convierten el lactato a acetato y pueden oxidar el D y L ácido láctico hasta formar anhídrido carbónico y agua.
- . Oxidan alcohol etílico a ácido acético en condiciones aeróbicas.
- . Tienen alta tolerancia a la acidez, con pH que van desde 5,5 a 6,3.
- . Son de flagelación peritrica o polar.
- . Otras producen viscosidad en algunas bebidas alcohólicas como cerveza.
- . Una propiedad de este tipo de microorganismos es su alta tolerancia a la acidez. Esta tolerancia al ácido resulta esencial para que un organismo produzca grandes cantidades de ácido.
- . Algunas como *Gluconobacter* transforman el glicerol en dihidroxiacetona (DHA), además de que oxidan parcialmente los carbohidratos y los convierten en alcoholes, a través de un proceso de fermentación. El etanol lo oxidan a ácido acético.
- . Principales géneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Oleomonas*, *Stella*, entre otros.



Figura 3. *Acetobacter aceti*

Fuente: Ryan y Ray (ob. cit)

c. Familia *Halobacteriaceae*

- . Bacteria Gram positiva de Metabolismo aeróbico facultativo, con mayor acción en ambientes aeróbicos.
- . Halófilas obligadas y cromógenas, por lo que actúan en ambientes de alta concentración de sal (32%), como acuáticos y minas.
- . Su forma es de varillas o cocos y crecen mejor a 42 °C.

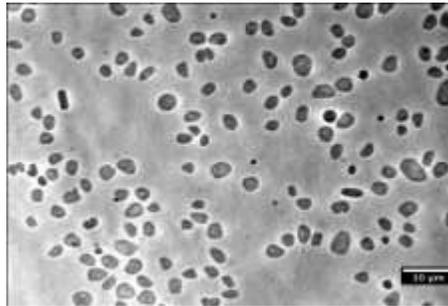


Figura 4. *Haloferax volcanii*
Fuente: DasSarma y otros (2010)

- . Producen enzimas como lipasas, amilasas, proteasas y xilanasas.
- . Presentan afinidad metabólica por los grupos carboxilos.
- . Entre los principales géneros se tienen: *Halococcus*, *Halolamina*, *Halobellus*, *Halosarcina*, *Haloferax*, entre otros.

d. Familia *Vibrionaceae*

- . Comprende cocobacilos Gram negativos y a veces bacilos luminiscentes por lo que pueden causar fosforescencia en carnes y pescados.
- . Viven en agua dulce o salina y varias especies son patogénicas.
- . Crece en ambientes con temperaturas entre 18 a 20 °C, ocasionando enfermedades en los peces.
- . Son anaerobios facultativos, contiene oxidasa y presentan uno o más flagelos, generalmente polares.
- . No forman esporas.
- . Los miembros de esta familia sintetizan una tetrodotoxina, que es una poderosa neurotoxina.
- . Entre los principales géneros se tienen: *Allomonas*, *Beneckea*, *Listonella*, *Photobacterium*, *Vibrio*, ente otros.

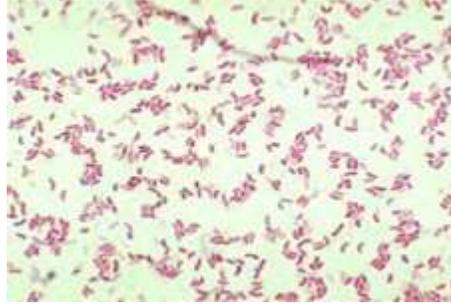


Figura 5. *Vibrio cholerae*

Fuente: Madigan y otros (ob. cit)

e. Familia *Enterobacteriaceae*

- . Comprende al grupo de bacilos y cocobacilos Gram negativos. Algunos son pleomórficos.
- . Son anaerobios facultativos, por lo que se pueden desarrollar en presencia o ausencia de oxígeno.
- . No son exigentes en su nutrición por lo que son de necesidades simples. Necesitan para su crecimiento compuestos simples de carbono y nitrógeno.
- . Carecen de la enzima citocromo oxidasa, por ello son oxidasa negativa, excepto el género *Plesiomonas* que si es capaz de hacerlo.
- . Son nitroreductoras, por lo que son capaces de reducir nitrato a nitrito.
- . En condiciones anaeróbicas fermentan los carbohidratos (especial ente glucosa y lactosa), con o sin producción de gas. En condiciones aeróbicas oxidan los sustratos presentes.
- . Aunque algunos géneros no son móviles, la mayoría de ellos se desplazan por un flagelo polar.
- . No forman esporas y algunos pueden ser encapsulados.
- . Son catalasa positivos, quimioheterótrofos. Producen enterotoxinas.
- . Son mesófilos siendo su temperatura óptima de crecimiento entre 22 y 37 °C.
- . Entre los principales géneros se tienen: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Proteus*, *Plesiomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Sodalis*, *Yersinia*, entre otras.



Figura 6. Coloración de Gram de Enterobacterias

Fuente: Forsythe (ob. cit)

Fig. 1: imagen microscópica con coloración de Gram de las Enterobacterias

f. Familia *Micrococaceae*

- . Son de forma esférica dispuestas enmasas irregulares, racimos, tétradas o paquetes.
- . Su presencia indica contaminación por piel.
- . Son Gram positivos, inmóviles, a excepción del género *Planococcus*.
- . Son anaerobios y aerobios facultativos, catalasa positiva y oxidasa negativo.
- . Crecen bien en ambientes entre 25 a 30 °C.
- . Entre los principales géneros se tienen: *Arthrobacter*, *Citrococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, entre otros.

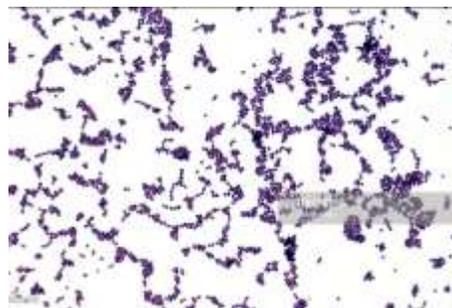


Figura 7. *Staphylococcus aureus*

Fuente: Fetsch (2017)

g. Familia *Lactobacillaceae*

- . Bacilos Gram positivos, generalmente largos y delgados, que en la mayoría de las especies forman cadenas.
- . Son microaerófilos, aunque existen algunos anaerobios estrictos, catalasa negativos.
- . Fermentan los azúcares dando ácido láctico como producto principal, siendo homo y heterofermentativos.
- . Se desarrollan generalmente a temperatura de 37 °C.

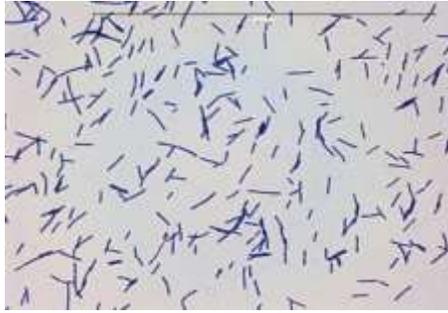


Figura 8. *Lactobacillus acidophilus*

Fuente: Silva (2014)

- . Pueden sobrevivir a la pasteurización.
- . Toleran concentraciones salinas cercanas al 5 – 10%.
- . Entre los principales géneros están: *Lactobacillus* y *Pediococcus*.

h. Familia *Streptococcaceae*

- . Son homofermentativos, microaerófilos, catalasa y oxidasas negativos.
- . Cocos Gram positivos aislados, en parejas, en cadenas cortas o tétradas; catalasa negativos y microaerófilos. Miden de 0,5 a 1,0 μm de diámetro.
- . No toleran más del 2 al 4% de sal, por lo que no forman parte en la fermentación ácido láctica de vegetales en salmuera.
- . El género *Streptococcus* se dividen en cuatro grupos: piógenos, viridans, lácticos y enterococos. Piógenos no crecen ni a 10 °C ni a 45 °C, y son productores de pus (*Streptococcusagalactiae*, *Strep. pyogenes*). Viridans es termodúrico y crecen a 45 °C y no a 10 °C (*Strep. thermophilus*, *Strep. bovis*). En el grupo láctico crece a 10 °C pero no a 45 °C, y no toleran más del 2 al 4% de sal (*Strep.lactis*, *Strep. cremoris*). Se emplean como fermentos en quesos y mantequilla. Los enterococos que crecen tanto a 10 como a 45 °C, son termodúricos, resistiendo temperaturas de pasteurización. Toleran 6,5% de sal y más, pH de 9,6.
- . Homofermentativos, creciendo hasta 5,5% de sal y a temperaturas entre 7 a 45 °C, óptimo a 25 – 32 °C.
- . Se ha usado como cultivo iniciador en embutidos fermentados y debe controlarse en bebidas alcohólicas por producción de diacetilo.
- . Heterofermentativo de azúcares. Otros como *Leuconostoc dextranicum* fermentan ácido cítrico de la leche y forman diacetilo (sabor agradable).
- . Toleran concentraciones salinas cercanas al 8% y concentraciones azucaradas del 55 al 60%.
- . Produce gran cantidad de mucílago en medios sacarolíticos.

. Entre los principales géneros se tienen: *Lactococcus*, *Lactovorum*, *Streptococcus*.

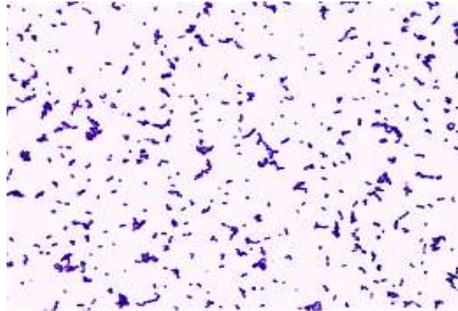


Figura 9. *Streptococcus pyogenes*

Fuente: Ryan y Ray (ob. cit)

i. Familia Alcaligenaceae

- . Bacilos móviles Gram negativos, aerobios estrictos.
- . Su metabolismo es no fermentativo y se encuentran en suelo o agua. Son proteobacterias.
- . Algunas viven en el tracto intestinal.



Figura 10. *Achromobacter xylosoxidans*

Fuente: Palacios y otros (2014)

- . Causan viscosidad en la leche (*A. viscolatis*)
- . Entre las principales especies se tienen: *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, entre otras.

j. Familia Flavobacteriaceae

- . Bacilos aerobios móviles, Gram negativos. Tamaño de 2 a 5 μm de largo por 0,3 a 0,5 μm de ancho.
- . En su mayoría son psicrótrofos. Típicos de agua dulce y salada.
- . Generan coloraciones anormales en superficies de carnes, mariscos, aves, huevos, mantequilla y leche. De amarillo a naranja.



Figura 11. *Flavobacterium psychrophilum*

Fuente: León y otros (2008)

- . Es una bacteria oportunista, es decir que en organismos inmunocomprometidos puede llegar a ser muy grave o mortal.
- . El principal género es el *Flavobacterium*.

k. Familia *Bacillaceae*

- . Bacilos Gram positivos, endosporados.
- . Habita en agua, suelo, intestino animales.
- . Resistente a condiciones ambientales.
- . Aerobios estrictos y anaerobios facultativos.
- . Algunos importantes en la producción de antibióticos.
- . Su temperatura de crecimiento está entre 20 a 40 °C, con un óptimo de 37 °C.
- . Flagelación peritrica en caso de tener motilidad.
- . Entre los principales géneros se tienen: *Bacillus*, *Halobacillus*, *Saccharococcus*, *Virgibacillus*, entre otros.



Figura 12. *Bacillus subtilis* esporulado

Fuente: Breed y otros. Manual de Bergey (2008)

I. Familia *Streptomycetaceae*

- . Son bacterias Gram positivas, de metabolismo aerobio y crecen en forma de micelio multirramificado en el que se forman conidios en cadena.
- . Viven principalmente en la tierra, resultando esencial para la renovación de sus nutrientes.



Figura 13. *Streptomyces* spp

Fuente: Madigan y otros (ob. cit)

- . Algunas especies hidrolizan la quitina y otras la celulosa y hemicelulosa; otras oxidan hidrocarburos del tipo de las parafinas.
- . Produce mayor número de antibióticos.
- . Género esencial: *Streptomyces*.

m. Familia *Mycobacteriaceae*

- . Aeróbicas cilíndricas que no forman esporas, Gram positivas.
- . Alcohol ácido resistente. Su pared celular no capta con facilidad los colorantes.
- . Bacilo causante de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*).

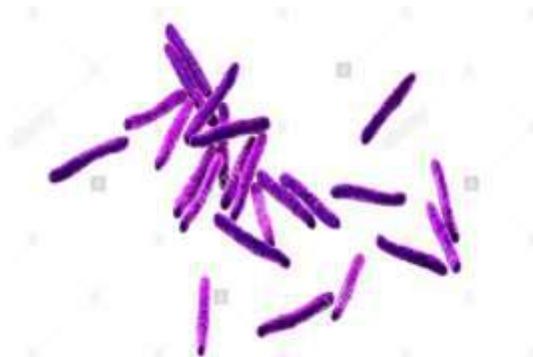


Figura 14. *Mycobacterium tuberculosis*

Fuente: Ryan y Ray (ob. cit)

n. Familia *Propionibacteriaceae*

- . Bacterias pequeñas inmóviles, de forma bacilar, Gram positivas, no esporuladas.
- . Son catalasa positiva de carácter aeróbico.
- . Fermentan el ácido láctico, los carbohidratos y los polialcoholes para producir ácidos propiónicos, acético y dióxido de carbono.
- . Las pigmentadas pueden causar modificaciones del color del queso.
- . Género relevante: *Propionibacterium freudenreichii*.



Figura 15. *Propionibacterium macnes*

Fuente: Madigan y otros (ob. cit)

o. Familia *Microbacteriaceae*

- . Bacilos aerobios inmóviles y no esporulados, Gram positivos.
- . Crecen a temperaturas entre 15 a 35 °C. Son termodúricas, resistiendo a temperaturas de pasteurización, incluso a 80 – 85 °C.
- . Tiene capacidad de acidorresistencia.
- . Catalasas positivas, homofermentativas.
- . Se pueden obtener vitaminas de él.
- . Especies de interés: *Microbacterium lacticum*, *M. oxydans*, *M. aurum*, entre otros.

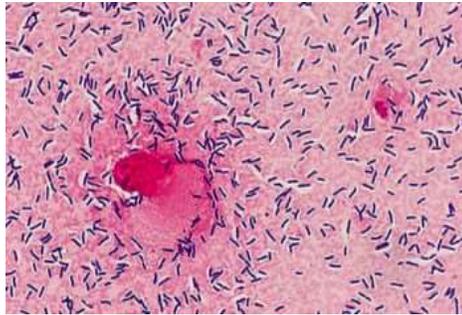


Figura 16. *Microbacteriumoxydans*

Fuente: Meng y otros (2016)

p. Géneros inciertos

p.1. *Brevibacterium*

- . Microorganismos del suelo Gram positivos.
- . Se presenta ubicuamente sobre la piel humana, causando olor corporal.
- . Se emplea en la fermentación de quesos, produciendo manchas superficiales de pigmentación rojiza a naranja.
- . Especies de interés: *Brevibacterium acetyliticum*, *B. linens*, *B. casei*, entre otras.

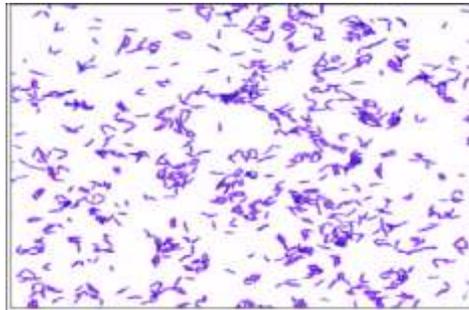


Figura 17. *Brevibacterium casei*

Fuente: Jung y otros (21014)

- . Bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram positivos, inmóviles, aerobio facultativo.
- . Catalasa positiva, no esporulado, que carecen de motilidad.
- . Su tamaño oscila entre 2-6 micrómetros de longitud y 0,5 micrómetros de diámetro.
- . Especies de interés: *Corynebacterium diphtheriae*, *C. glutamicum*, *C. pseudotuberculosis*, entre otros.



Figura 18. *Corynebacterium diphtheriae*

Fuente: Burkovski (2013)

1.6.2. Características generales de los hongos: Mohos y levaduras

- . Son organismos eucariotas, uni y pluricelulares, de morfología filamentosa (mohos) y no filamentosa (levaduras).
- . Representan la segunda clasificación microbiana de mayor presencia en la tierra, conociéndose setenta mil (70.000) especies, estimándose que representa sólo el 10% de los que habitan en el planeta.
- . La mayor parte tiene pared celular definida (quitina y/o celulosa).
- . Sus tamaños son variables, pudiendo ser microscópicos (2 a 10 μm), y macroscópicos, alcanzando varios milímetros.
- . Su reproducción puede ser asexual y sexual: Asexual por gemación (protuberancia de la célula madre) y esporulación (Canidiosporas, Esporangiosporas, Astrosporas, Clamidiosporas y Blastosporas); y sexual por fisión de núcleos (Ascosporas, Basidiosporas, Zigosporas y Oosporas).
- . Son organismos que carecen de clorofila, por lo que su nutrición es por absorción.
- . Crecen a diferentes temperaturas, pero generalmente entre 0 a 55 °C, siendo la óptima entre 30 a 37 °C al parasitar a un huésped, y entre 22 a 30 °C cuando son saprófitos.
- . Son organismos acidófilos; es decir, soportan condiciones de bajo y elevado pH, siendo el rango de 2 a 9, con un crecimiento óptimo entre 3,8 a 5,6; preferiblemente de 5,6.
- . Su nutrición es heterótrofa; es decir, se alimentan de materia orgánica, pudiendo ser parásitos, saprofitos y simbióticos. Sus fuentes nutritivas son: carbono orgánico (glucosa, sacarosa, maltosa); complejos orgánicos complejos (almidón y celulosa); nitrógeno orgánico (peptona) y nitrógeno inorgánico (sales de amonio y nitrato).
- . Son de metabolismo aeróbico (mohos u hongos filamentosos) y facultativos (levaduras u hongos unicelulares), que se desarrollan en un rango de actividad de agua cercano a 0,75 (mohos) y 0,88 (levaduras), a concentraciones azucaradas de 4 a 5%, pudiendo soportar condiciones adversas de salinidad de hasta un 15%, fundamentalmente mohos.

- . Efectos benéficos: maduración de quesos (*Penicilliumroqueforti*, *Mucor*), fermentaciones alcohólicas (levaduras), obtención de antibióticos, entre otros.
- . Efectos perjudiciales: Adhesividad y barbas (superficie algodonosa por mohos), putrefacción por mohos y coloraciones anormales por mohos y levaduras.

1.6.2.1. Características generales de los mohos

- . Están constituidos por unos filamentos ramificados y entrecruzados llamados hifas cuyo conjunto forman el micelio. Las hifas pueden ser sumergidas; es decir, de crecimiento en la masa del alimento, y aéreas o de crecimiento externo.
- . Las hifas pueden ser septadas, con tabiques transversales que la dividen en varias celdas, y no septadas, cilíndricas, sin tabiques, que poseen núcleos diseminados en toda su longitud, por lo que se consideran como multicelulares.
- . La mayoría de las hifas carecen de color en visión microscópica, siendo claras, aunque hay unas oscuras o ahumadas.

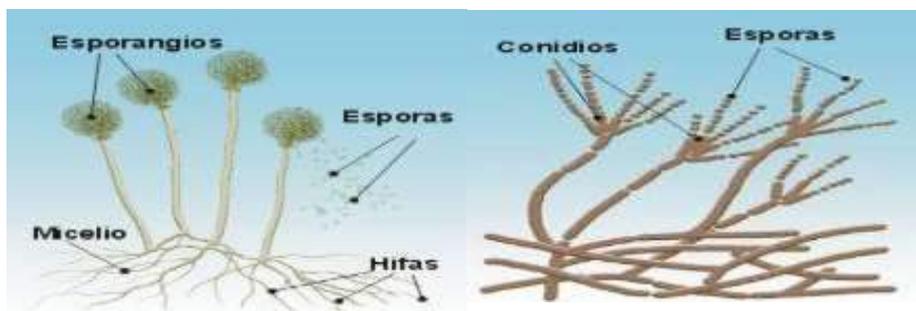


Figura 19. Estructura de los mohos *Rhizopus* y *Penicillium*

Fuente: Madigan y otros (ob. cit)

- . Necesitan menos humedad que levaduras y bacterias, pudiendo sobrevivir en rangos cercanos al 14 – 15% en alimentos; es por ellos la desecación en harinas y frutos secos, para evitar su desarrollo.
- . La mayoría de los mohos se pueden considerar mesófilos, creciendo bien a temperaturas de climas tropicales, entre 25 a 30 °C.
- . Necesitan oxígeno para desarrollarse (aerobios) y pH entre 2 a 9, creciendo a niveles bajos.
- . Poseen gran cantidad de enzimas hidrolíticas, obteniéndose de ellos amilasas, pectinasas, proteinasas y lipasas.
- . Su crecimiento es lento comparado con el de bacterias y levaduras, por lo que, cuando las condiciones son favorables para el desarrollo de todos ellos, los mohos están en condiciones desfavorables de competencia; sin embargo, una vez iniciado su crecimiento, puede ser rápido. Para ello algunos elaboran sustancias que

son inhibidores para otros llamados antibióticos; como mecanismo de defensa ante el resto de la población microbiana que esté presente en el ecosistema donde habita.

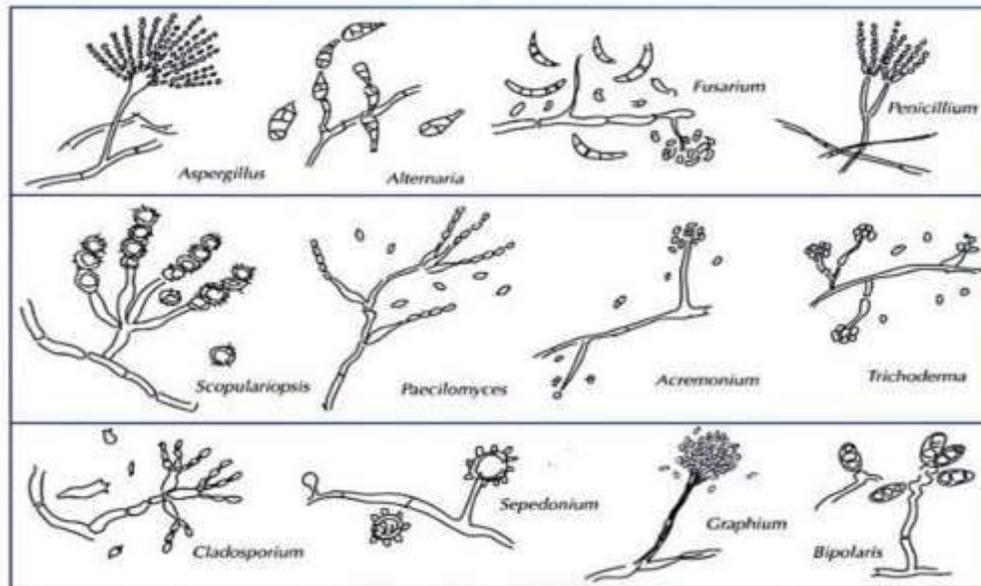


Figura 20. Estructura de diversos mohos

Fuente: Forsythe (ob. cit)

. Son *Eumycetes* (hongos propiamente dichos), que conforman múltiples géneros, entre ellos: *Mucor*, *Zygorrhynchus*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Thamnidium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichothecium*, *Geotrichum*, *Monilia*, *Sporotrichum*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Trichoderma*, *Scopulariopsis*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Alternaria*, *Stemphylium* y *Fusarium*.

. De importancia industrial se especifican algunos como:

a. *Mucor*: Alteran algunos alimentos y se emplean en la elaboración de otros. Ejemplo: *M. racemosus* en la sacarificación del almidón y *M. gamselost* en la maduración de quesos y en la elaboración de alimentos orientales.

b. *Rhizopus*: Llamado hongo del pan. Alteran aparte del pan otros alimentos como hortalizas, frutas diversas.

c. *Aspergillus*: Muy abundantes. Muchos son responsables de la alteración de alimentos, principalmente en aquellos de alta concentración salina y baja actividad de agua como carnes deshidratadas (*A. glaucus*, *A. repens*), micotoxinas en cereales (*A. niger*), entre otros. Otros son beneficiosos para obtener enzimas (*A. niger*) e intervienen en la elaboración de alimentos orientales fermentados (*A. flavus*, *A. oryzae*).

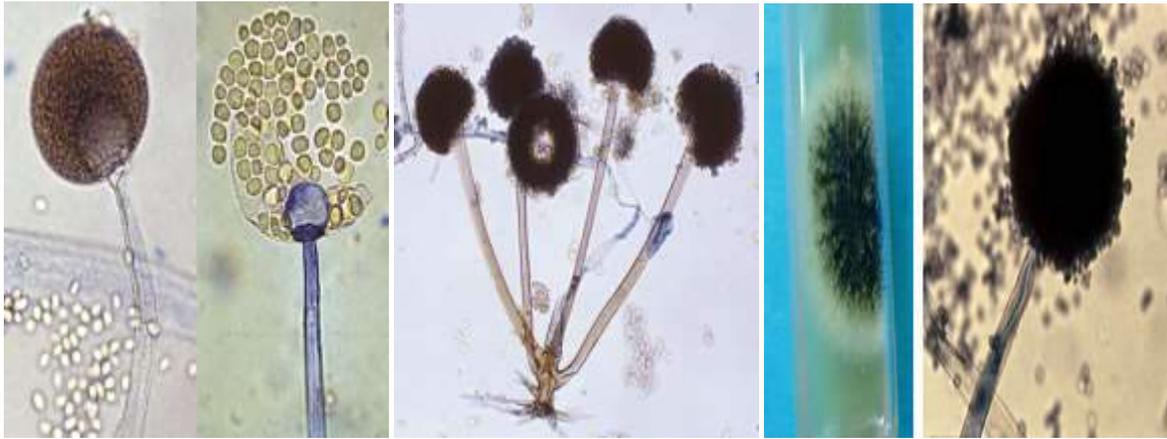


Figura 21. Diversos mohos: *Mucor*, *Rhizopus* y *Aspergillus*

Fuente: Moreno (1988)

d. *Penicillium*: Abundante. Se emplean para la maduración de quesos (*P. camemberti*, *P. roqueforti*), micotoxinas en cereales (*P. ochraseus*), antibióticos (penicilina por *P. chrysogenum*).

e. *Sporotrichum*: Crecen en carnes refrigeradas, generando manchas blancas (*S. carnis*).

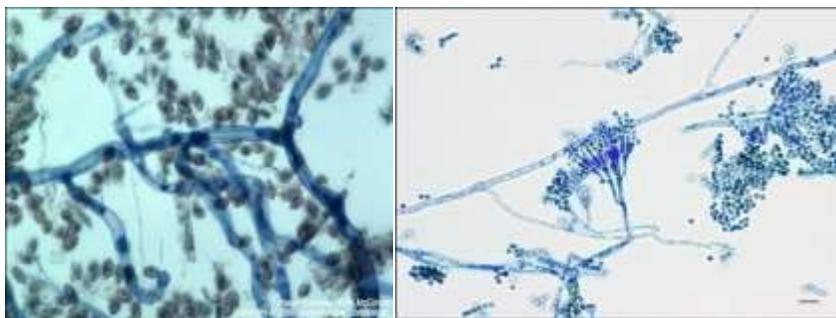


Figura 22. Diversos mohos: *Penicillium* y *Sporotrichum*

Fuente: Moreno (ob. cit)

1.6.2.2. Características generales de las levaduras

. Su forma es muy variable, siendo ella esférica, ovoide, alimonada, piriforme, cilíndrica, triangular e incluso alargada en forma de micelio verdadero o falso.

. Se reproducen asexual y sexualmente. Asexualmente en su mayoría por gemación polar o multilateral. Unas pocas especies se multiplican por escisión y una sola por combinación de escisión y gemación. Sexualmente por ascosporas.

. Son oxidativas, fermentativas o ambas cosas a la vez. Las oxidativas crecen formando una película o velo sobre la superficie de los líquidos. Las fermentativas crecen en toda la masa líquida.

. Crecen en medios de alta actividad de agua (a_w entre 0,88 a 0,94), aunque necesitan menos que las bacterias, pero más que los mohos. Algunas son osmofílicas, creciendo lentamente en ambientes de baja actividad de agua (0,62 a 0,65).

. Su temperatura de crecimiento está en el óptimo de 25 a 30 °C y un máximo de 35 a 47 °C. Algunas pueden soportar 0 °C o menos.

. El crecimiento de la mayoría de las levaduras se ve favorecido por un pH próximo a 4 – 4,5 y no se desarrollan bien en medio alcalino a menos que se haya adaptado al mismo.

. Son facultativas, creciendo mejor en condiciones aeróbicas, generando oxidación de ácidos orgánicos y alcoholes, además de biomasa; mientras que en condiciones anaeróbicas fermentan los azúcares, generando alcohol etílico.

. Dentro de su clasificación están las levaduras ascospórogenas, dentro de ellas los siguientes géneros: *Schizosaccharomyces*, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Lipomyces*, *Nadsodia*, *Saccharomycodes*, *hanseniospora*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Pityrosporum*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Trichosporon* y *Rhodotorula*.

. Dentro de las levaduras de importancia para la industria de los alimentos están:

a. Género *Saccharomyces*

. Células que pueden ser redondas, ovaladas o alargadas, que pueden formar pseudomicelio.

. Su reproducción es asexual, por gemación multipolar o por formación de ascosporas que pueden seguir a la conjugación. En su fase vegetativa se pueden desarrollar a partir de células diploides.

. Se desarrollan bien a 20 – 25 °C (levaduras de fermentación alta), ubicándose en la superficie del mosto. Las levaduras de fermentación baja se ubican en el fondo y se desarrollan bien a temperaturas entre 10 – 15 °C.

. De interés: *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (fabricación de vinos), *S. carlbergensis* en la obtención de cervezas y *S. rouxii* en fermentación de la leche.

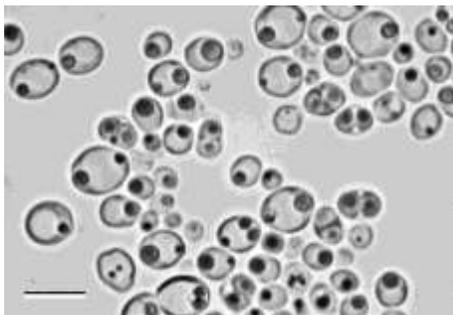


Figura 23. *Saccharomyces cerevisiae*

Fuente: Moreno (ob. cit)

b. Género *Candida*

. Forma hifas verdaderas o falsas con abundantes células en gemación o blastosporas. Pueden formar clamidosporas.

- . Existen en el suelo y agua dulce, vegetales, frutas, exudado de árboles, granos y en general toda sustancia rica en hidratos de carbono simples. Además, son habitantes habituales del aparato digestivo, respiratorio y regiones muco cutáneas del hombre y animales domésticos.
- . Muchas son halofílicas y acidófilas, por lo que forman películas y alteran los alimentos salados y muy ácidos.
- . De interés: *C. utilis* (obtención de proteínas unicelulares), *C. krusei* (en fermentos lácticos), *C. lipolytica* (lipólisis en mantequillas y margarinas) y *C. albicans* (micosis mucosa oral, digestiva y genital).

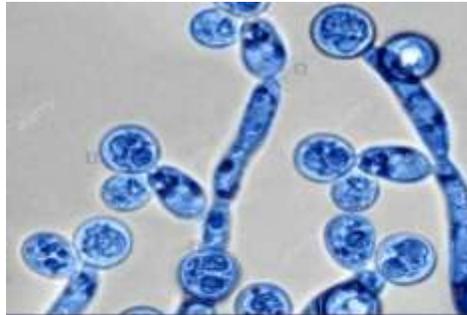


Figura 24. *Candida albicans*

Fuente: Rvan v Rav (ob cit)

c. Género *Pichia*

- . Género de la familia *Saccharomycetaceae*, con células ovales o cilíndricas, elípticas u oblongas, que pueden formar pseudomicelio.
- . Presenta ascosporas redondas o en forma de sombrero, en número de una a cuatro por asca.
- . Su reproducción puede ser asexual por brotación multilateral y sexual por formación de ascosporas.
- . Responsable de muchas películas o velos en líquidos, como en cervezas y vinos.
- . No fermentan la lactosa, asimilando el nitrato.
- . Se conocen más de cien especies y muchas de ellas se encuentran en plantas en descomposición, otras en leche cruda y queso.
- . De interés: *P. membranaefaciens* (formación de velo en el queso crema), *P. anómala* (combate al *Aspergillus flavus*, evitando producción de aflatoxinas, además de proteger cultivos agrícolas de mohos indeseables que afectan los rendimientos de los cultivos).

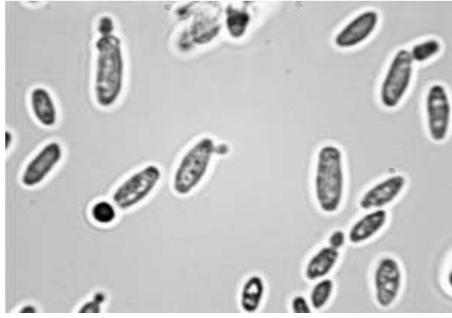


Figura 25. *Pichia kudriavzevii*

Fuente: Ryan y Ray (ob. cit)

1.6.3. Características generales de los protozoos

- . Son unicelulares, de naturaleza eucariota, heterótrofos, fagótrofos (depredadores de algas, bacterias y microhongos unicelulares o filamentosos).
- . Su tamaño es variable, extendiéndose generalmente desde los 10 a 50 μm .
- . Son flagelados, por lo que se pueden desplazar por el ambiente, principalmente acuático.
- . Viven en ambientes húmedos o acuáticos (dulces o salados), o como parásitos de otros seres vivos. Desempeñan un papel como herbívoros, como controladores de la biomasa microbiana.
- . Son una importante fuente de alimentos para los microinvertebrados, además juegan un papel fundamental en la ecología por la transferencia de la producción bacteriana y algácea a los niveles tróficos sucesivos.
- . Su reproducción puede ser asexual (por fisión binaria o múltiple: bipartición) y sexual (por isogametos o intercambio de material genético).
- . Se clasifican tradicionalmente en:

a. Rizópodos o sarcodinos:

- . Son ameboides que se desplazan por pseudópodos (proyección del citoplasma y deformaciones del citoplasma).
- . Engloban alimentos en su interior (fagocitosis) por pseudópodos (falsos pies).
- . Tienen la capacidad de enquistarse, con vacuolas digestivas.
- . Se pueden encontrar cubiertos únicamente por una membrana plasmática.
- . Se dividen por fisión binaria simple y pocos con fisión múltiple.
- . En este grupo aparecen individuos de vida libre y parásitos.
- . De interés: *Entamoebahistolityca* (amebiasis o amibiasis), *Entamoebagingivalis* (vive en boca de mamíferos).

b. Ciliados:

- . Rodeados de cilios, que son filamentos cortos y muy numerosos que en su movimiento provocan el desplazamiento de la célula o para la captura de alimento.
- . En el citoplasma se observa un macronúcleo que se encarga del control de la célula y un micronúcleo que actúa en la reproducción sexual que presenta este grupo.
- . Su reproducción asexual es por procesos de bipartición o gemación. También puede reproducirse sexualmente mediante conjugación.
- . Tienen vida libre en aguas dulces y marinas
- . Género de interés: *Paramecium* (aparece en aguas dulces que contienen restos vegetales).

c. Flagelados:

- . Poseen uno o más flagelos largos en una o en todas las fases de su ciclo vital para su locomoción y para la captura del alimento y pueden ser receptores sensoriales.
- . Abundan en las aguas dulces y saladas, además del suelo. Junto con las diatomeas, constituyen gran parte del alimento de algunos animales acuáticos.
- . Su cuerpo celular puede ser oval, alargado o esférico, de núcleo simple.
- . Se reproducen mediante fisión binaria longitudinal y otras por escisión múltiple. Muy pocas por reproducción sexual.
- . Muchas son parásitas y generan enfermedades tanto en invertebrados como en vertebrados.
- . De interés: *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas), *Trypanosoma gambiense* y *T. rhodesiense* (parásitos que producen la mortal enfermedad del sueño)

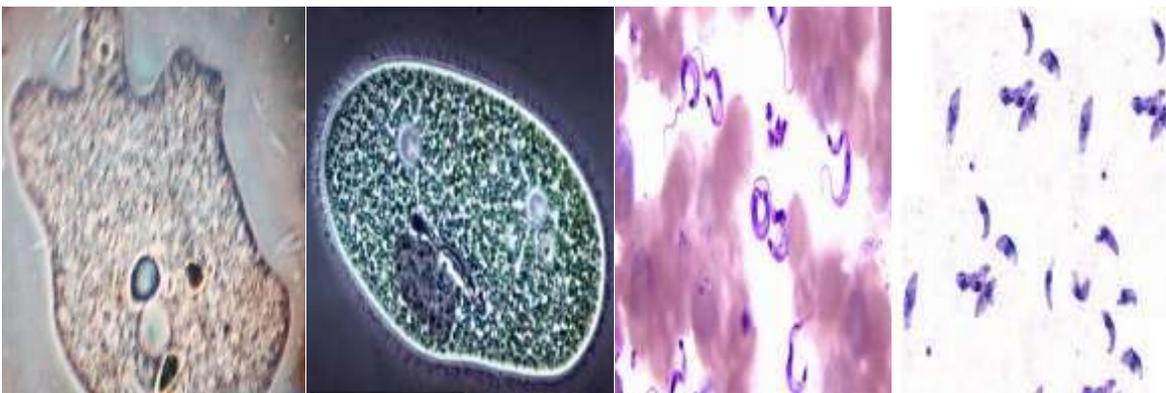


Figura 26. Diversos protozoos: a. Rizópodos (*Entamoeba histolytica*); b. Ciliados (*Paramecium*); c. Flagelados (*Trypanosoma cruzi*) y d. Esporozoos (*Toxoplasma gondii*)

Fuente: Tortora y otros (2007)

a. Esporozoos:

- . Parásitos con una fase de esporulación (división múltiple) y sin mayor movilidad.

- . Son de estructura simple que viven en el interior de las células, cavidades o líquidos corporales.
- . De interés: *Plasmodium malarie* y *P. falciparum* (causante de la malaria), *Toxoplasma gondi* (produce la toxoplasmosis).

1.6.4. Características generales de las algas

- . Capaz de realizar fotosíntesis (autótrofas) y obtener carbono orgánico con luz solar (fotótrofa).
- . Casi siempre viven en medios acuáticos, pudiendo ser uni y pluricelulares.
- . Viven prácticamente en todos los medios, aunque están muy relacionadas con el medio acuático, pudiendo crecer también en suelos, nieve, vegetales, entro otros.
- . Se consideran organismos eucariotas, a excepción de las cianobacterias, también llamadas algas verdeazules. Hoy día el término "alga" se utiliza preferentemente para los eucariotas (a veces se encuentran los términos "algas eucariotas" y "algas procariotas").
- . Existen más de cuarenta y cinco mil (45.000) especies conocidas de ellas, desde las macroscópicas hasta las gigantes, que pueden llegar a alcanzar cien metros.
- . En general viven en ambientes acuáticos muy húmedos o en el agua, no siendo todas autótrofas, también hay mixótrofas; es decir, que además de realizar fotosíntesis pueden alimentarse de forma heterótrofa.
- . Su coloración es variable y depende de pigmentos presentes en los cloroplastos. Por ello se tienen: clorofila (verde), ficoeritrina (roja), fucoxantina (parda), caroteno (naranja), ficocianina (azul) y zeaxantina (amarilla).
- . Las algas rojas (*Rhodophyta*): Son fundamentalmente marinas con cloroplastos denominados rodoplastos con clorofila A.



Figura 27. Algunas especies de algas

Fuente: Tortora y otros (ob. cit)

- . Las algas verdes (*Chlorophyta* y *Charophyta*): Son principalmente de agua dulce que contienen clorofila A y B.

- . Las algas pardas (*Phaeophyceae*): Son pluricelulares y fundamentalmente marinas, pudiendo presentarse en formas flotantes libres.
- . Las algas doradas (*Chrysophyceae*): Son unicelulares o coloniales que viven principalmente en lagos y lagunas de agua dulce. Muy pocas son marinas.
- . Las algas verdes – amarilla (*Xanthophyceae*): Son unicelulares o coloniales filamentosas, principalmente de agua dulce.
- . Dentro de otros grupos se tiene a las Euglenoides (*Euglenophyta*): Son protistas unicelulares flagelados de agua dulce dotados de plastos verdes.

1.6.5. Características generales de los virus

- . Es un parásito obligado, infeccioso, acelular, de tamaño muy diminuto, inferior a 0,1 μm , que solo puede ser observado por microscopio electrónico. Son unas 100 veces más pequeños que las

bacterias. Sólo puede multiplicarse dentro de las células de otros organismos.

. La mayoría de los virus estudiados tienen un diámetro de entre 10 y 300 nanómetros ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Algunos *Filovirus* tienen un tamaño total de hasta 1400 nm, sin embargo, solo miden unos 80 nm de diámetro. Es por ello que dentro de la comunidad científica ha permanecido por años el consenso de no considerar a los virus como estructuras biológicas vivas.

. Los virus se caracterizan, a diferencia de los otros organismos, por presentar una única especie de ácido nucleico constitutiva que puede ser ADN o ARN, monocatenario o bicatenario con estructura de doble hélice.

. La mayoría de infecciones víricas acaban provocando la muerte de la célula huésped, entre cuyas causas están la lisis de la misma, las alteraciones de la membrana superficial de la célula y la apoptosis. Algunos virus no causan cambios aparentes en la célula infectada, como es el caso del virus del herpes.

. Son agentes que infectan todos los tipos de organismos, desde animales, plantas, bacterias, arqueas y hongos, hasta otros virus, siendo conocidos como virófagos.

. Su descubrimiento se debe a Dmitri Ivanovskien (1864 – 1920), en 1892, quien especificaba que había seres mucho más pequeños que las bacterias que no podían observarse con microscopio simple que incidían en la enfermedad del cultivo del tabaco. Luego se estudió el primer virus (mosaico del tabaco) por Martinus Beijerinck (1851 - 1931), en 1899; tomando como base lo expresado por Ivanovskien. Hoy día se han descubierto más de cinco mil (5000) que varían en su forma (helicoidales o icosaedros).

. Se componen de dos o tres partes: material genético (ADN o ARN), una cubierta proteica que protege los genes (cápsida), y en algunos una bicapa lipídica (envoltura vírica). Una partícula vírica completa, conocida como virión, que consiste en un ácido nucleico rodeado por una capa de protección proteica llamada cápside.

. No todos son productores de enfermedades dado que en el huésped se pueden producir respuestas inmunitarias permanentes a la infección. Por otro lado, las bacterias generan sistemas de restricción – modificación, como mecanismos de defensa contra los virus. Los antibióticos no tienen efecto sobre los virus, sólo los antivirales tratan este tipo de infecciones.

1.6.5.1. Morfología vírica

a. Helicoidal: Las cápsides se componen de un único tipo de capsómero apilado alrededor de un eje central para formar una estructura helicoidal. Su material genético normalmente está fomentado por ARN monocatenario y a veces ADN monocatenario. Ejemplo: virus del mosaico del tabaco.

b. Icosaédrica: Tiene 20 caras triangulares equiláteras con 12 vértices. El número mínimo de capsómeros idénticos es de doce, donde cada uno está compuesto de cinco subunidades iguales. Dentro de ellos está el virus del herpes.

c. Envoltura: Algunas especies de virus se envuelven en una forma modificada de las membranas celulares, ya sea la membrana externa que rodea la célula huésped infectada, o bien, membranas internas como la nuclear o retículo endoplasmático, consiguiendo una bicapa lipídica exterior conocida como envoltorio vírico.

La envoltura de un virus es una membrana constituida por una doble capa lipídica asociada a glicoproteínas que pueden proyectarse en forma de espículas desde la superficie de la partícula viral hacia el exterior. La mayoría de virus envueltos dependen de esta estructura para infectar. Entre ellos están el virus de la gripe y el VIH.

d. Compleja: Tienen una cápside que no es netamente helicoidal ni icosaédrica, pudiendo tener estructuras adicionales como colas proteicas o una pared exterior compleja.

1.6.5.2. Tipos de virus

Los tipos de virus se determinan de acuerdo al material genético y al método por el cual se replican. Anteriormente se especificó que los virus se caracterizan por presentar una única especie de ácido nucleico constitutiva que puede ser ADN (ácido desorribonucleico) o ARN (ácido ribonucleico), monocatenario o bicatenario con estructura de doble hélice. A raíz de ello se tiene:

a. Virus de ADN: Su replicación se produce en el núcleo de la célula. Son completamente dependientes de la síntesis de ADN y ARN de la célula hospedadora, en el que el genoma vírico debe atravesar la envoltura nuclear de la célula para acceder a estos ácidos nucleicos.

a.1. Virus de ADN bicatenario: Tiene su material genético compuesto por ADN de doble cadena y se replican usando ADN polimerasa, dependiente del ADN de la célula hospedadora y no del ARN, por lo que entran en su núcleo antes de replicarse. Este virus puede forzar a la célula a realizar división celular de forma crónica, pudiendo conducir a su transformación, y en una instancia producir cáncer. Dentro de ellos se tienen las siguientes familias: Mycoviridae y Corticoviridae (ambos bacteriófagos), Caulimoviridae (parasitan plantas), Adenoviridae y Papavaviridae (parasitan vertebrados), Plasmaviridae y Poxviridae (bacteriófagos).

a.2. Virus de ADN monocatenario: Su material genético está en el ADN de cadena sencilla, replicándose por un ADN polimerasa, dependiente del ADN de la célula hospedadora. Forma una sola cadena de nucleótidos en lugar de doble hélice en las células infectadas. Dentro de ellos se tienen las siguientes familias: Inoviridae y Microviridae (ambas infectas bacterias), Germiniviridae (parasitan plantas), Parvoviridae (parasitan a invertebrados y vertebrados como caninos).

a.3. Virus ADN monocatenario retrotranscrito: Son virus que se replican mediante la transcripción inversa, que es la formación de ADN a partir de una plantilla de ARN. Contienen un genoma de ARN,

utilizando un intermedio de ADN para replicarse. Los que los que contienen un genoma de ADN utilizan un intermedio de ARN durante la replicación del genoma.

b. Virus de ARN: Su información genética está codificada en el ARN, usándolo como material genético, creando copias de su genoma, o necesítándolo en su proceso de replicación, el cual se hace en el citoplasma de la célula hospedadora.

b.1. Virus de ARN bicatenario: Poseen ARN de cadena doble en su genoma, replicándose en el citoplasma, sin depender de las polimerasas de las células huésped como lo hacen los virus ADN. Cada segmento de ARN codifica una proteína. Dentro de ellos se tienen las siguientes familias: Reoviridae (infectan plantas e invertebrados), Birnaviridae (infectan vertebrados, como el virus infeccioso de la necrosis del páncreas), Cystoviridae (infectan bacterias).

b.2. Virus ARN monocatenario positivo: Su ARN es de cadena sencilla, de sentido positivo como material genético y no se replican usando ADN intermedio. Tienen genomas con la misma polaridad del ARNm (mensajero), pudiendo emplearse directamente en la síntesis de proteínas.

b.3. Virus ARN monocatenario negativo: Su ARN es de cadena sencilla, de sentido negativo y no se replica usando ADN intermedio. Es complementario del ARNm y se convierte en ARN positivo por una ARN polimerasa o transcriptasa, antes de la traducción, convirtiéndose así en infeccioso.

b.4. Virus de ARN monocatenario retrotranscrito: Conocido como ssRNA-RT, es de ARN de cadena sencilla en su genoma y se replica en la célula hospedadora por transcripción inversa, mediante la formación de ADN a partir del molde de ARN, usando la transcriptasa inversa codificada viralmente.

Por otro lado, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (CITV), ha propuesto un sistema internacional de clasificación, en el siguiente sistema de taxones: Orden (virales); Familia (viridae); Subfamilia (virinae); Género: Virus; Especie.

En la tablas 1 y 2 se presentan una serie de virus, de acuerdo al material genético característico:

Tabla 1. Virus de ADN

Familia	Género	Ejemplo	Enfermedad
Herpesviridae	Alphaherpes-virinae	Herpes simple virus tipo 1 (HHV-1)	Encefalitis, estomatitis aguda, llaga labial del resfriado
		Herpes simple virus tipo 2 (HHV-2)	Herpes genital, encefalitis
		Varicella zoster virus (HHV-3)	Varicela, Herpes Zoster
	Gammaherpes-virinae	Epstein Barr virus (HHV-4)	Mononucleosis hepatitis, tumores (BL, NPC)
		Sarcoma de Kaposi, asociado al	Probablemente: tumores, Sarcoma de Kaposi (KS) y

FUNDAMENTOS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL

		herpesvirus (KSHV-8)	algunos linfomas de células B
	Betaherpes-virinae	Citomegalovirus humano (HHV-5) Herpes virus humano 6 Herpes virus humano 7	Mononucleosis, hepatitis, pneumonitis, congénitas Roseola, pneumonitis Posibles casos de Roseola
Adenoviridae	Mastadeno-virus	Adenovirus humano	49 serotipos (especies); infecciones respiratorias
Papovaviridae	Papilloma-virus	Virus Papillomahumano	70 especies; verrugas y tumores
	Polyoma-virus	JC, BK virus	Usualmente poco graves; JC causa PML en Sida
Hepadnaviridae	Hepadna-virus	Virus de la Hepatitis B	Hepatitis (crónica), cirrosis, tumores hepáticos
Poxviridae	Orthopox-virus	Virus Vaccinia Virus Monkeypox	Virus de la vacuna de la viruela Enfermedades como la viruela, zoonosis.
Parvoviridae	Parapox-virus	Virus Orf	Lesiones dérmicas
	Parvo-virus	B19 parvovirus	Exantema infeccioso, crisiaplástica, pérdida fetal
	Dependo-virus	Virus Adeno-asociado	Útil para la terapia génica; se integra en el cromosoma

Fuente: Resumen tomado de Vargas (2016)

Tabla 2. Virus de ARN

Familia	Género	Ejemplo	Enfermedad
Picornaviridae	Entero-virus	Poliovirus	3 tipos: meningitis aséptica, poliomeilitis paralítica
		Echovirus	32 tipos: meningitis aséptica, erupciones
		Coxsachievirus	29 tipos: meningitis aséptica, miopericarditis
	Hepato-virus	Virus de la Hepatitis A	Hepatitis aguda (propagación fecal – oral)
	Rhino-virus	Rinovirus humano	115 tipos: Resfriado común
Caliciviridae	Calici – virus	Virus de Norwalk	Enfermedades gastrointestinales
	Hepe – virus	Virus Hepatitis E	Hepatitis aguda
Paramyxoviridae	Paramyxo – virus	Virus de Parainfluenza	4 tipos: Resfriado común, bronquitis, neumonía
	Rubula – virus	Virus de las paperas	Paperas: parotitis, meningitis aséptica (Raro: orquitis, encefalitis)
	Morbilli – virus	Virus del sarampión	Sarampión: fiebre, exantema (Raro: encefalitis, SSPE)
	Pneumo – virus	Virus sincital respiratorio	Resfriado común (adultos), broquiolitis, neumonía (niños)
Orthomyxoviridae	Influenza – virus A	Influenza virus A	

	Influenza – virus B	Influenza virus B	Flu: fiebre, mialgias, malestar general, tos, neumonía
Rhagdoviridae	Lyssa – virus	Virus de la rabia	Rabia: incubación larga y después enfermedad del SNC y muerte
Filoviridae	Filo – virus	Virus de Ébola y Marburg	Fiebre hemorrágica, muerte
Bornaviridae	Borna – virus	Enfermedad de Borna virus	No muy claro; relacionado con enfermedades tipo esquizofrenia en algunos animales
Retroviridae	Onco – virinae	Virus linfotrófico humano T tipo 1	Leucemia de células T del adulto (ATL), paraparesia espástica tropical (TSP)
	Spuma – virinae	Virus humano espumoso	No se conoce patología
	Lenti – virinae	Virus tipo 1 y 2 de la inmunodeficiencia	SIDA, enfermedad del SNC
Togaviridae	Rubi – virus	Virus de la Rubeola	Exantema; malformaciones congénitas
	Alpha – virus	Virus de la encefalitis equina (WEE, EEE, VEE)	Transmitida por mosquitos, encefalitis
Flaviviridae	Flavi – virus	Virus de la fiebre amarilla Virus del dengue	Nacido de mosquitos; fiebre, hepatitis (fiebre amarilla) Transmitida por mosquitos; fiebre hemorrágica
		Virus de la encefalitis de San Luis	Transmitida por mosquitos; encefalitis
	Hepaci – virus	Virus de la Hepatitis C	Hepatitis (con frecuencia crónica), cáncer hepático
Reoviridae	Rota – virus	Rotavirus humano	6 tipos: diarrea
	Colti – virus	Virus de garrapatas de Colorado	Transmitido por garrapatas; fiebre
	Ortho – reovirus	Reovirus humano	Enfermedad leve
Bunyaviridae	Hanta – virus	Síndrome pulmonar Hantavirus Hantaan virus	Propagado por roedores; enfermedad pulmonar Propagado por roedores; fiebre hemorrágica con Síndrome renal
	Phelo – virus	Virus de Nápoles	Causan síntomas desde fiebres autolimitantes: fiebre pappataci, encefalitis y fiebre hemorrágica viral.

Fuente: Resumen tomado de Vargas (ob. cit)

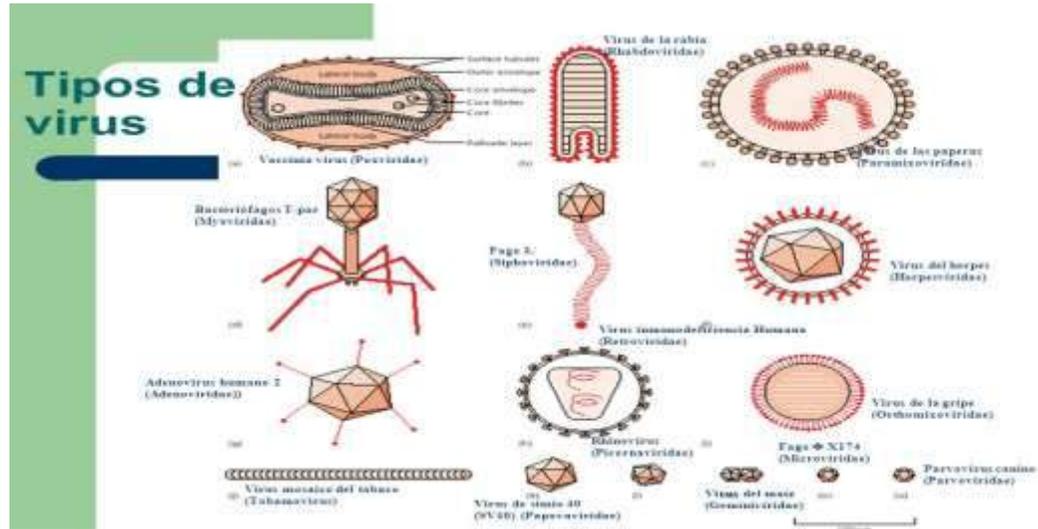


Figura 28. Tipos de virus
Fuente: Romero (2007)

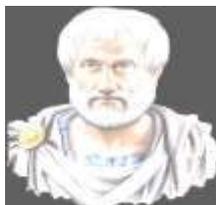
1.7. Precursores de la microbiología

Siguiendo el esquema clásico de Collard (1985), se distinguen cuatro períodos en el desarrollo de la microbiología:

- a. Especulativo: Extendido desde Aristóteles hasta la invención del microscopio.
- b. Descubrimiento de los microorganismos por Anton Van Leeuwenhoek (1632 – 1723), en 1675, hasta mediados del siglo XIX.
- c. Cultivo de microorganismos hasta finales del siglo XIX, donde Robert Koch y Louis Pasteur logran hacer descubrimientos relevantes en función al nacimiento de la microbiología como ciencia experimental.
- d. Surgimiento de las disciplinas especializadas de la microbiología, desde principios del siglo XX hasta hoy día, donde se estudian los seres vivos diminutos en toda su complejidad fisiológica, bioquímica, genética, ecológica, entre otras. Entre las ramas nacientes están: Virología, Bacteriología, Micología, Microbiología Ambiental, Microbiología de Alimentos, entre otras.

Desde antes de Cristo han surgido una serie de precursores de esta ciencia; entre ellos:

1.7.1. Aristóteles (384 – 322 a. C) y la abiogénesis



De acuerdo a Campbell (2003), representaba la autoridad intelectual del momento, por un lado, aparte de la autoridad moral personificada por la Biblia. En conjunto con las opiniones de escritores clásicos como Galeno (129 – 201 d. C), Plinio el viejo (23 – 79 d. C) y Lucrecio (99 – 55 a. C), dieron carta de naturaleza a la idea de que algunos seres vivos podían originarse a partir de materia inanimada, o bien a partir del aire o de materiales en putrefacción. Aristóteles fue reconocido, aparte del padre de la lógica, como el de la biología, por formular

la teoría de la generación espontánea o abiogénesis, la cual sostenía que ciertas formas de vida (animal y vegetal), surgían de manera directa, a partir de materia orgánica e inorgánica o de una combinación de las mismas.

1.7.2. Francesco Redi (1621 – 1697)



Posteriormente esta teoría de abiogénesis fue puesta en entredicho por los experimentos de este médico italiano, quien había acuñado la expresión “*Omne vivum ex ovo*” en 1668, demostrando que si un trozo de carne era cubierto con gasa de forma que las moscas no podían depositar allí sus huevos, no aparecían “gusanos”, que él correctamente identificó como fases larvarias del insecto. Demostró así que los insectos no nacen por generación espontánea, y que los gusanos no se desarrollaban espontáneamente de la carne descompuesta, sino que las moscas depositaban sus huevos sobre ésta y de esa manera se producía el desarrollo de los mismos.

1.7.3. Girolamo Fracastoro (1453 – 1553)



Por otro lado, en el Renacimiento europeo, Girolamo Fracastoro (1483 – 1553), en su libro “*De contagione et contagionis*” (1546) dice que las enfermedades contagiosas se deben a “gérmenes vivos” que pasan de diversas maneras de un individuo a otro. Estos inicios de explicación que renunciaban a invocar causas sobrenaturales fueron probablemente catalizados por la introducción en Europa de la sífilis, una enfermedad en la que estaba clara la necesidad de contacto para su contagio. Pero la “cosa” que se transmite en la enfermedad siguió siendo objeto de conjeturas durante mucho tiempo.

1.7.4. Anton Van Leeuwenhoek (1632 – 1723)



Nacido en Países Bajos (Holanda), fue un comerciante dedicado a pulir lentes, de muy poca formación básica y menos universitaria. Aún así logró desarrollar un microscopio primitivo en 1676, con el que observó y describió unas pequeñas estructuras a las que llamó animáculos. No fue el primero en ver los microorganismos, pero sí en dar a conocer sus observaciones; que por no tener relación con el mundo científico y no hablar otro idioma que no sea el holandés, tuvo conflictos para comunicarlas. Ante esta particularidad, optó por dibujarlas, dado que pudo ampliar más de 200 a 300 veces las imágenes con estos instrumentos simples que logró construir. Con ellos visualizó estructuras microscópicas de semillas y embriones de plantas, espermatozoides, describió con ciertos detalles a los hematíes del hombre y de ciertos animales.

Fue el primero en descubrir microorganismos en aguas estancadas, en restos de alimentos y bacterias en sarro dental; logrando esquematizarlas en morfología de cocos, bacilos y espirilos. De esta manera todas las clases de microorganismos celulares que hoy se conocen: protozoos, algas, mohos, levaduras y bacterias;

fueron descritas por vez primera por este pulidor de cristales. Luego, al nacer en Inglaterra en la Royal Society, pudo transmitir sus descubrimientos durante casi 50 años en esta institución que se encargaba de recopilar avances científicos.

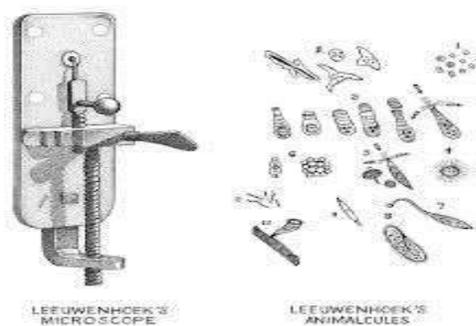


Figura 29. Microscopio simple de Leewenhoek y figuras observadas
Fuente: Madigan y otros (ob. cit)

1.7.5. Louis Pasteur (1822 – 1895)



Nació en Dole, Francia, en una familia humilde; graduándose de químico y doctorándose luego en esta ciencia en 1847. Entre sus aportes están:

a. Refutación de la teoría de la generación espontánea: Rebató esa teoría entre los años 1859 y 1861; demostrando que los microorganismos vivos pasan a través del aire con las partículas de polvo, y que el algodón sirve de filtro para impedir el paso de estos diminutos corpúsculos, tal como lo especificaron en 1854 Schröder y VonDusch. Desde ese descubrimiento hasta hoy, se usan los tapones de algodón para proteger tubos y frascos con el mismo propósito.

Otro aporte importante de este francés fue demostrar que una infusión adecuadamente calentada libera de microorganismos, y que se mantendrá abiótica aunque se exponga al aire, mientras no se permita la entrada de polvo. Con esta experimentación de cuello de cisne o de “U”, logró demostrar que los microorganismos no se generaban espontáneamente, sino que siempre se originan, como sucede en todas las clases de seres vivos, mediante la reproducción de otros seres vivos semejantes a ellos mismos. De esta manera contribuyó a refutar a Buffon y Needham con su teoría de la heterogenia.

Para Pasteur, al igual que otros investigadores, era necesario objetar esta teoría, debido a que confundía a la ciencia por creerse en ese momento que la vida se originaba a partir de material inerte, como resultado de la descomposición de tejidos animales y vegetales. Se remontó esta idea hasta los siglos XVI y XVII, creyéndose que sólo los organismos superiores se generaban a partir de unos padres, mientras que el resto aparecían de esta descomposición. En aquel tiempo era tan explícita esta teoría que investigadores como el conde de Buffon (Georges Louis Leclerc: 1707 - 1788) y JhonNeedham (1713 - 1781), en 1748, publicaron varios escritos en los que proclamaban que la vitalidad es una propiedad indestructible de la materia viva y

que las moléculas inertes que componen los seres vivos pueden agruparse de nuevo, dando origen a organismos microscópicos. Es decir, ellos no creían que los microorganismos nacieran espontáneamente, sino que procedían de la transformación de la materia orgánica preexistente. A esta teoría se le llamó heterogenia.

Para 1749 Needham experimentando con carne cocida, concluyó que esta materia orgánica era capaz de generar muchos microorganismos al putrefactar. Así se pensaba que los gusanos se originaban de la carne y los ratones de los granos. Este investigador trabajó con caldo de carnero hervido, lo tapó herméticamente con corchos y a intervalos examinó el caldo con su microscopio, apareciendo gran número de bacterias; pensó entonces que la ebullición destruía las células vivas y las que aparecían más tarde se habían generado espontáneamente.

Ante este pensamiento, surgen investigaciones relevantes que logran desmentir la abiogénesis, demostrando que los organismos vivos se originan a partir de otros organismos vivos y no de materia inanimada. A esta teoría se le llamó Biogénesis (bio: vida; génesis: origen). Uno de ellos fue Lázaro Spallanzani (1729 – 1799), quien para la misma época que Needham, en su intento de rebatirlo, hirvió caldo de buey en una solución nutritiva y en matraces por una hora, cerrando herméticamente ese sistema. Como resultado obtuvo que no hubo crecimiento de microorganismos en dicho caldo; sin embargo, no logró convencerlo por insistir que el aire es esencial para la generación espontánea.

Luego Franz Schulze (1815 – 1873) y Theodor Schwann (1810 – 1882), trabajando en forma independiente, descubrieron que el ácido en un experimento y el calor extremo en otro, eliminaban los microorganismos. El primero de ellos lo hizo pasar a través de soluciones fuertemente ácidas y le hacía llegar a matraces que contenían caldo hervido, mientras que el segundo hacía pasar aire por tubos al rojo vivo para luego enviarlos a matraces de caldo de la misma forma. Estos dos experimentos no lograban convencer a los abiogenesisistas, por insistir en que el ácido y el calor alteraban el aire, de tal manera que no podían soportar el crecimiento.

Es así como Heinrich Schröder (1810 - 1885) y Theodor VonDusch (1824 - 1890), en 1854, experimentaron con el paso de aire a través de tubos rellenos de algodón para luego hacerlo llegar a matraces con caldo previamente calentado. Comprobaron de esta manera que los microorganismos eran retirados del aire por filtración a través de las fibras de algodón. Posteriormente John Tyndall (1820 - 1893), construyó una caja exenta de polvo y colocó dentro de ella tubos llenos de caldo estéril, concluyendo que el caldo permanecía estéril tanto tiempo como la caja permanecía libre de polvo, donde estas partículas sedimentaban y quedaban atrapadas en tubos en forma de cuello de cisne que conducían a la caja. Con este experimento comprobó que los microorganismos eran transportados sobre partículas de polvo.

Este científico inglés fue el que proporcionó el argumento que dio fin a la doctrina de la abiogénesis con el experimento anterior; además de ello descubrió microorganismos esporulados en el heno y que las infusiones de este material en el agua eran difíciles de eliminar, por lo que requería de la ebullición duradera o del calentamiento intermitente, conocido como Tyndalización.

A raíz de este descubrimiento, Pasteur, en su afán de avanzar en la teoría de la fermentación, quería aportar algo más para terminar de refutar la abiogénesis. Para ello en 1859 preparó una solución nutritiva en matraces de largo y estrecho cuello de cisne; las calentó y dejó entrar y salir aire sin tapar ni filtrar. En dicha solución no hubo desarrollo microbiano alguno, debido a que las partículas de polvo que llevaban a estos seres vivos diminutos no habían podido llegar a la solución nutritiva porque se sedimentaron en la parte en forma de “U” del tubo.

b. Fermentación y pasteurización: Para esa época se pensaba que la fermentación y la putrefacción de la materia orgánica se producía a consecuencia de cambios originados principalmente por la acción del oxígeno y que el proceso era exclusivamente de carácter químico. Posteriormente Pasteur, siendo profesor de la Universidad de Lille (Francia), continuó sus estudios de fermentación iniciados en 1850, logrando demostrar que los cambios que ocurren en la materia orgánica (rica en azúcares), que daban como resultado la formación de alcohol, no eran simples procesos químicos, sino que se llevaban a cabo por la acción de levaduras vivas. Expresó que la fermentación era llevada a cabo por enzimas producidas por las células vivas, que promovían ciertos tipos de reacciones químicas, y que no solamente era alcohólica, sino que también era ácida, además de otras, y que en cada una de ellas intervenían microorganismos específicos.

Por esta circunstancia, especificó Pasteur que había que eliminar a aquellos microorganismos que estaban en el mosto de uvas para obtener alcohol etílico solamente; es decir, era necesario dejar libre este mosto de agentes biológicos nocivos, que generaban lo que denominaba enfermedad del vino. Para ello hizo varios calentamientos entre 60 a 65 °C, concluyendo que, a 63 °C por espacio de 30 minutos, era suficiente para eliminar microorganismos perjudiciales del proceso de vinificación, sin alterar la calidad del producto obtenido. Desde ese entonces se ha aplicado la tecnología de la pasteurización para eliminar microorganismos termosensibles; es decir, aquellos que no soportan temperaturas cercanas a 75 – 100 °C. Hoy día se tienen tecnologías de alta temperatura corto tiempo (HTST, iniciales en inglés), que opera a 72,5 °C por 12 a 15 segundos; siendo mucho más eficiente que la propuesta por este científico, denominada en ese entonces LHT (Low High Temperature), que significa calentamiento a bajas temperaturas.

c. Enfermedad del gusano de seda y el carbunco: En 1865 le pidieron que intentara descubrir la causa de la pebrina, enfermedad que amenazaba con arruinar el negocio de la cría del gusano de seda para la industria textil del sur de Francia. Logró demostrar que esta enfermedad era causada por gérmenes microscópicos y que se podía eliminar con el hecho de solo escoger para la cría huevos y larvas libres de

parásito. De esta manera contribuye a la teoría de las enfermedades microbianas, la cual contempla que “toda enfermedad tiene un agente causal microbiano”.

Para fortalecer esta teoría, Pasteur y posteriormente Koch, lograron comprobar que la enfermedad del carbunco, común del ganado vacuno y ovino, y ocasional en el hombre, eran causadas por bacterias, de forma de bastoncillos, tal como lo observaron P.F.O. Rayer (1793 – 1867) y C.J. Devaine (1812 – 1882), en los años 1855 a 1859, en la sangre de animales muertos. De esta manera es el carbunco la primera enfermedad que se demostró ser causada por una bacteria específica tanto en hombres y animales. Hoy día se conoce que esa bacteria es *Bacillus anthrax*, un aerobio Gram positivo, capaz de formar endoespora. De hecho, la palabra vacuna proviene del latín vacca, que tiene que ver con la aplicación en el ganado vacuno.

d. Preparación de vacunas para carbunco y rabia: Para ello en el lapso de 1860 – 1880, investiga la enfermedad de las aves de corral, conocida como cólera aviar; encontrando que los cultivos puros del germen de esta enfermedad conservados en laboratorio durante un tiempo, no mataban a los animales como lo hacían los cultivos frescos, pero causaban una enfermedad pasajera de la que los pollos se recuperaban. Después descubrió que los animales que se habían recuperado de una inoculación previa con organismos debilitados, eran inmunes y no sucumbían a la enfermedad al ser inoculados con cultivos frescos.

De esta manera Pasteur concluyó que este era un método científico para prevenir enfermedades, en el que estableció el principio de la vacuna, que manifiesta: “El microorganismo que mata es el microorganismo que cura”. Es así como confirma lo descubierto por Edward Jenner (1749 - 1823), médico inglés que en 1798 logró la vacunación contra la viruela por medio del virus vacuno.

Para 1895, Pasteur aplicó con éxito el principio de la vacunación para prevenir la rabia en humanos, a sabiendas hoy día que es ocasionada por un virus (*Rhabdoviridae*), pudo perfeccionar un sistema de vacunación con virus debilitados, logrando prevenir el desarrollo de esta fatal enfermedad si las inoculaciones se hacían poco después de haber sido mordido el sujeto por el animal rabioso. Obtuvo material rábico de la médula de conejos atacados con rabia, siendo tan relevantes sus investigaciones en esta área que logró demostrar finalmente la acción de esta vacuna cuando inoculó al niño Joseph Meister (Inglaterra), después de ser mordido por un perro rabioso y lograr salvarlo.

1.7.6. Joseph Lister (1827 – 1912)



Nació en Inglaterra, graduándose de médico en 1852, siendo posteriormente profesor de cirugía en las universidades de Glasgow y Edimburgo. Estando en esta primera casa de estudios, durante los años 1865 – 1869, comenzó a trabajar sobre las infecciones de las heridas, haciendo su primera publicación en 1867. Su gran anhelo era prevenir infecciones graves y a menudo fatales, que frecuentemente se producían después de las operaciones y heridas. Observó la similitud entre los cambios en las heridas infectadas y los procesos de putrefacción y

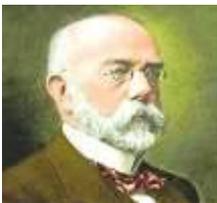
fermentación que Pasteur había atribuido a los microorganismos, concluyendo que “los microorganismos debían ser los causantes de las infecciones de las heridas”.

Lister estaba convencido de que las heridas se podían liberar de las bacterias si se protegían con la aplicación de una sustancia que matara a los microorganismos; es de esta forma que sentó las bases de su método antiséptico. Trabajó con el empleo de sustancias químicas bactericidas como el fenol y bicloruro de mercurio en el lavado de las heridas, manos y material quirúrgico, e incluso para la pulverización del aire. Con estas sustancias logró un gran descenso de las cifras de mortalidad post-operatoria y sentó las bases de la desinfección y antisepsia.

Comenzó utilizando el ácido fénico, que era una sustancia germicida muy profiláctica, aplicándola en las heridas de fracturas abiertas, en las que los huesos rotos atravesaban la piel. Este tipo de heridas solía infectarse muy seriamente produciendo muchas veces la muerte de quien la padecía. De esta manera tuvo un gran éxito con este tratamiento, ya que las heridas sanaban rápidamente; es así como finalmente propuso un procedimiento sistemático para el uso del ácido fénico en las operaciones, conocido como el método antiséptico de Lister, muy aplicado en cirugía y obstetricia. Además de ello, su trabajo sirvió de estímulo para el posterior estudio de las enfermedades infecciosas.

Para 1846, William Morton (1819 – 1868) introduce en EEUU la anestesia por éter, haciendo posibles cirugías sorprendentes, de menor trauma en los pacientes.

1.7.7. Robert Koch (1843 – 1910)



Nació en Alemania en 1843, graduándose en medicina en 1866, dedicándose mucho al estudio de los seres microscópicos. Entre sus aportes están:

a. Estudio del bacilo del carbunco: Ya en 1876 le escribió una carta a Ferdinand Cohn (1828 - 1898), profesor de botánica en Breslau (Alemania), donde le informa haber hecho un estudio sobre el bacilo del carbunco, demostrando en esa casa de estudios sus preparaciones y métodos de la investigación al respecto, los cuales eran tan completos y ordenados que se publicó ese mismo año y fue reconocido en el mundo médico como un gran avance de lo iniciado por Pasteur. A ambos se les reconoció ser los responsables de demostrar que los bastones observados por Raver y Devaine en la sangre de animales muertos por carbunco eran bacterias.

Este científico alemán, trabajando de manera independiente, al igual que Pasteur en Francia, logró demostrar que la enfermedad se podía producir en animales de laboratorio, siendo así entonces que este hallazgo, junto a los de Pasteur, completaron la prueba de que este microorganismo (*Bacillus anthracis*) era el causante del carbunco.

b. Incorporación de técnicas microbiológicas novedosas: Koch, además de ser recordado por este trabajo, también lo fue por haber sido el primero en incorporar técnicas novedosas para estudiar bacterias, mediante

la introducción de los frotis de las mismas sobre portaobjetos, tiñiéndolos con anilina para una mejor observación en el microscopio compuesto diseñado por Ernst Abbe (1840 – 1905), en 1877, puesto en práctica por primera vez por este médico.

Para 1881, Koch ideó un método para reproducir bacterias en un medio de cultivo hecho con gelatina, e introdujo el método de la placa para asegurar cultivos puros por su aislamiento. El uso de este medio sólido fue una idea nueva, ya que hasta esa época se habían empleado casi exclusivamente infusiones vegetales y otros líquidos, como caldo de buey y suero de leche. Sembró en gelatina una mezcla de bacterias, después de fundir el medio de calentamiento, y vertió en este medio inoculado en una placa de cristal esterilizada y fría, para endurecerlo, quedando atrapados estos seres vivos y de esta manera ir multiplicándose hasta formar una masa, llamada colonia, visible a simple vista.

Para asegurar que el cultivo obtenido sea puro, fue necesario tomar una muestra de una colonia con un alambre estéril y trasladarlo a un tubo de medio estéril fresco. Posteriormente, en vez de usar gelatina incorporó el uso de agar, que es un polisacárido sin ramificaciones obtenido de la pared celular de varias especies de algas de los géneros *Gelidium*, *Euchema* y *Gracilaria*, empleando una cajita de vidrio llamada cápsula o caja de Petri, introducida por Julius Petri (1865 - 1921), en 1877, quien fue uno de sus ayudantes.

c. Descubrimiento del bacilo tuberculoso y otros microorganismos patógenos: Logró determinar que bacterias se encuentran en las heridas infectadas y el espirilo del cólera, conmoviendo al mundo al anunciar el descubrimiento del germen de la tuberculosis, el bacilo denominado *Mycobacterium tuberculosis* (TBC). Esta conclusión la obtiene al experimentar con animales, a quienes les inoculaba cultivos puros de este microorganismo, logrando luego recoger bacilos idénticos de los tejidos de los enfermos. Con la ayuda de Paul Ehrlich (1854 - 1915), perfeccionó un método especial de tinción (tinción ácidorresistente) para descubrir la presencia del bacilo tuberculoso bajo el microscopio.

Para 1884, expuso los postulados o leyes esenciales, en lo que pudo probar que un organismo es el agente de determinada enfermedad y demostró como había cumplido estos lineamientos en sus estudios sobre la causa de la TBC. Estos postulados manifiestan:

- . Un microorganismo específico puede encontrarse siempre asociado a una enfermedad determinada, por lo que al momento de los síntomas, la flora patógena debe estar presente.
- . El microorganismo patógeno debe ser aislado del huésped enfermo y sembrado en un cultivo puro durante varias generaciones en el laboratorio.
- . El cultivo puro del microorganismo patógeno aislado, al inocularse en animales o plantas susceptibles y sanas, debe producir síntomas similares a los del huésped enfermo.
- . El microorganismo causal debe ser aislado del huésped experimentalmente infectado y éste debe ser idéntico al aislado inicialmente.

1.7.8. Ignaz Semmelweis (1818 – 1865)



Médico nacido en Hungría que estudió las infecciones puerperales durante su actividad en el hospital de Viena, en el que observaba que del 10 al 30% de las personas que fallecían en dicho recinto, eran a causa de esta enfermedad. Es así que en sus estudios logró demostrar que esta fiebre era causada por microorganismos transmitidos por las manos de los médicos y estudiantes de medicina, durante el examen físico de las púerperas. De esta manera propuso el lavado de manos, inicialmente con cloruro de cal, para minimizar esos efectos. Luego, controlando la esterilización logró reducir la mortalidad durante el año 1846 al 1%; es por ello que se le considera el creador del método antiséptico. Estos hechos fueron comprobados posteriormente por el cirujano inglés Joseph Lister.

1.7.9. Martinus Beijerinck (1851 – 1931)



Naturista, botánico y microbiólogo neerlandés, considerado el fundador de la virología por su descubrimiento del virus del tabaco. Para este hallazgo empleó filtros muy delgados, logrando atrapar este agente, el cual es mucho más pequeño que la bacteria.

A pesar de su excéntrica personalidad, logró descubrir la fijación simbiótica del nitrógeno por las leguminosas, al igual que el fenómeno de las bacterias reductoras de sulfato, como forma de respiración anaeróbica, en el que estos microorganismos aceptan electrones en lugar de oxígeno; de esta forma aporta un importante conocimiento en esta ciencia porque ayudó a comprender los ciclos biogeoquímicos de la naturaleza. Igualmente inventó el medio de enriquecimiento, como fundamento esencial para el desarrollo de algunos microorganismos que son menos abundantes en un medio específico y que era necesario hacerlos crecer para estudiarlos adecuadamente. De esta forma aisla y describe la primera bacteria sulfito reductora conocida como *Spirillum desulfuricans*.

1.7.10. Sergei Winogradsky (1856 – 1953)



Destacado microbiólogo, ecólogo y edafólogo nacido en Rusia, conocido por descubrir la quimioautotrofia, en el cual los organismos derivan energía de un número de compuestos diferentes de naturaleza inorgánica, obteniendo carbono en la forma de dióxido de carbono, y no de la luz como se pensaba anteriormente. Para 1885, trabajando en la Universidad de Estrasburgo, con el botánico Anton de Bary, se gana el reconocimiento por su trabajo sobre las bacterias del azufre. Para 1888 identifica en los procesos de nitrificación a las bacterias de los géneros *Nitrosomas* y *Nitrococcus*; ambas oxidan amonio a nitrito, y *Nitrobacter*, que oxida nitrito a nitrato. Ya para el período

1891 – 1905, identifica al *Clostridium pastorianum*, que es una bacteria anaerobia estricta, capaz de fijar nitrógeno atmosférico.

Para 1922, continúa trabajando con bacterias del hierro, nitrificadoras, fijadoras de nitrógeno por *Azotobacter*, bacterias descomponedoras de celulosa y métodos de cultivo para microorganismos del suelo. De esta forma se le reconoce como el primer estudioso de la ecología microbiana y de la microbiología ambiental.

1.7.11. Alexander Fleming (1881 – 1955)



Nació en Escocia en agosto de 1881. Estudió medicina y ejerció como microbiólogo en el Hospital St. Mary de la Universidad de Londres. Fue médico militar durante la primera guerra mundial, en los frentes de Francia, quedando impresionado por la gran mortalidad causada por las heridas de armas de fuego en los soldados; por ello, al final de este combate, regresa al hospital para dedicarse a la búsqueda de un nuevo método antiséptico para evitar la dura agonía provocada por las heridas infectadas.

Es así como en septiembre de 1928, durante sus investigaciones sobre la gripe, y de manera accidental, notó que una colonia de un hongo, que había crecido como contaminante en un cultivo de *Staphylococcus aureus*, afectaba a las colonias de esta bacteria cercanas al mismo. Se da cuenta que hubo un proceso de lisis bacteriana debido a una sustancia producida llamada posteriormente penicilina, dado que el hongo invasor identificado era el *Penicillium notatum*.

En 1929 comunica este descubrimiento en el *British Journal of Experimental Pathology*, y posteriormente, durante la segunda guerra mundial, los químicos británicos Ernst Boris Chain (1906 - 1979) y Walter Florey (1898 - 1968), desarrollaran un método de purificación de esta sustancia que permitió su síntesis y distribución para el resto de la población. Tanto a Fleming como a Chain y Florey, se les entregó el premio Nobel en Fisiología y Medicina, en 1945, por sus contribuciones al desarrollo de la Penicilina.

Para 1922, este científico Escocés descubrió una molécula proteica con actividad antiséptica denominada lisozima, la cual está presente en las lágrimas, saliva y otras secreciones corporales.

1.7.12. Gerhard Domagk (1895 – 1964)



Nació en Brandeburgo, Alemania y estudió medicina en la Universidad de Kiel. Participó como voluntario en la I Guerra Mundial, para una vez culminada, finalizar sus estudios en medicina y así dedicarse a trabajar a estudiar infecciones bacterianas en la Universidad de Greifswald. Basado en los estudios de Ehrlich, encontró que la sustancia conocida como sulfonamida prontosil era efectiva contra las infecciones causadas por estreptococos, al tratar a su propia hija con ella y así evitar la amputación de uno de sus brazos. De esta forma alcanzó el premio Nobel de medicina, y finalizada la II guerra mundial, introdujo el uso de la

tiosemicarbazona en el tratamiento de la tuberculosis. Trabajó también en el campo de la quimioterapia contra el cáncer, hasta 1960, cuando se jubiló.

1.7.13. Hans Christian Gram (1853 – 1938)



Nació en Copenhague, Dinamarca; estudiando botánica y medicina en esa ciudad, quien, en sus inicios, trabajó como asistente del naturalista Steenstrup, introduciéndose así en investigaciones de farmacología y microscopía. Su interés por la bacteriología lo llevó a desarrollar técnicas para diferenciar dos bacterias causantes de la neumonía como *Klebsiella pneumonia* y el *Neumococo*, todo ello motivado a los estudios iniciados por Erlich en 1882, quien publicó un método para colorear el bacilo de la tuberculosis.

De esta forma probó coloreando las bacterias con violeta de genciana, fijándolas con yoduro de potasio y luego lavar con etanol; observando que se teñían de morado, por lo que las llamó Bacterias Gram positivas. Luego el alemán Carl Weigert añadió safranina luego del etanol, y observó que algunas de ellas no se coloreaban, mientras que otras adoptaban el color rojo, llamándolas Gram negativas.

Desde ese descubrimiento el mundo de la bacteriología se divide en dos: Gram positivas (azul o morado) y Gram negativas (rojo o rosado); conocimiento de gran aporte para esta ciencia, dado que las características de ambas clasificaciones pueden permitir mecanismos de inhibición, control y/o destrucción de las especies involucradas, así como de aportar los factores de crecimiento necesarios para su desarrollo; todo ello dependiendo del objetivo que se persigue con estos microorganismos; es decir, si es para algún beneficio, si es para evitar un deterioro, un brote de enfermedad e intoxicación.

Más adelante, en el capítulo II de esta publicación se dará la información respectiva sobre la técnica de coloración de bacterias.

1.7.14. Jacinto Convit (1913 – 2014)



Médico venezolano, nacido en Caracas, quien es muy reconocido por desarrollar la vacuna contra la lepra. Estudió en la Universidad Central de Venezuela, Caracas y luego cursó una especialidad en dermatología en los Estados Unidos; dedicándose permanentemente al tratamiento clínico contra esta enfermedad epitelial; siendo nombrado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1971, como Director Cooperativo para el estudio Histológico y Clasificación de la Lepra.

Ya para 1937, por invitaciones del pionero en los estudios de la lepra, Dr. Martin Vegas, a Cabo Blanco, estado Vargas, Venezuela, el Dr. Convit pudo inocular el bacilo de esta enfermedad en armadillos de la familia Dasypodidae y obtuvo el *Mycobacterium leprae*, que al mezclarlo con la vacuna de la tuberculosis (BCG), produjo la inmunización, descubrimiento que le valió la nominación al Premio Nobel de Medicina

en 1988. Luego de controlar esta enfermedad y otras endémicas, este científico dio base a investigaciones contra la leishmaniasis cutánea y otras enfermedades infecciosas como la Oncocercosis y Mícosis.

1.8. Enzimas microbianas

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica catalogadas como catalizadores biológicos potenciales por ser responsables de una serie de reacciones químicas, bajo condiciones favorables y energéticamente posibles, que actúan sobre moléculas presentes en el sustrato, para transformarlas en productos, dependiendo de la cinética de la velocidad de reacción de la célula, lo cual determina el tipo de metabolismo de la misma (Olsson, Parson y Warshel, 2006).

De acuerdo a estos autores, disminuyen adecuadamente la energía de activación y así aceleran la tasa de reacción, lo que significa que no hay alteración ni modificación alguna del balance energético de dichas reacciones en que intervienen, sólo logran de manera controlada alcanzar ese equilibrio acelerando el proceso en altas escalas. Estas moléculas enzimáticas no son consumidas en las reacciones que aceleran (alrededor de cuatro mil), ni alteran su equilibrio químico.

De acuerdo a Zambrano (s/f), son cada una de las macromoléculas de naturaleza proteica que tienen como función principal catalizar reacciones bioquímicas muy variadas. Todas las enzimas son catalizadores biológicos que están compuestos en su totalidad por proteínas. Una enzima es un catalizador biológico que lleva a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades y con un elevado grado de especificidad. La ciencia que las estudia se llama Enzimología.

Todos los animales y vegetales, al igual que los hongos, levaduras y bacterias sintetizan las enzimas; de hecho, su acción está estrechamente ligada con cualquiera de las etapas biológicas (nacimiento, germinación, desarrollo, crecimiento, reproducción, senectud, muerte, entre otros) de todos los tejidos activos. Debido a esto, los alimentos contienen una gran variedad de enzimas endógenas que les provocan cambios benéficos y dañinos, además de las que provienen de las distintas contaminaciones microbianas.

La función primordial de una enzima es catalizar, es decir, acelerar la velocidad de las reacciones químicas. La velocidad de una reacción con una enzima es de aproximadamente 10^8 a 10^{20} veces más rápida que una reacción no catalizada. Esto lleva a concluir que, en su ausencia, la mayoría de las transformaciones químicas requeridas para mantener activas las células tardarían mucho tiempo en efectuarse o simplemente no procederían. Por ejemplo, la descomposición del peróxido de hidrógeno catalizada por la catalasa tiene lugar 10 millones de veces más rápidamente, a 37°C , que si es catalizada por platino coloidal (un catalizador no enzimático).

La actividad molar de las enzimas es muy alta; una molécula de enzima puede transformar hasta 600.000 moléculas de sustrato por segundo. Actualmente se conocen la existencia de más de 2.000 enzimas, de las

cuales muchas ya han sido aisladas, purificadas y cristalizadas. Su estructura química es de carácter proteínico globular.

Para Feduchi, Blasco, Romero, García y Yáñez (2015), la actividad de las enzimas puede ser afectada por otras moléculas; siendo ellas:

. Moléculas inhibidoras que disminuyen o impiden la actividad de las enzimas, pudiendo eliminar a un agente patógeno, causal de enfermedad o cauterizando un desequilibrio metabólico. La unión de un inhibidor puede impedir la entrada del sustrato al sitio activo de la enzima y obstaculizar que catalice su reacción correspondiente. Este proceso puede ser reversible e irreversible. Ejemplo de inhibidores lo representan los fármacos para antirretrovirales, los herbicidas, entre otros.

. Los activadores; que son moléculas (generalmente inorgánicas) que se unen a las enzimas e incrementan su actividad. No son participantes directos de la reacción y son formulados para que eliminen todo tipo de residuos orgánicos, por intercesión de iones metálicos en su mayoría cationes como el Ca^{2+} y Mg^{2+} , por moléculas orgánicas y por el propio sustrato.

Según Feduchi y otros (ob. cit), existen seis clases de enzimas que son las que regularizan las acciones en la naturaleza; entre ellas se tienen:

a. Oxirreductasa: EC1

Catalizan reacciones de oxidación y reducción en los sustratos (potencial redox), con el acompañamiento de coenzimas como NAD^+ , NADP^+ , FAD , las cuales se encargan de aceptar o ceder electrones en el medio. Estas coenzimas quedan modificadas en su grado de oxidación, por lo que deben ser recicladas antes de volver a efectuar una nueva reacción catalítica. De ellas se tienen dos muy importantes: deshidrogenasa, peroxidasa. Las deshidrogenasas catalizan la oxidación o reducción de un sustrato por sustracción o adición de dos átomos de hidrógeno (deshidrogenación), empleando dos coenzimas que actúan como aceptores o como donadores de electrones y protones.

Entre ellas están: NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, FAD/FADH_2 y FMN/FMNH_2 ; en cada par, la primera es la forma oxidada y la segunda la forma reducida de la coenzima. Por otra parte, las peroxidasas catalizan reacciones bisustrato de carácter redox, utilizando un peróxido como oxidante (a lo que deben su nombre) y un segundo sustrato de características reductoras que es oxidado por el peróxido.

b. Transferasas: EC2

Son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo funcional, de una molécula donadora a otra aceptora, en la cual la donadora es generalmente una coenzima. Transfieren un grupo (G) diferente del hidrógeno diferente del hidrógeno de un sustrato a otro. Este grupo (G) varía mucho y en función del mismo se han establecido las diferentes clases:

b.1. Las que transfieren grupos de un carbono.

- b.2. Las que transfieren residuos de aldehídos o cetonas.
- b.3. Aciltransferasas.
- b.4. Glicosiltransferasas.
- b.5. Las que transfieren grupos alquilos o arilos.
- b.6. Las que transfieren grupos nitrogenados.
- b.7. Las que transfieren grupos que contienen fósforo.
- b.8. Las que transfieren grupos que contienen azufre.
- b.9. Las que transfieren grupos que contienen selenio.

Suelen actuar en procesos de interconversión de monosacáridos, aminoácidos, entre otros.

c. Hidrolasas: EC3

Es una enzima que descompone hidrolíticamente el sustrato sobre el que se encuentra, ya sea éste proteínas, ácidos nucleicos, almidones, grasas, ésteres fosfóricos u otras sustancias macromoleculares. La hidrólisis consiste en la escisión de una molécula de agua en dos, mediante la adición de los iones H^+ y OH^- del agua. En función del tipo de enlace sobre el que actúan reciben diferentes nombres, así por ejemplo, lipasas y fosfatasas hidrolizan enlaces éster y se llaman genéricamente esterasas, sacarasa y amilasa, enlaces glucosídicos, tripsina y peptina, enlaces peptídicos, entre otros.

Estas enzimas pueden intervenir en reacciones de hidrólisis con la obtención de monómeros a partir de polímeros, actuando en la digestión de alimentos; es por ello que todos los procesos químicos de digestión implican hidrólisis, utilizando el agua para romper enlaces, de forma que el hidrógeno se une a un residuo y el $-OH$ a otro. Ante esta perspectiva, la hidrólisis de los enlaces anhidros libera los residuos constituyentes, ya sean monosacáridos, aminoácidos, entre otros, que formaban el polímero, dejándolos suficientemente pequeños para ser absorbidos desde el tubo digestivo, por lo que pasan a la circulación y entran después en las células para ser metabolizados.

La hidrólisis digestiva libera sólo una pequeña parte de la energía almacenada en una molécula, igualmente las nucleasas, nucleotidasas y nucleosidasas son enzimas digestivos que hidrolizan los ácidos nucleicos y a sus residuos, mientras que las esterasas hidrolizan ésteres y son las responsables del aroma afrutado de los frutos maduros. Estas enzimas permiten una utilización más eficiente del alimento ingerido.

d. Liasas: EC4

Son enzimas que catalizan la ruptura de enlaces C-C, C-S, C-N y otros enlaces no peptídicos por otros medios distintos a la hidrólisis o la oxidación. Son reacciones realizadas por enzimas específicas llamadas hidrolasas y deshidrogenasas respectivamente, que se diferencian de otras debido a que los dos sustratos están involucrados en una dirección de reacción, pero solo una en la dirección contraria. Son responsables

de catalizar reacciones en las que se eliminan grupos H₂O, CO₂ y NH₃ para de esta manera formar o añadirse a un doble enlace.

Entre ellas se tienen las descarboxilasas, que son enzimas que añaden o eliminan un grupo carboxilo de los compuestos orgánicos, por lo que hay una descarboxilación de los aminoácidos. Ejemplo: piruvato descarboxilasa. Al actuar sobre el sustrato, una molécula es eliminada y esto genera, ya sea un nuevo doble enlace o un anillo nuevo.

e. Isomerasas: EC5

Este grupo de enzimas catalizan las reacciones de reorganización intramolecular, con la producción de derivados que poseen la misma composición elemental, pero con estructura y propiedades distintas a las del compuesto original. Son isómeros dos cuerpos químicos que tienen la misma fórmula molecular pero unas características distintas debido a la organización diferente de los átomos en la molécula. Ejemplo: Transformar una molécula de glucosa en galactosa.

En este grupo se tienen seis categorías: racemasas y epimerasas, cis-trans-isomerasas, oxidoreductasas intramoleculares, transferasas intramoleculares, liasas intramoleculares y otras isomerasas.

f. Ligasas: EC6

Son enzimas que catalizan procesos de unión entre dos moléculas facilitando la formación de diferentes tipos de enlaces químicos. Catalizan la degradación o síntesis de los enlaces fuertes, mediante el acoplamiento a moléculas de alto valor energético como el ATP. Ejemplo: carboxilasa, que es una enzima que interviene en el catabolismo de los glúcidos; participa además en la descarboxilación del ácido pirúvico.

REFERENCIAS CONSULTADAS

Breed, R; Murray, E y Smith, N. 2008. *Manual de Bergey de Determinación Bacteriológica*. En: *Clasificación de las bacterias*. (7ma. Ed.). Sociedad Americana de Microbiología. EEUU: Baltimore. 1033p.

Burkovski, A. 2013. *Envoltura celular de las corinebacterias: estructura e influencia en la patogenicidad*. [documento en línea]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3658426/>. [Consulta: Marzo 4, 2019].

Collard, P. 1985. *El desarrollo de la microbiología*. España: Ed. Reverté, S.A. 175p.

Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de Biotecnología (ArgenBio). 2010. *Avances en biotecnología en Argentina*. [documento en línea]. En: <https://www.agrositio.com.ar/noticia/114166-los-avances-en-biotecnologia-posicionaran-a-argentina-como-un-gran-proveedor-de-alimentos-clive-james>. [Consulta: Marzo 2, 2019].

- DasSarma, P; Coker, J; Huse, V y DasSarma, S. 2010. *Halophiles, Biotechnology*. In: Flickinger MC (ed). Encyclopedia of Industrial Biotechnology, Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology. John Wiley & Sons Ltd: 2769 – 2777.
- Feduchi, E; Blasco, I; Romero, C; García, C y Yáñez, E. 2015. *Bioquímica: conceptos esenciales*. (2ª Ed). Argentina: Editorial MédicaPanamericana. 480p.
- Fetsch, A. 2017. *Staphylococcus aureus*. (1a. Ed). England: Academy Press. 245p.
- Forsythe, S.J. 2003. *Alimentos seguros: microbiología*. España: Acribia. 400p.
- Jung, Y; Yong, N y Jae, H. 2014. *Identificación errónea de Brevibacterium casei como Propionibacterium acnés aislada de la sangre de un paciente con linfoma maligno*. Ann CinMicrobiol 17(3): 95 – 98.
- León, J; Ávalos, R y Ponce, M. 2008. *Flavobacterium psychrophilum y su patología en alevines de Onchorhynchus mykiss del centro piscícola El Ingenio, Huancayo*. Revista Peruana de Biología 15(2): 117 – 124.
- Loretto, S. 2005. *Degradación de petróleo por hongos aislados desde suelos de la XII región de Chile, contaminados con hidrocarburos*. Trabajo de investigación. Universidad Austral de Chile. Chile: Valdivia. 55p.
- Losada, S. 2001. *La gestión de la seguridad alimentaria*. España: Ariel. 256p.
- Madigan, M; Bender, K; Buckley, D; Matthew, W; Stahl, D; Dale, T y Martinko, J. 2015. *Biología de los microorganismos*. (14ª. Ed). EEUU: Pearson. 2830p.
- Meng, YC; Liu, HC; Yang, LL; Kang, YQ; Zhou, YG; Cai, M. 2016. *Microbacterium sorbitolivorans* spp. *Un nuevo miembro de Microbacteriaceae aislado de lecho de fermentación en cerdos*. Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva. 66 (12): 5556–5561.
- Montaño, N; Sandoval, A; Camargo, S y Sánchez, J. 2010. *Los microorganismos: pequeños gigantes*. Elementos 77(2010): 15-23.
- Moreno, E. 1988. *Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados*. (1ra. Ed.). México: Universidad Autónoma de México. 109p.
- Olsson, MH; Parson, WW; Warshel, A. 2006. *Dynamical Contributions to Enzyme Catalysis: Critical Tests of a Popular Hypothesis*. Chem. Rev. 106 (5): 1737-1756.
- Organización de las Naciones Unidas (ONU). 1948). *La Declaración Universal de los Derechos Humanos*. Asamblea General de las Naciones Unidas. Resolución 217 A (III). Francia: París.
- Palacios, M; Martín, A y García, S. 2014. *Achromobacter xylosoxidans en dos pacientes en hemodiálisis*. Rev. Nefrología 34(4): 425 – 544.
- Ray, B y Bhunia, A. 2010. *Fundamentos de Microbiología de los alimentos*. (4ta. Ed.). México: Mc Graw Hill Interamericana Editores, S.A. 352p.

- Renneberg R. 2008. *Biotechnología para principiantes*. España: Ed. Reverte. 300p.
- Romero, R. 2007. *Microbiología y parasitología humana*. (3ª. Ed.). Argentina: Ed. Médica Panamericana. 1725p.
- Ryan, K y Ray, C. 2014. *Microbiología médica*. (6ª. Ed.). México: McGraw Hill, S.A. 832p.
- Silva, F. 2014. *Aislamiento y caracterización de Lactobacillus spp desde heces de cerdos clínicamente sanos para su potencial utilización como probiótico y antioxidante en cerdos*. Trabajo de investigación. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Veterinarias. 183p.
- Thieman, W y Palladino, M. 2010. *Introducción a la biotecnología*. (2ª. Ed.). España: Pearson Educación, S.A. 410p.
- Toalombo, L. 2012. *Evaluación de microorganismos eficientes autóctonos aplicados en el cultivo de cebolla blanca (Allium fistulosum)*. Trabajo de grado. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador: Ceballos. 95p.
- Tortora, G; Funke, B y Case, C. 2007. *Introducción a la microbiología*. Argentina: Ed. Médica Panamericana. 959p.
- Vargas, M. 2016. *Virología médica*. (2da. Ed). Universidad Nacional de Colombia. Colombia: Editorial El Manual Moderno. 766p.
- Vargas, T y Villazante, L. 2014. *Clasificación de los microorganismos*. Rev. De Act. Clín (44): 1-5.
- Yabar, E. 2005. *Microbiología de alimentos. Criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano*. Lima: Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional del Centro del Perú. 21p.
- Zambrano, W. s/f. *Enzimas*. En Zambrano, W. s/f. *Principios de bioquímica I: Morfofisiología I*. Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora. Venezuela: San Carlos. Pp. 1 – 18.

CAPÍTULO II

MICROSCOPIA

INTRODUCCIÓN

En este espacio se presentan diversos aspectos relacionados con la microscopía y la manera de manejar este instrumento. Presenta además conocimientos relativos a las técnicas más relevantes para la microbiología de alimentos, de cómo preparar el material biológico para su observación. Para un estudiante de cualquier carrera relacionada con la ingeniería y tecnología de alimentos, dominar las diferentes técnicas de observación de células es fundamental en su desempeño como profesional responsable en la vigilancia del proceso de producción, cuya intención es proporcionar inocuidad de los mismos para la seguridad del consumidor y/o usuario.

Es así como en este capítulo se trata de manera básica sobre el microscopio, su historia, sus componentes, tipos, los métodos de observación de los microorganismos, las distintas tinciones celulares, los colorantes, la morfología y agrupación de estos sistemas biológicos, como sistemas de caracterización e identificación de los mismos.

2.1. El microscopio

Es un instrumento que admite observar objetos diminutos que no pueden ser vistos a simple vista. Permite observar y estudiar estructuras cuyo tamaño está por debajo del nivel de resolución del ojo humano; es decir, por debajo de los 250 micrómetros (μm). Igualmente, la ciencia que se encarga de estudiar los objetos pequeños utilizando este instrumento, se llama microscopía. Es un instrumento óptico que combina lentes (en el caso del compuesto), para conseguir una amplificación focal (x) de objetos diminutos, permitiendo conocer y estudiar la forma, estructura, tamaño y agrupación de los microorganismos, cuyas dimensiones vienen expresadas en: Angstrom ($1 \text{ \AA} = 10^{-10}\text{m}$), Nanómetros ($1 \text{ nm} = 10^{-9}\text{m}$), Micrómetros ($1 \mu\text{m} = 10^{-6}\text{m}$) y Milímetros ($1 \text{ mm} = 10^{-3}\text{m}$).

En la siguiente tabla se presentan los tamaños de algunos elementos y microorganismos:

Tabla 3. Tamaños de partículas y algunas células

Tamaños	Objetos	Microscopios
10 - 100 μm	Protozoos	Óptico, electrónico
1 - 10 μm	Células sanguíneas, Bacterias	Óptico, electrónico
0,001 - 0,1 μm	Virus	Electrónico
1nm - 0,001 μm	Macromoléculas	Electrónico
1 - 10 A°	Moléculas	Electrónico
< 1 A°	Átomos	

Fuente: Adaptado de Madigan y otros (2015)

2.1.1. Historia del microscopio

Para este espacio se toma como referencia al artículo publicado por Lafranconi (s/f), quien presenta una aproximación muy acertada de la realidad de esta ciencia, recogiendo información de la evolución de este instrumento, y luego incorporando otras fuentes se complementa esta reseña, con la intención de establecer un acercamiento orientado a la lógica de su progreso, dado que es muy dispersa, por presentarse opiniones distintas por muchos autores.

Desde que Aristóteles proclamara que en el ambiente había animáculos -por darle un nombre a los seres diminutos- muchas personas del ámbito científico o no, se interesaron por saber a qué hacía referencia este filósofo nacido en Macedonia. Por ello comenzaron a utilizar lentes sencillas para intentar incrementar los tamaños de las imágenes y así visualizar lo que eran realmente.

Es así como Zacharias Jansen (1585 - 1632), fabricante de lentes de origen holandés, se le asocia con la invención del microscopio simple (un lente) y del compuesto (dos o más lentes). Se dice que construyó un instrumento de 9 aumentos, del que se cree que fue elaborado con la ayuda de su padre (o incluso que fue construido enteramente por este último), con una fecha de invención que comúnmente se da como 1595, mientras intentaba encontrar una manera de conseguir lentes de aumentos aún mayores para ayudar a personas con la vista seriamente defectuosa.

También se le asocia como uno de los inventores del telescopio en 1608, aunque hay divergencias por los trabajos de Hans Lippershey (1570 - 1619) para esa misma fecha. Posteriormente Galileo Galilei (1564 - 1642), astrónomo, filósofo, matemático, ingeniero y físico italiano, construye su primer microscopio en 1609, mejorando la versión de Lippershey, aumentando seis veces más la imagen sin deformar los objetos, para luego en ese mismo año diseñar un segundo instrumento de este tipo que permitía aumentar nueve veces la imagen.



Figura 30. Microscopio simples de: Jansen hacia 1595 y Galilei (1609)

Fuente: King (2005)

Luego de la invención de Jansen, en pocos años hubo un gran número de diseñadores de microscopios en Europa. El primer avance técnico fue el paso de un sistema de 2 lentes a uno de 3, este sistema es la configuración estándar que se mantiene en los microscopios de hoy. Ese avance se resume en estos acontecimientos:

. El naturalista holandés Jan Swammerdam (1637 – 1680), anatomista y zoólogo holandés, observó insectos con microscopios elaborados por él mismo, haciendo hincapié en su conformación, descubrió también que la sangre no es un líquido uniforme rojo, sino que existen corpúsculos que le dan ese color.

. El botánico inglés Nehemiah Grew (1641 – 1712), médico y botánico británico, estudió los órganos de reproducción de las plantas y descubrió los granos de polen.

. El anatomista holandés Reigner de Graaf (1641 – 1673), médico y anatomista neerlandés, realizó estudios similares en animales describiendo ciertos elementos del ovario que desde entonces se conocen con el nombre de folículos de Graaf. Antes de morir, a la edad de 32 años, recomendó a la Royal Society de Londres, que a los trabajos de mejora del microscopio presentados por Anton Van Leeuwenhoek.

. Marcello Malpighi (1628 – 1694), anatomista y biólogo italiano, fue uno de los microscopistas más grandes de la historia de acuerdo a su espectacular descubrimiento. Sus primeros estudios los realizó con pulmones de rana, pudiendo observar en ellos una compleja red de vasos sanguíneos, demasiado pequeños para ser vistos por separado y muy anastomosados. Cuando siguió el recorrido de los vasos hasta que se unían con otros mayores, comprobó que estos últimos eran venas en una dirección y arterias en dirección opuesta. Por consiguiente, las arterias y las venas se hallaban unidas mediante una red de vasos llamados capilares.

. Otro descubrimiento importante en la época fue el del científico inglés Robert Hooke (1635 – 1703), quien con el microscopio reveló que la lámina de corcho tenía pequeñas cavidades poliédricas como si fuera un panal de abeja. Cada cavidad la llamó célula. Lo que no sabía era la importancia que tendrían esas celdillas en la constitución de los seres vivos. Años más tarde se descubriría el tejido de los seres vivos gracias a su

observación en el microscopio. En el siglo XIX, con los conocimientos aportados por Hooke se pudieron realizar los postulados de la teoría celular:

- . Todos los seres vivos están integrados por células y los productos de éstas.
- . Las células son las unidades de estructura y función.
- . Todas las células provienen de células preexistentes. Este fue agregado en 1858 por Virchow.

A finales de este siglo, los siguientes estudios han demostrado que las células nos pueden dar tanto la causa como le origen de numerosas enfermedades. Esto quiere decir que si una persona está enferma es porque tiene células en su interior que están enfermas.

. Un comerciante holandés, Anton Van Leeuwenhoek (1632 – 1723), usaba lentes simples, que por su reducido tamaño podían obtenerse de pequeños trozos de cristal perfecto. Puliendo cuidadosamente dichos fragmentos, logró aumentar un objeto hasta 270 veces sin perjuicio de la nitidez. Tenía 419 lentes alguna de las cuales eran de cristal de roca y hasta de diamante, en algunos casos no eran mayores que el tamaño de un alfiler, por lo que sus microscopios tenían un tamaño diminuto comparados con otros de la misma época.



Figura 31. Microscopios simples de Robert Hooke y Antonie Van Leeuwenhoek
Fuente: King (ob. cit)

Con esos lentes observaba todo lo que podía y logró describir los glóbulos rojos de la sangre y los capilares con mayor detalle que los verdaderos descubridores: Swammerdam y Malpighi. Pero lo más sensacional de todo ello fue su descubrimiento de pequeños organismos invisibles a simple vista, al estudiar aguas estancadas con su microscopio, con todos los atributos de la vida. Las descripciones de Van Leeuwenhoek eran, desde luego, imprecisas, pero no cabe duda que fue el primero en ver lo que más tarde se llamarían bacterias y “animalículos”, como los denominó entonces, conocidos hoy como protozoarios que en griego significa pequeños animales.

. El microscopista y naturalista danés Otto Muller (1730 – 1784), consiguió en 1773 distinguir lo suficientemente bien a aquellos pequeños seres para clasificarlos en dos tipos: bacilos (que significa “pequeños vástagos”) y espirilos (por su forma espiral).

. Joseph Lister (1786 – 1869), un óptico inglés, diseñó un microscopio acromático capaz de eliminar los anillos de color que limitaban la claridad de la imagen. Descubrió que los glóbulos rojos eran en realidad, discos bicóncavos. Esta invención constituyó un gran avance, iniciando una serie de perfeccionamientos que dieron como resultado el moderno microscopio óptico.

. El microscopio fue perfeccionándose con gran lentitud, uno de los defectos de los microscopios primitivos era que sus lentes descomponían la luz blanca en los colores que la constituyen. Los objetos pequeños se veían rodeados de anillos de color (aberración cromática) que impedían observar con claridad los detalles. Desde 1660 hasta la actualidad el microscopio óptico ha sido el pilar fundamental en el conocimiento de lo invisible. Aunque su poder de resolución aumentó a través del tiempo (con la mejora en la calidad de las lentes) al igual que el poder de magnificación, su factor limitante fue la longitud de onda de la luz.

. En 1930 el mundo submicroscópico se amplió con la aparición del microscopio electrónico cuya ventaja principal con respecto al microscopio óptico es un aumento de 1000 veces en la magnificación del material observado acompañado de una mayor capacidad de resolución generando una mejor definición y una ampliación del orbe microscópico, pudiendo así ser observados por vez primera: ADN, virus y pequeñas organelas.

2.1.2. Tipos de microscopios

Al revisar la información sobre estos instrumentos y su evolución histórica, se presenta que entre ellos están: el microscopio simple (un lente), los microscopios ópticos compuestos (más de un lente) y el electrónico (por haz de electrones). De todos ellos, el microscopio compuesto es el más utilizado, tanto para determinaciones en diversas áreas como observaciones histológicas y de alimentos. En este particular, su uso está por encima del simple y el electrónico, porque el primero no es más que una lupa, formada por un soporte y una lente biconvexa, que produce pocos aumentos y escaso poder de resolución. Frente a ella, el microscopio compuesto permite aumentos del orden de 1.500 a 2.000 aumentos y tiene un buen poder de resolución.

En la industria de alimentos se usa poco el equipo electrónico porque se buscan determinaciones de especies microbianas, que bajo técnicas cualitativas y cuantitativas se puedan obtener y así definir la incidencia de estos seres vivos diminutos en ese ambiente. El microscopio electrónico es muy empleado para investigaciones detalladas de estructuras celulares, tejidos vegetales y animales, y para el estudio de virus, entre otras cosas; por lo que dirige su utilización en actividades de índole científico fundamentalmente.

De los tipos de microscopio se tienen:

a. Según el tipo de iluminación:

a.1. Microscopio óptico

- a.2. Microscopio electrónico
- a.3. Microscopio de luz ultravioleta
- a.4. Microscopio de luz polarizada
- a.5. Microscopio de fluorescencia

b. Según el número de lentes:

- b.1. Microscopio simple
- b.2. Microscopio compuesto

c. Según la transmisión de luz:

- c.1. Microscopio de luz transmitida
- c.2. Microscopio de luz reflejada

d. Según el número de oculares:

- d.1. Microscopio monocular
- d.2. Microscopio binocular
- d.3. Microscopio trinocular

e. Microscopios según la configuración de los elementos

f. Microscopios digitales

g. Microscopio estereoscópico

h. Otros tipos:

- h.1. Microscopio campo claro
- h.2. Microscopio campo oscuro
- h.3. Microscopio confocal
- h.4. Microscopio de contraste de fases

a. Según el sistema de iluminación:

El sistema más habitual es iluminar la muestra con luz artificial y no solar como en siglos anteriores. Surge también el uso de electrones para la visualización.

a.1. Microscopio óptico: Hay un foco de luz visible apuntando hacia la muestra, la cual es conducida a través del objetivo y del ocular hasta llegar a formar la imagen en el ojo del observador. Su resolución está limitada por la difracción de la luz, aportando un aumento de 1000 a 2000 veces la imagen.

a.2. Microscopio electrónico: La muestra no es iluminada con luz artificial, sino que se utilizan electrones que impactan contra la muestra dentro de la cámara de vacío. La ventaja principal de este equipo es que puede obtenerse un nivel de aumento muy superior al del resto de los microscopios de hasta 200.000x inclusive. Poseen un poder de resolución muy superior al de los microscopios ópticos y en consecuencia, producen un mayor aumento de las imágenes.



Figura 32. Microscopio óptico compuesto y microscopio electrónico

Fuente: Tortora y otros (2007)

Existen dos tipos de microscopios electrónicos de uso común, el microscopio electrónico de transmisión (MET) y el microscopio electrónico de barrido (MEB).

a.2.1. Microscopia electrónica de transmisión (MET): Tiene mayor poder de resolución que el microscopio óptico, porque utiliza un chorro de electrones para definir el objeto, en lugar de luz visible. Aprovecha el hecho de que el haz de electrones se comporta como una radiación electromagnética con una longitud de onda extraordinariamente corta. Este equipo puede distinguir dos puntos separados por una distancia de 1 a 200 nm, que sería la distancia mínima para un microscopio óptico. Este tipo de microscopia produce una imagen detallada y nítida a aumentos de hasta 200.000x, en comparación con los 1.000x del microscopio óptico.

Funciona como un microscopio óptico, en el que en lugar de un haz de luz, se transmite un haz de electrones a través del espécimen. En vez de lentes de cristal, se utilizan lentes electromagnéticos para enfocar la imagen. En lugar de producir la imagen directamente, ésta se registra en una pantalla fluorescente o en una placa fotográfica (a la imagen se le denomina microfotografía electrónica de transmisión). En vez de montar el espécimen en un portaobjetos, se prepara en una rejilla de cobre que permite el paso de los electrones. En lugar de usar colorantes para aumentar el contraste, se utilizan metales pesados, como el plomo, tungsteno y uranio, que hacen que el espécimen absorba diferentes cantidades de electrones.

a.2.2. Microscopia electrónica de barrido (MEB): Se parece al de transmisión en que utiliza electrones, pero en la mayor parte de sus otros aspectos es diferente. Este bombardea la superficie de la preparación con un chorro de electrones. Estos electrones "primarios" expulsan electrones "secundarios" del espécimen. El número de electrones expulsados varía con la composición y conformación de las diferentes partes de la superficie. Los electrones secundarios se recogen para generar una señal que es procesada electrónicamente. La señal procesada produce una imagen de la superficie en un tubo de rayos catódicos (como el tubo de un televisor). Debido a que solamente denota la superficie del objeto. Tiene una gran profundidad de foco y

produce imágenes tridimensionales sorprendentes; por otro lado, puede distinguir objetos situados a menos de 20 nm uno del otro, y por tanto proporciona detalles claramente definidos con aumentos de hasta 10.000x. Este tipo de microscopia se utiliza, normalmente con células intactas. Los especímenes son liofilizados (congelados y desecados al vacío) y se cubren con una capa fina de un metal pesado, como el oro o el platino. Esto último evita que los electrones penetren dentro del espécimen, lo que permite obtener una imagen (llamada microfotografía electrónica de barrido) más nítida. El MEB también opera al vacío; aunque se emplea normalmente para describir la superficie de un objeto y en ella la técnica de criofractura permite su uso para visualizar estructuras del interior de las células.

a.3. Microscopio de luz ultravioleta: Ilumina la muestra con este tipo de luz, la cual tiene una longitud de onda mucho más corta (180 a 400 nm), frente a los 400 a 700 nm, que la luz visible en los microscopios ópticos. Su poder de resolución es mucho mayor, proporcionando la ventaja de que se pueden observar muestras que aparecen transparentes con luz visible, empleándose lentes de cuarzo, y así diferenciar objetos separados a 0,01 μm .

a.4. Microscopio de luz polarizada: También conocido como microscopio petrográfico. Es un instrumento óptico al que se le han añadido dos polarizadores, por lo que la onda de luz utilizada para observar la muestra tiene una dirección de oscilación concreta. Se usa mucho para mirar estructuras cristalinas de rocas y minerales.

a.5. Microscopio de fluorescencia: Permite observar sustancias que emiten luz propia cuando son iluminadas con una longitud de onda determinada. Se emplea una lámpara de xenón o de vapor de mercurio para ello, incorporando además filtros de luz para aislar la luz correspondiente a la muestra. Se emplea mucho para observar *Mycobacterium tuberculosis* en el esputo.

b. Según el número de lentes:

Caso concreto de los microscopios compuestos. Entre ellos se tienen:

b.1. Microscopio simple: Habitualmente conocido como lupa, en el cual se utiliza un solo lente. Fue perfeccionado por Anton van Leeuwenhoek, alcanzando aumentos de hasta 50 veces el objeto.

b.2. Microscopio compuesto: Apareció en los países bajos a finales del siglo XVI, en el que en su diseño se disponen de por lo menos dos lentes, tanto en los objetivos como en los oculares, para de esta forma corregir los defectos ópticos y mejorar la imagen.

c. Según la transmisión de luz:

Existen dos tipos básicos de microscopio óptico según el camino seguido por la luz hasta llegar al objetivo. Estos son:

c.1. Microscopio de luz transmitida: Es el sistema de iluminación más utilizado entre los microscopios ópticos. En este tipo de microscopio la luz atraviesa la muestra, siendo para ello necesario prepararla,

cortándola en láminas muy finas. Luego se ilumina la misma desde debajo la platina para que se haga semitransparente y pueda ser atravesada por parte de la luz y así llegar al objetivo y a los oculares.

c.2. Microscopio de luz reflejada: La luz ilumina la muestra desde la parte superior de la platina y parte de esta es reflejada y dirigida al objetivo. De esta forma se pueden observar materiales semitransparentes u opacos, como estructuras metálicas, cerámicas, seres como insectos, entre otros. Un estereoscopio es un ejemplo típico de este instrumento, el cual permite visualizar la muestra en tres dimensiones.

d. Según el número de oculares:

d.1. Microscopio monocular: Es el tipo más sencillo de ellos por disponer de un solo ocular para observar la muestra, pudiendo aumentarla hasta más de cien veces. Muy usado por aficionados que se inician en este campo, y por personas que ejecutan tareas de reparación y mantenimiento de equipos, como relojes, celulares, entre otros. El principal inconveniente es la incomodidad para su manejo. No son generalmente utilizados en ámbitos profesionales.

d.2. Microscopio binocular: Disponen de dos oculares que permiten observar la muestra simultáneamente con los dos ojos, resultando de mayor comodidad para el usuario. Importante entender que el estereoscopio siempre es binocular, pero no todo microscopio binocular es estereoscopio.

d.3. Microscopio trinocular: Es un instrumento equipado con dos oculares para observar la muestra además de un tercero para conectar la cámara y así poder tomar fotografías o videos de la muestra.

e. Microscopios según la configuración de los elementos:

Es un microscopio invertido, es decir, de configuración totalmente opuesta a la del microscopio vertical; en el que se pueden ver muestras vivas y procesos biológicos, colocados en el fondo de un recipiente, donde es necesario mantenerse hidratados.

f. Microscopios digitales:

Capturan una imagen de la muestra conectando una cámara digital en lugar del ocular. Habitualmente deben conectarse al ordenador para poder transmitir las imágenes y luego visualizarlas. También existen otros de pantalla incorporada, que permiten ver y almacenar imágenes que pueden transmitirse al ordenador por conexión USB o tarjeta SD. El aumento que se alcanza es limitado en comparación con un microscopio óptico convencional; aún así son instrumentos muy versátiles para observar objetos cotidianos.

g. Microscopio estereoscópico:

Están equipados siempre con dos oculares, de forma que cuando se combina la imagen se consigue el efecto 3D, por lo que permite observar la muestra de forma tridimensional. El aumento obtenido es inferior al óptico convencional, aún así facilita la visualización de muestras en la que debe manipularse la imagen, como por ejemplo para el montaje de circuitos y relojes.

h. Otros tipos:

Existen otros tipos de estos instrumentos, cuya técnica de microscopía ha sido optimizada para tipos de muestras específicas. Entre ellos están:

h.1. Microscopio campo claro: Es uno de los microscopios más empleados en la industria de alimentos para observar predominantemente bacterias, mohos y levaduras, por ser estas las más incidentes en estas organizaciones. El campo microscópico o área observada está brillantemente iluminada y los objetos en estudio aparecen más oscuros que el fondo.

h.2. Microscopio campo oscuro: Consiste en iluminar la muestra oblicuamente para que los rayos de luz que lleguen al objetivo se dispersen primero por la muestra y así favorecer la observación de las mismas en alta transparencia. Tiene la ventaja de no requerir teñir la muestra para aumentar su contraste y poder observarla. Se utiliza mucho para identificar espiroquetas.

h.3. Microscopio confocal: Es un tipo de microscopio de fluorescencia, en el que se ilumina la muestra de forma sucesiva y se reconstruye la imagen al final del proceso. Es un proceso de escaneado desarrollado por Marvin Minsky (1927 - 2016) en 1957.

h.4. Microscopio de contraste de fases: Fue ideado por Frits Zernike (1888 - 1966) en 1932. El proceso consiste en que la luz viaja a distintas velocidades dependiendo del medio de propagación, por lo que atraviesa la muestra en distintas secciones, generando un efecto de amplificación, pudiendo verse sin necesidad de utilizar técnicas de tinción y por lo tanto observarse células vivas.

2.1.3. Componentes básicos del microscopio óptico compuesto

Por ser este instrumento un sistema de lentes ópticos u objetivos, combinados con uno de iluminación, tiene tres componentes básicos: (1) Sistema mecánico, (2) Sistema de iluminación, y (3) Sistema óptico.

a.1. Sistema mecánico: Está constituido por el conjunto de piezas del microscopio encargadas de soportar y desplazar a los restantes componentes. Básicamente está formado por los siguientes elementos:

a.1.1. El estativo: Es la pieza que da soporte a todos los elementos del microscopio. Básicamente consta de una base o pie, sobre la que descansa todo el aparato. En algunos microscopios tiene forma de herradura, aunque en los actuales se presenta como una placa compacta en cuyo interior se encuentra el sistema de iluminación. El resto del estativo está formado por el brazo o columna, que es el soporte vertical y sitio de agarre manual.

a.1.2. La platina: Es la base de colocación del portaobjeto, estando en ella los mandos de desplazamiento. Se trata de una placa metálica cuadrada o redonda, en la que se coloca y sujeta, mediante una pinza, la preparación del objeto a observar.

Tabla 4. Tipos de microscopios

Tipos de microscopía	Característica clave	Aspectos de la imagen	Principales aplicaciones
Microscopía óptica			
Campo claro	El contraste se logra por absorción.	Imagen clara.	Las muestras requieren tinción para observar organismos completos.
Campo Oscuro	Solamente la luz dispersada por la muestra entra en el objetivo, produciéndose un contraste elevado	Imagen brillante contra un fondo oscuro	Para observar células vivas o flagelos demasiado finos para la microscopía de contraste de fases; pocos detalles internos.
Fluorescencia	Se basa en la capacidad de emitir luz visible que tienen los especímenes fluorescentes cuando se les ilumina con luz ultravioleta	Especímenes muy coloreados (luminosos) contra un fondo oscuro	Utilizando anticuerpos fluorescentes se pueden identificar tipos específicos de microorganismos presentes en una mezcla compleja.
Contraste de fases	El contraste se consigue por interferencia; las diferencias en el índice de refracción cambian la fase de la luz	Imágenes claras y detalladas rodeadas de un halo.	No requiere tinción; se pueden observar preparaciones en fresco de células vivas.
Nomarsky	Tiene el mismo fundamento que la microscopía de contraste de fases, pero utiliza un prisma (en vez de un anillo) para separar el rayo interferente.	Produce una imagen casi tridimensional.	Útil para observar organismos vivos en el interior de tejidos animales.
Microscopía electrónica			
Transmisión (MET)	Hace pasar un haz de electrones a través de la preparación, produciendo un gran aumento útil	Imágenes muy ampliadas con gran detalle.	Para observar virus y la ultraestructura celular. No se pueden observar organismos vivos porque las preparaciones han de ser totalmente desecadas.
Barrido (MEB)	Barre los especímenes con un chorro de electrones, produciendo la salida de electrones secundarios que crean una señal, que, a su vez, genera una imagen por ordenador.	Imagen tridimensional	Para ver estructuras de organismos intactos, e incluso estructuras internas con detalles reales. Las muestras han de ser desecadas, por tanto, no se puede aplicar a organismos vivos

Fuente: Adaptado de Reynoso, Magnoli, Barros y Demo (2015)

a.1.2. La platina: Es la base de colocación del portaobjeto, estando en ella los mandos de desplazamiento. Se trata de una placa metálica cuadrada o redonda, en la que se coloca y sujeta, mediante una pinza, la preparación del objeto a observar.

a.1.3. Carro: Son los dispositivos que permiten el desplazamiento de la preparación a voluntad, por medio de dos mandos de enfoque que la mueven en sentido antero-posterior y latero-lateral.

a.1.4. Tornillos macro y micrométrico: Son mandos que desplazan la platina en sentido vertical (en algunos microscopios la platina es fija y lo que se desplaza en sentido vertical es el revólver y los objetivos). El tornillo macrométrico permite un primer enfoque de aproximación mientras que el tornillo micrométrico realiza un enfoque fino y preciso.



Figura 33. Componentes del microscopio óptico compuesto

Fuente: Madigan y otros (ob. cit)

a.1.5. Revólver: Es la plataforma que soporta los objetivos.

a.2. El sistema de iluminación: Son las piezas del microscopio encargadas de iluminar el espécimen para que su imagen pueda ser ampliada por el sistema óptico. En general consta de una lámpara y su correspondiente transformador; ambos situados en la base del microscopio. Un interruptor y un botón regulador de la intensidad que controlan la iluminación del objeto a observar. En algunos microscopios existe también un diafragma de la lámpara que controla el diámetro del haz luminoso.

a.3. Sistema óptico: Es el encargado de aumentar las imágenes proporcionadas por los objetos a observar. Básicamente consta de los objetivos, los oculares y el condensador.

a.3.1. El condensador: Se trata de una pieza con un conjunto de lentes, situada debajo de la platina, cuya misión es concentrar la luz y enviarla sobre el espécimen, a un ángulo que permita iluminar completamente la abertura del objetivo. Su fin es proporcionar una adecuada iluminación del mismo. El condensador se puede desplazar en sentido vertical mediante un mando. Así mismo posee un diafragma iris, que sirve para regular la entrada de luz, además de un soporte que permite colocar un vidrio, para que filtre la luz artificial y así asemejarla a la luz natural. Igualmente, mediante una palanca, se puede controlar la cantidad de luz sobre el espécimen.

Este sistema de lentes, colocados entre el espejo y la lámina, tienen una apertura numérica (A.N) de 1,25 y 1,40; generalmente. Se entiende como AN, una propiedad del objetivo y del lente del condensador que influye en el poder de resolución del microscopio de una determinada onda de luz. Se calcula así:

$$\text{Poder de resolución} = \frac{\text{Longitud de onda de luz}}{\text{AN del objetivo} + \text{AN del condensador}} \quad (\text{Ec. 1})$$

- . La escala de longitud de onda está entre 400 y 700 nm (0,4 a 0,7 μm)
- . La máxima AN para el objetivo de luz en seco es de 0,85 μm
- . La máxima AN para el objetivo de inmersión en aceite es 1,2 a 1,4 μm

Si se tiene un poder de resolución de 0,3 μm , significa que si dos puntos están separados menos de 0,3 μm , aparecerían como uno solo, por lo que deben estar separados más de esa distancia para verse como dos objetos distintos. Por ejemplo; si la longitud de onda utilizada es de 0,5 μm , se establecería un poder de resolución de 0,232 μm , dado que la AN del objetivo es 1,3 y del condensador es 0,85; tal como se establece en el cálculo:

$$\text{Poder de resolución} = \frac{0,5 \mu\text{m}}{1,3 + 0,85} = 0,232 \mu\text{m} \quad (\text{Ec. 2})$$

La apertura numérica (AN) es la cantidad de luz que entra en un objetivo desde un punto del campo del microscopio. En un lente la AN va a depender del índice de refracción (N) del medio que llena el espacio entre el objeto y la parte frontal del objetivo, y del ángulo (α) de los rayos de luz más oblicuos que pueden entrar en el objetivo. Se determina de la siguiente manera:

$$\text{AN} = N \times \sin \alpha / 2 \quad (\text{Ec. 3})$$

a.3.2. Los objetivos: Son las piezas que poseen la lente situada sobre el objeto a observar y se encuentran alojados en una pieza giratoria que recibe el nombre de revolver. Sirven para aumentar la imagen del objeto a estudiar. Representan la parte óptica que dan el aumento inicial de los objetos que son observados. Suelen llevar grabados en su cuerpo una serie de inscripciones (palabras, letras y números) así como una serie de anillos de colores cuyo significado es el siguiente:

- . Cada objetivo lleva grabado el valor de su coeficiente de aumento, o sea la capacidad de aumentar el objeto un número de veces (expresada por un número y por un anillo de color): 1 (negro); 2,5 (pardo); 4 (rojo); 6,3 (anaranjado); 10 (amarillo); 16 (verde claro); 25 (verde oscuro); 40 (azul claro); 63 (azul oscuro);

100 (blanco). De todos los objetivos expresados en la serie anterior los representados en negrita son los de utilización más frecuente. Los objetivos también pueden llevar grabado el valor de su apertura numérica que indica el poder de resolución del objetivo y cuyos valores oscilan entre 0.15 y 1.30.

Dentro de los objetivos comunes se tienen:

a.3.2.1. Objetivo seco de menor aumento: 10X, distancia focal 16 mm, apertura numérica 0,25 U, generalmente. Con este objetivo se obtiene un campo de observación más grande, en el cual el objeto puede ser más fácilmente encontrado y movido al centro del campo. Se puede tener una ampliación, en conjunto con el ocular, de 100 veces (10 ocular x 10 objetivo = 100x).

a.3.2.2. Objetivo seco de mayor aumento: 40X a 60X, distancia focal 4 mm, apertura numérica 0,65 U. Con este objetivo se adquiere mayor aumento y así una estructura puede ser estudiada más detalladamente. Ampliación: 400 a 600 veces.

a.3.2.3. Objetivo de inmersión en aceite: 97X a 100X, distancia focal 1,8 mm, apertura numérica 1,2 a 1,4 U. Con este objetivo se obtiene el mayor aumento (1000 a 2000 veces). El aceite llena el espacio entre el objeto y el objetivo, evitando de esta forma la pérdida de luz. Se utiliza para observar material biológico coloreado. El aire tiene un índice de refracción de 1.0, que limita la resolución que se puede obtener, pero se puede incrementar la apertura numérica (AN) poniendo aceite de inmersión entre el espécimen y el objetivo, aumentando así el poder de resolución del microscopio. Este aceite tiene un índice de refracción de 1.5, lo que aumenta considerablemente la AN y esto mejora el poder de resolución del instrumento.

a.3.3. Oculares: Son lentes que aumentan por segunda vez la imagen según un factor que se puede ver grabado en la superficie del anillo giratorio (5X, 8X, 10X y 12,5X). Además, también se puede ver grabado, junto al factor de aumento, el valor de su índice de campo visual. El campo visual de un ocular es la superficie de la imagen intermedia del tubo, formada por el objetivo, observada a través del ocular. Esta superficie se verá ampliada por el factor del ocular, es decir, por el valor del aumento expresado en el anillo giratorio del mismo. Así el diámetro de una imagen de un ocular con los valores 10/18 (el 10 indica los aumentos y el 18 es el índice de campo visual) será de 180 mm a una distancia de 250 mm.

El diámetro real de la superficie observada se calcula dividiendo el diámetro del campo visual (o sea el índice del campo visual) por el aumento del objetivo (y eventualmente por el factor de tubo). De esta forma, con un ocular de 10/18 y un objetivo de 25/0,56 el diámetro de la superficie observada es de $18:25 = 0,72$ mm.

Los oculares se introducen en el tubo por simple deslizamiento y pueden separarse o juntarse para adaptarse a la distancia interpupilar de cada sujeto. El grado de separación se puede comprobar en la escala existente entre los dos oculares. Cada ocular posee un anillo giratorio para corregir los defectos de refracción del ojo del usuario.

2.2. Técnicas para observar microorganismos

Para hacer observaciones de células microbianas es necesario definir la técnica que se desee aplicar, en función a lo que se quiere visualizar. Para ello se tienen dos técnicas principales: a) Preparaciones en vivo o en fresco, b) Técnicas de tinción. La primera de ellas es por suspensión de microorganismos en un líquido y la otra por películas o frotis secos, fijados y teñidos en la muestra.

2.2.1. Suspensiones de microorganismos en líquido: Dentro de ellas se tiene el montaje húmedo y la técnica de la gota pendiente. En ambas técnicas no se emplea coloración alguna, sólo se limita a observar a los microorganismos en su forma, agrupación, además del movimiento que desarrollan, para así evaluar la manera y velocidad de desplazamiento.

Las preparaciones en fresco se utilizan para observar microorganismos vivos. Por ejemplo, para la búsqueda de *Trichomonas vaginalis* en secreciones vaginales. Este protozoo de gran movilidad causa inflamación de la vagina y la uretra. Es importante en ambas técnicas no confundir el movimiento de las células con el de Brown, el cual ocurre por choques moleculares con el microorganismo. Si el material es demasiado espeso, puede diluirse con igual volumen de solución salina fisiológica estéril para permitir la diferenciación de sus elementos. Se recomienda usar microscopios ópticos de campo oscuro para su observación y no de campo claro por dificultar la diferenciación.

2.2.1.1. Montaje húmedo: Consiste en colocar una gota del fluido que contiene el material biológico sobre el portaobjeto para luego taparla con el cubreobjeto. Para reducir la tasa de evaporación y eliminar corrientes de aire, se recomienda rodear la gota con vaselina o material similar, a fin de proporcionar un cierre y no se confunda el movimiento celular con el posiblemente proporcionado por el desplazamiento del cubreobjeto, producto inclusive de la misma respiración de la persona.

Una de las desventajas principales que presenta esta técnica es que el cubreobjeto, por muy liviano que sea para el humano, puede significar una limitante para el desplazamiento del microorganismo por proporcionarle una presión que pudiese influir en su libertad de movimiento.

2.2.1.2. Método de gota pendiente: Desarrollado por Robert Koch, el cual constituye el mismo principio de trabajo que el montaje anterior, sólo que el portaobjeto empleado es especial; pues consta de una concavidad, de forma tal que la gota queda suspendida del cubreobjeto. Esa innovación hace que los microorganismos se desplacen con mayor libertad, dado que no hay presión alguna, por estar la gota suspendida.

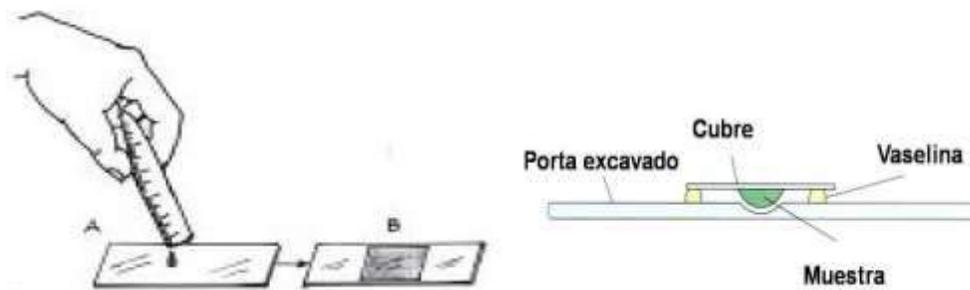


Figura 34. Técnicas de preparaciones en vivo para observar microorganismos: a. Montaje húmedo; b. Gota pendiente
Fuente: Reynoso y otros (2015)

Ambas técnicas son muy utilizadas para:

- . Realizar observaciones de microorganismos que se distorsionan por un tratamiento con calor o con productos químicos, o cuando son difíciles de teñir.
- . Cuando se desea estudiar la motilidad o reproducción del microorganismo.
- . Se utiliza en el laboratorio clínico para diagnosticar muestras, suspendidas en líquidos, en la que se sospecha la presencia de protozoos.
- . En la industria de alimentos se emplea para un diagnóstico rápido de microorganismos en muestras líquidas, bien sea de materias primas, de productos en proceso o terminados.

2.2.2. Técnicas de tinción: Son técnicas en las cuales se emplean colorantes para un mejor y mayor detalle de la célula, en función a lo que se quiere observar de ella. Los procedimientos que se han desarrollado permiten:

- . Mejor observación morfológica de los microorganismos.
- . Identificar partes estructurales de las células microbianas, tales como flagelos, esporas, cápsulas, paredes celulares, centros de actividad respiratoria, entre otras.
- . Distinguir entre tipos diferentes de células o para revelar la presencia de determinados microorganismos.
- . Ayudar a identificar y/o diferenciar microorganismos similares, por aumentar el contraste entre la célula y el medio, además de dar apoyo en la tipificación bioquímica.

Para llevar a efecto una tinción, es importante fijar el frotis, que no es más que adherir el material biológico a observar sobre el portaobjeto para así poder ir más a detalle de su forma, agrupación, estructuras, tamaños, entre otros. Las células generalmente son tratadas para coagular el protoplasma antes de teñirlas, proceso llamado fijación. Para bacterias, la fijación por el calor es lo más corriente, aunque también puede fijarse con sustancias químicas como formaldehído, ácidos y alcoholes. Después de la fijación, si se añade el colorante, no se producen ulteriores cambios estructurales en el protoplasma.

La fijación se realiza habitualmente en células que han sido fijadas sobre un portaobjetos, tratando después éste con el agente fijador, y siguiendo inmediatamente el proceso de tinción. La fijación produce

habitualmente el encogimiento de las células; la tinción, por el contrario, hace que las células aparezcan mayores que lo que es realmente, de manera que las medidas de las células que han sido fijadas o teñidas no pueden realizarse con mucha precisión.

En este caso de muestras teñidas no se estudia el movimiento de las células. Se siguen los siguientes pasos:

. Colocar el frotis de la muestra sobre un portaobjeto de vidrio, diferenciándose si es de ejemplares sólidas o líquidas. Si es sólido, inicialmente se coloca en el portaobjeto una o más gotas de agua esterilizada (destilada) o caldo nutritivo, de forma tal que abarquen un centímetro de diámetro. Posteriormente se toma el material biológico, previa esterilización del asa, para luego disolverlo en la gota formada anteriormente. Es importante disolver muy suave para no destruir las células.

Si la muestra es líquida, se toma una o más lupadas (oval del asa), con el asa de siembra directamente del material biológico y luego se coloca sobre el portaobjeto, para finalmente distribuirlo suavemente hasta formar un diámetro de uno 1,0 a 1,5 centímetros.

. Adherir la muestra de forma permanente sobre el portaobjeto, para lo cual se hace pasar por la llama del mechero y así se logra que los microorganismos se peguen a la superficie de este material de vidrio.

. Ya listo el frotis, se procede a aplicar los colorantes, en función a la tinción a desarrollar.

2.2.2. 1. Tipos de tinciones:

a. Tinción simple

b. Tinciones diferenciales:

b.1. Tinción de Gram

b.2. Tinción ácido resistente

c. Tinciones específicas:

c.1. Tinción de esporas

c.2. Tinción de cápsulas

c.3. Tinción de flagelos

c.4. Tinción negativa

a. Tinción simple: Es la coloración de microorganismos aplicando una sola solución a la película fijada. Se utiliza un solo colorante, por lo que todas las estructuras celulares se tiñen con la misma tonalidad (Tinta china, Azul Metileno de Loeffler, Azul de lactofenol, cristal violeta). Tiene muchas aplicaciones, siendo la fundamental detallar forma, agrupación, tamaño, multiplicación, pureza de la colonia y algunas estructuras visibles. Para observar levaduras se emplea esta tinción.

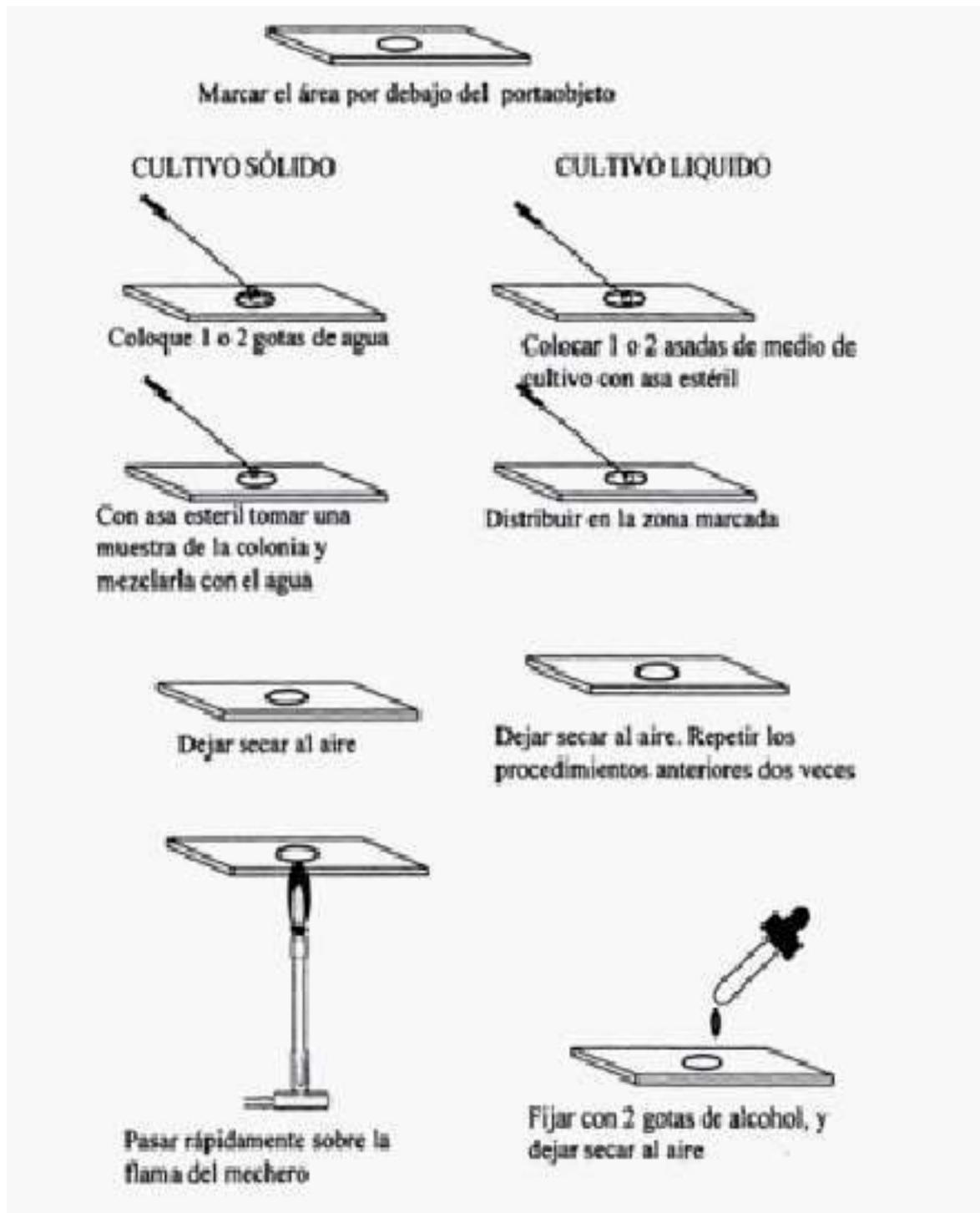


Figura 35. Preparación y fijación de frotis bacterianos a partir de cultivos sólidos y líquidos

Fuente: Rodríguez y Salazar (2014)

vidos



Figura 36. Procedimiento para la tinción simple

Fuente: Reynoso y otros (ob. cit)

Por otro lado, el hidróxido de potasio al 10% (solución de KOH) permite ver elementos de hongos, ya que digiere parcialmente los componentes proteicos, por ejemplo, de la célula huésped, pero no actúa sobre los polisacáridos de las paredes celulares de los hongos. La tinta china o Nigrosina permite observar células encapsuladas, en el que los polisacáridos capsulares rechazan la tinta china y la cápsula aparece como un halo claro alrededor de los microorganismos. El Azul de metileno de Loeffler puede agregarse a las preparaciones en fresco de heces para observar la presencia de leucocitos.

La técnica consiste en hacer actuar el colorante unos pocos segundos o minutos, después del cual se lava con agua y se deja secar, bien sea con papel (de filtro o secante) o con aireación (natural o artificial). Se recomienda aplicar el colorante por un minuto.

b. Tinciones diferenciales: Implican la exposición de las células a más de una solución de colorante o reactivo, con el fin de distinguir tipos de microorganismos o partes de ellos. El fundamento de estas tinciones se basa en que los microorganismos difieren química y físicamente entre sí y por eso reaccionan de una manera distinta a un determinado colorante.

b.1. Tinción de Gram: Se debe al zoólogo danés Hans Christian Gram (1853 – 1938), quien la desarrolló en 1884. Desde esa fecha ha tenido relativa importancia para la microbiología, específicamente en la bacteriología. Esta técnica divide todo el mundo bacteriano en dos categorías: Gram positivas (G+) y Gram negativos (G-), donde las primeras de ellas conservan el colorante primario cristal violeta y por lo tanto aparecen de color morado o violeta oscuro, mientras que el segundo grupo pierden el colorante primario al ser lavadas con alcohol-acetona, y al teñirse con el colorante de contraste (safranina), que es rojo, aparecen de color rosado o rojo.

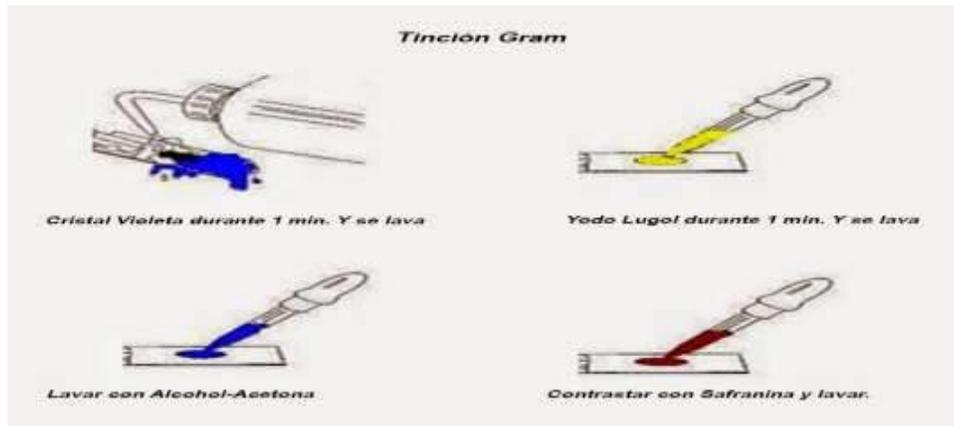


Figura 37. Procedimiento para la tinción de Gram

Fuente: Rodríguez y otros (2005)

La diferencia en la coloración se debe al grosor y contenido de peptidoglicano de la pared celular. El peptidoglicano es un polímero de dos azúcares modificados (N – acetil glucosamina y N – acetil murámico), también es conocido como mureína. Es un material de la pared celular bacteriana que le confiere rigidez en conjunto con el ácido teicoico. La pared de la célula Gram positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano, así como algo de ácido teicoico, rodeada de la membrana citoplasmática. Generalmente, 80%-90% de la pared de la célula Grampositiva es peptidoglicano, mientras que la pared de la célula Gramnegativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula Gramnegativa es peptidoglicano.

La membrana externa de los microorganismos Gram negativos, rica en lipopolisacáridos (LPS), consta de tres regiones: lípido A, núcleo y antígeno O. En función a ello, uno de los factores responsables de la muerte por septicemia debido a bacterias de este tipo es la presencia de LPS, que origina la superproducción de factores necróticos tumorales (TNF; FNT), que da lugar a la sobreestimulación de ácido nítrico sintetasa.

El procedimiento es el siguiente:

- . Se fija el frotis.
- . Se aplica el colorante primario (Cristal violeta), por un minuto.
- . Se lava el portaobjeto con el colorante con agua a baja presión.
- . Se aplica el mordiente, que es una solución de yoduro de potasio al 10% por un minuto.
- . Se aplica solución alcohol – acetona por espacio de 2 a 3 segundos. Se recomienda aplicarlo al portaobjeto, dejándola caer de arriba abajo y no directa en la muestra.
- . Se lava el portaobjeto con la muestra con agua a baja presión.
- . Se aplica safranina por treinta (30) segundos.
- . Se lava el resto del colorante con agua a baja presión.

- . Se deja escurrir para que se seque la muestra coloreada.
- . Se observa en el microscopio con objetivos de enfoque y luego de inmersión, en ese mismo orden, tomando en cuenta que hay que aplicar aceite de inmersión en la muestra.

Secuencia de la coloración celular:

En la secuencia del proceso sucede que al agregarse cristal violeta, las células las absorben y se tiñen de azul. Luego al cubrir el portaobjeto con la solución de yodo-yoduro potásico (KI), hace soluble el I₂ en agua y así entra en las células y forma un complejo insoluble en agua con el cristal violeta. De nuevo tanto las células grampositivas como las gramnegativas se encuentran en la misma situación.

Se lleva a cabo después la decoloración, usando una mezcla de alcohol-acetona, sustancias en las que es soluble el complejo I₂-cristal violeta. Algunos organismos (grampositivos) no se decoloran, mientras que otros (gramnegativos) lo hacen. La diferencia esencial entre esos dos tipos de células está por tanto en su resistencia a la decoloración; esta resistencia se debe probablemente al hecho de que en el caso de bacterias Gramnegativas, la mezcla de alcohol/acetona es un solvente lipídico y disuelve la membrana exterior de la pared de la célula (y también puede dañar la membrana citoplásmica a la que se une al peptidoglicano).

La delgada capa de peptidoglicano es incapaz de retener el complejo cristal violeta-yodo y la célula se decolora. Las células Grampositivas, a causa de sus paredes celulares más espesas (tienen más peptidoglicano y menos lípidos), no son permeables al disolvente, ya que éste deshidrata la pared celular y cierra los poros, disminuyendo así el espacio entre las moléculas y provocando que el complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular. Después de la decoloración las células Grampositivas son todavía azules, pero las Gramnegativas son incoloras. Para poner de manifiesto las células Gramnegativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica. Después de la coloración de contraste las células gramnegativas son rojas, mientras que las grampositivas permanecen azules.



Figura 38. Secuencias de la coloración de las células en la tinción de Gram
Fuente: Reynoso y otros (ob. cit)

Tabla 5. Consecuencias de la aplicación de colorantes en la tinción de Gram

Soluciones en el orden de aplicación	Reacciones y aspectos de las bacterias	
	Gram positivas	Gram negativas
Cristal violeta (1 min)	Las células se tiñen de violeta	Las células se tiñen de violeta
Solución de iodo (1 min)	Se forma un complejo CV – I dentro de las células y continúan violeta	Se forma un complejo CV – I dentro de las células y continúan violeta
Alcohol – acetona (2 – 3 seg)	Las paredes celulares se deshidratan, los poros merman. La permeabilidad de la pared celular y membrana citoplasmática disminuye. El complejo CV – I no puede salir de las células y permanecen color violeta	Se extraen lípidos de las paredes celulares; los poros se agrandan y el complejo CV – I es eliminado de las células, quedando ellas incoloras
Safranina (30 seg)	Las células no se afectan; siguen violeta	Las células toman este colorante y se ponen de color rojo

Fuente: El autor

Algunos géneros de bacterias Gram positivas: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Leuconostoc*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, entre otros. Algunos géneros de

bacterias Gram negativas: *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomona*, *Spirillum*, *Rhizobium*, *Neisseria*, entre otros.

Importancia de diferenciar bacterias Gram positivas con Gram negativas

Para la microbiología es fundamental tener claro las diferencias entre estos grupos de bacterias para poder tomar decisiones en cuanto a su manejo se refiere. En la tabla siguiente se especifican las principales diferencias entre ellas. Se tiene que las bacterias Gram positivas, por el hecho de tener una pared celular más gruesa, rica en peptidoglicanos y de menor cantidad de lípidos, la hace mucho más resistentes a los agentes físicos, como temperatura y potencial de hidrogeniones (pH); principalmente del calor.

Al revisar esta tabla se tiene que las bacterias Gram positivas, por el hecho de tener una pared celular más gruesa, rica en peptidoglicanos y de menor cantidad de lípidos, la hace mucho más resistentes a los agentes físicos, como temperatura y potencial de hidrogeniones (pH), principalmente del calor. Este conocimiento es fundamental para el tratamiento térmico de los alimentos, dado que, en función a la presencia de la carga bacteriana, se decidiría si es necesario aplicar temperaturas por debajo de 100 °C (Pasteurización) o por encima de 100 °C (Esterilización).

Tabla 6. Principales diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas

Características	Gram positivas	Gram negativas
Pared celular	Gruesa (monocapa) Baja en lípidos (1 – 4%)	Delgada (multicapa) Alta en lípidos (11 – 22%)
Inhibición por colorantes básicos	Notable	Menos notable
Necesidades nutritivas	Más complejas	Más simples
Resistencia a métodos físicos	Más resistentes	Menos resistentes
Susceptibilidad a la penicilina	Más susceptible	Menos susceptibles
Producción de toxinas	Exotoxinas	Endotoxinas
Color resultante de la tinción	Cristal violeta (Azul o morado)	Safranina (Rojo o rosado)

Fuente: Adaptado de Pérez (2012)

Dentro del grupo de bacterias Gram positivas hay dos géneros que son capaces de formar endosporas, siendo ellos *Clostridium* y *Bacillus*; estructura que por tener el complejo ácido dipicolínico – calcio – peptidoglicano, la hace resistente a temperaturas por encima de 100 °C; es decir, en la cocción de los alimentos. Ante esta situación y dado que son géneros productores de toxinas, representan un peligro de intoxicación para el consumidor, por lo que se tienen que plantear estrategias de control.

La intención no es someter los alimentos a temperaturas por encima de lo requerido en su preparación para su control enzimático y microbiológico, porque es necesario garantizar las condiciones organolépticas

y nutricionales del mismo. Es importante entonces para un tecnólogo en alimentos saber la carga microbiana inicial del producto, para en función a ello, decidir que práctica aplicar, en función a obtener un producto mínimamente procesado.

Tabla 7. Principales componentes de las paredes celulares de bacterias Gram positivas y Gram negativas

Componente	Gram positivas	Gram negativas
Péptidos glucano	+	+
Ácidos teicoicos	+	-
Polisacáridos	+	-
Proteínas	+/-	+
Lipopolisacáridos	-	+
Lipoproteínas	-	+

Fuente: Adaptado de Rodríguez y Salazar (ob. cit)

Por otro lado, es importante conocer que las bacterias Gram negativas son más resistentes a los agentes químicos; por lo que para la industria de alimentos es necesario tomar en cuenta este factor, dado que en el momento de aplicar programas de limpieza y estandarización en la planta, saber que utilizar, en función al tipo de desecho que genera. Para la industria farmacéutica es importante tener presente esta diferencia para el diseño y fabricación de medicamentos, en función a los agentes causales de determinadas enfermedades.

b.2. Tinción ácido resistente: Fue desarrollada por Paul Ehrlich (1854 – 1915) en 1882, para visualizar microorganismos (parásitos y bacterias), en los que las paredes celulares de contienen ácidos grasos (ácidos micólicos) de cadena larga (50 a 90 átomos de carbono) que les confieren la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido, después de la tinción con colorantes básicos. Por esto se denominan de esa forma.

Las micobacterias como *M. tuberculosis* y *M. marinum* y los parásitos coccídeos como *Cryptosporidium* se caracterizan por sus propiedades de ácido-alcohol resistencia; es por ello que la coloración clásica de Ziehl-Neelsen requiere calentamiento para que el colorante atraviese la pared bacteriana que contiene ceras. Es así como se ha desarrollado esta coloración de ácido-alcohol resistencia modificada, que diferencia las especies de *Nocardia* (bacterias ramificadas filamentosas cuyas paredes celulares contienen ácidos-grasos de unos 50 átomos de carbono), de los actinomicetos (muy semejantes, pero no ácido-alcohol resistentes). *Nocardiaspp* son decoloradas por la mezcla ácido-alcohol estándar pero no por un tratamiento más suave con ácido sulfúrico 0,5 a 1%. Estos microorganismos se denominan ácido-alcohol resistentes parciales o débiles.

Actualmente se utiliza una modificación de la técnica de Ehrlich que recibe el nombre de tinción de Ziehl-Neelsen, que fue descrita por primera vez por los médicos alemanes, el bacteriólogo Franz Ziehl y el

patólogo Friedrich Neelsen. Esta tinción sirve para teñir bacterias del género *Mycobacterium*, el resto de las bacterias se tiñen de azul por el colorante de contraste. *M. tuberculosis*, causante de la tuberculosis y *M. leprae*, causante de la lepra o enfermedad de Hansen, se identifican mediante esta tinción. Las micobacterias son ácido-alcohol resistentes porque poseen en sus cubiertas lípidos de ácidos grasos complejos que forman en su pared celular un material de tipo céreo resistente a la decoloración. Permite poder distinguir aquellos microorganismos cuya coloración resiste la acción de alcoholes y ácidos suaves (ácido-alcohol resistente) de otros que no resisten la decoloración (ácido alcohol sensible).

Una tinción ácido-alcohol resistente se realiza según los siguientes pasos:

- . Tinción primaria con fucsina básica, que tiñe todas las células de rojo.
- . Calentamiento suave de la preparación para facilitar la penetración del colorante en el interior de la célula por cinco minutos. Se calienta hasta que empiecen a desprenderse vapores blancos.
- . Decoloración con una solución de ácido clorhídrico al 3% (V/V) en etanol de 95% (mezcla alcohol – ácido). Este decolorante elimina la fucsina de todas las células excepto de las micobacterias.
- . Lavar con agua.
- . Coloración de contraste con azul de metileno (según Loeffler). Se tiñen de azul todas las células previamente decoloradas, lo que facilita la diferenciación entre las células de *Mycobacterium*, aún teñidas de rojo, y las células restantes del espécimen.
- . Lavar con agua.

El resultado esperado es que las bacterias ácido-alcohol resistentes (bacilos de la tuberculosis, lepra y otras Micobacterias) se observan de color rojo sobre el contraste azul de otras células bacterianas o restos celulares pertenecientes a los organismos sensibles a esta decoloración ácida.

c. Tinciones específicas: Mientras las tinciones diferenciales permiten distinguir entre distintos tipos de microorganismos, las tinciones específicas incrementan el contraste en las células microbianas y revelan estructuras particulares, entre las que se incluyen las endosporas, los flagelos y las cápsulas. Entre ellas se tienen:

c.1. Tinción de esporas: Es una técnica conocida como el método de Schaeffer y Fulton, aplicada a algunos géneros bacterianos, entre los que destacan *Clostridium* y *Bacillus*, quienes son capaces de producir en su interior formas de resistencia denominadas endosporas. Estas se producen cuando las condiciones ambientales son desfavorables (agotamiento de los nutrientes, temperaturas extremas, radiaciones, compuestos tóxicos, entre otros) formándose una spora por cada forma vegetativa.

Al finalizar el proceso de esporogénesis, la célula vegetativa se lisa y libera la spora al exterior. Cuando el ambiente es favorable, la spora germina generando una nueva forma vegetativa. La capacidad de

germinar perdura durante años. Algunas de las bacterias productoras de endosporas son patógenas para el hombre, por lo que su estudio y observación son de enorme interés.

Al finalizar el proceso de esporogénesis, la célula vegetativa se lisa y libera la espora al exterior. Cuando el ambiente es favorable, esta germina generando una nueva forma vegetativa. La capacidad de germinar perdura durante años. Algunas de las bacterias productoras de endosporas son patógenas para el hombre, por lo que su estudio y observación son de enorme interés.

El procedimiento consiste en:

- . Fijar el frotis al portaobjeto.
- . Aplicar solución verde malaquita al 5% como colorante primario, por espacio de 5 minutos sobre la llama del mechero. Se recomienda usar un beacker con agua hirviendo a la mitad y sobre él, con una pinza de madera, colocar el portaobjeto con la muestra coloreada. Es importante evitar que la muestra hierva y que se deshidrate, por lo que se debe ir agregando el colorante primario en ese espacio de tiempo. La intención de esta operación es promover la entrada del colorante a la endoespora, dado que es una estructura rígida por el nivel del complejo ácido dipicolínico – calcio – peptidoglucano que posee.
- . Retirar la muestra coloreada y dejarla enfriar muy rápidamente para luego lavar con agua destilada a baja presión.
- . Aplicar el colorante secundario (safranina) por espacio de un minuto.
- . Lavar con agua destilada a baja presión para retirar el resto del colorante secundario.
- . Escurrir y secar.
- . Observar con objetivos de enfoque e inmersión, previa aplicación de aceite de cedro en la muestra coloreada.

El resultado esperado en la observación al microscopio es que el contenido citoplasmático de la célula vegetativa se tiñe de rojo y la endoespora de verde para así diferenciarla. En algunos casos la endoespora no absorbe el colorante primario y queda transparente, aún así se logra observar porque el citoplasma se tiñe de verde. Hay casos en los que ya conocida la especie microbiana y a sabiendas que es capaz de producir la endoespora en determinado momento, se puede visualizar con una tinción simple, en la que el contenido citoplasmático se tiñe de azul y la endoespora queda transparente.

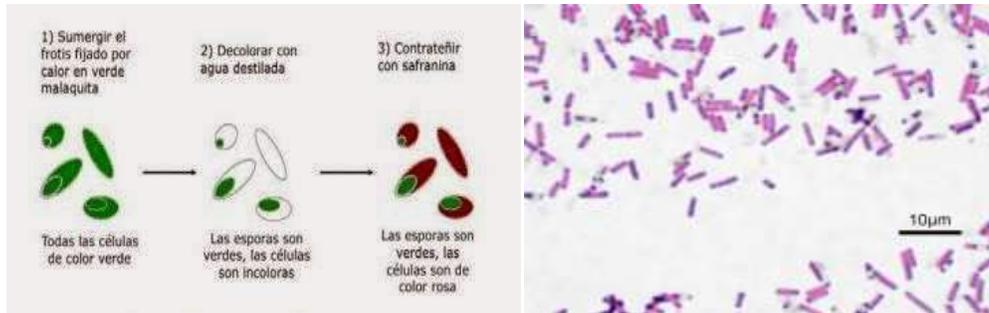


Figura 39.a. Secuencia en la tinción de endoesporas; b. Endoesporas en *Bacillus subtilis*
Fuente: Rodríguez y Salazar (ob. cit)

c.2. Tinción de cápsulas: Algunas bacterias secretan un material viscoso polimérico compuesto de polisacáridos, polipéptidos y polinucleótidos conocido por su densidad como cápsula, la cual es soluble en agua. La presencia de este material viscoso en las bacterias las hace resistentes a la fagocitosis por los leucocitos de la sangre. Es rica en mucopéptidos, de características mucilaginosas, por lo que el empleo de los procedimientos anteriores la disolvería; es por ello que se tiñe el frotis la solución de ácido acético – cristal violeta, para luego lavar con una solución de sulfato de cobre y así la cápsula se tiñe de azul violeta y las células de azul oscuro.

Otro método consiste en:

- . Mezclar una lupada de microorganismos con una gota de nigrosina (en el portaobjeto) para luego diseminarlos sobre la lámina y dejar secar al aire.
- . Se procede a flamear para fijar los microorganismos a la lámina.
- . Se cubre con cristal violeta por un minuto.
- . Se lava para remover el exceso de colorante.
- . Se deja secar para observar con el objetivo de inmersión.

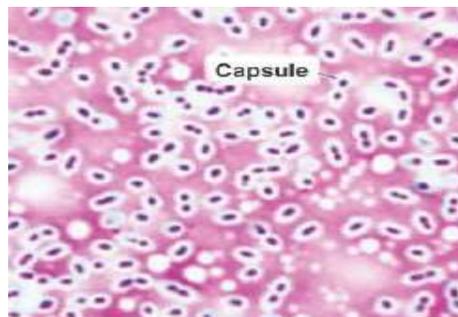


Figura 40. Cápsula de *Klebsiella pneumoniae*
Fuente: Madigan y otros (ob. cit)

En este caso la célula vegetativa se tiñe de azul y la cápsula se observa como la frontera entre el espacio del microorganismo y la capa mucilaginosa en sí.

c.3. Tinción de flagelos: El flagelo o los flagelos son apéndices largos y finos, ricos en flagelina, cuyo espesor está entre 0,02 a 0,03 μm de diámetro, por lo que se hace necesario aplicar una solución para engrosarlo y así poder diferenciarlo, dado que por si solos resultan invisibles al microscopio. Es una técnica de engrosamiento ideada por Leifson, mediante combinaciones de mordientes y metales, además del uso de algún colorante para teñirlos.

Las bacterias pueden tener en uno o en ambos polos un solo flagelo (monótricas) o un penacho de los mismos (lofótricas), o bien muchos de ellos que se distribuyen por toda la superficie (perítricos). Son los responsables de la motilidad de la célula en los medios líquidos y la técnica se realiza de acuerdo al siguiente procedimiento:

- . Se fija químicamente la suspensión bacteriana, mediante formol, y se hace la extensión en un portaobjetos.
- . Se deja secar al aire, sin calentamiento alguno.
- . Se cubre la preparación con una mezcla de ácido tánico y el colorante rosanilina, de preparación extemporánea. El ácido tánico engruesa los flagelos y la rosanilina los tiñe.
- . Se retira el exceso de colorante con agua.
- . Por último, se deja secar al aire, antes de su observación al microscopio.

Esta tinción permite determinar el número y la disposición de los flagelos de las bacterias, lo que constituye una información esencial para la identificación de muchas especies.

En la tabla 8 se presenta un resumen de las principales tinciones aplicadas en la microbiología y que son fundamentales para el ingeniero y tecnólogo en alimentos, dado que aún son las más aplicadas por su sencillez y bajo costo.

c.4. Tinción negativa: El material biológico se mezcla con tinta china diluida (1:10) y se extiende formando una película fina. Con esta tinción se estudia la morfología y se llama así porque los microorganismos no se tiñen y se hacen visibles en un fondo oscuro. Se emplea también para observar cápsulas en los microorganismos.



- **Figura 41.** Tinción negativa de *Bacillus smegaterium*
Fuente: Gamazo y otros (2005)

2.2. Colorantes

Tabla 8. Técnicas de tinción para bacterias

Tinción	Uso	Técnica
Simple	Un colorante proporciona contraste para observar mejor un organismo completo. Se usa mucho para observar levaduras	Se tiñe con un colorante básico (azul de metileno, cristal violeta, o fucsina básica) durante uno a cinco minutos. Lavar brevemente con agua. Se tiñen casi todas las bacterias.
Tinciones diferenciales		
Tinción de Gram	Dos o más colorantes; distingue entre bacterias Gram positivas y Gram negativas	Se cubre la preparación de bacterias fijadas con cristal violeta y después con una solución de iodo (mordiente). Todas las células quedan tenidas de color violeta oscuro. Se decolora con acetona al 95%. Luego se aplica safranina. Las células Gram positivas permanecen tenidas, pero las negativas pierden el colorante. Al teñir con safranina (contraste), el color violeta de las Gram positivas se vuelve más oscuro y las Gram negativas se tiñen de rosa.
Tinción de ácido-alcohol resistencia (Ziehl-Neelsen)	Dos colorantes; distingue entre las micobacterias (ácido-alcohol resistentes) y el resto de las bacterias	Se tiñen las células con fucsina básica y se calienta a emisión de vapores durante 5 minutos. Todas las bacterias se tinen de rojo. Se decolora brevemente con una mezcla de alcohol-HCl. Las bacterias resistentes permanecen teñidas de rojo; todas las demás se decoloran. Se trata con el colorante de contraste azul de metileno. Las bacterias ácido-alcohol resistentes continúan tenidas de rojo, las otras se tiñen de azul.
Tinciones específicas		
Tinción de esporas de Schaeffer y Fulton	Tiñe selectivamente las endosporas	Se cubre la preparación con verde de malaquita y se calienta a emisión de vapores durante 3 a 5 minutos. Se lava con agua durante 30 segundos y se tiñe con safranina por un minuto. Las endosporas retienen el color verde; el resto de la célula toma el color rosa.
Tinción de flagelos de Leifson	Permite observar los flagelos	A las células previamente fijadas, se le añade una mezcla de ácido tánico (mordiente) y del colorante rosanilina. El mordiente engruesa los flagelos y el colorante los fine.
Tinción negativa	Revela la presencia de cápsulas	Se utiliza tinta china o nigrosina para teñir una preparación en fresco del espécimen. Las partículas de colorante no pueden penetrar en la cápsula, que se observa como una región clara alrededor de la célula

Fuente: Adaptado de Reynoso, Magnoli, Barros y Demo (ob. cit)

2.3. Colorantes:

Son sales en las que uno de sus iones tiene color, conocido como grupo cromóforo (Pérez, ob. cit); es decir, son sustancias que se fijan en otras sustancias y las dotan de color de manera estable ante factores físicos o químicos, como la luz y agentes oxidantes. Para que ello suceda es importante que el grupo cromóforo haga que la molécula pueda absorber en la región visible del espectro electromagnético, para así aumentar o intensificar el color (grupo auxóchromo).

Una sal es un compuesto formado por un ión cargado positivamente y otro cargado negativamente; de manera que las proteínas de las células se ionicen como ácido o base, además de producir coloración.

2.3.1. Clases de colorantes:

2.3.1.1. Ácidos: Son aquellos cuyo grupo cromóforo reside en el ión negativo, por lo que tiene afinidad con sustancias citoplasmáticas. Son sales de los ácidos sulfúricos o carboxílicos que se precipitan sobre la fibra. Colorean entonces células o estructuras acidófilas. Entre ellas están: eosina, fucsina ácida, ácido pícrico, nigrosina, verde azul, entre otras.

2.3.1.2. Básicos: Son aquellas cuyo grupo cromóforo o color reside en el ión positivo, por lo que tiene afinidad con estructuras internas, coloreando entonces células basofílicas. Son sales amónicas o complejos formados por cloruro de cinc o aminas. Algunos colorantes básicos, de elevado peso molecular, son absorbidos por el algodón y el rayón. Entre ellos se tiene: azul de metileno, safranina, rojo neutro, cristal violeta, entre otros.

2.3.2. Colorantes empleados en microbiología para algunas tinciones:

2.3.2.1. Cristal violeta: Conocido también como violeta de metilo o violeta de genciana, utilizado como un compuesto químico indicador de pH y niveles de colorantes. Sus componentes básicos son el N-tetra, N-penta y N-hexamil p-rosanilinas, en la que la mezcla de ellos puede generar diferentes tonalidades; resultando más metilado al presentar un color más oscuro. Se conocen los tetra (violeta 2B), penta (violeta 6B y hexametilo (violeta 10B), siendo el último el más oscuro de todos. El principal uso del violeta de metilo (por volumen bruto usado mundialmente) es el de tinción textil de color púrpura y para dar tonos violeta oscuro en pinturas y tinta de impresión. En medicina, el violeta de metilo 10B es conocido como violeta de genciana y es el ingrediente activo en el colorante de Gram, usado para clasificar bacterias.

2.3.2.2. Safranina: Es un compuesto químico que tiene un grupo metil, por lo que se clasifica en dimetil, trimetil o mezcla de ambos, dependiendo si está agregado en posición orto o no. Se usa como líquido de contraste en algunos protocolos de tinción, coloreando el núcleo celular de rojo.

2.3.2.3. Verde malaquita: Es un colorante muy empleado en microbiología para la tinción de endoesporas bacterianas, de color verde, además de contratinción con colorantes rojos. Se puede conseguir en comprimidos de 25 y 100 mg, como sal de oxalato, y es muy empleado frente a una gran variedad de parásitos externos y agentes patógenos como hongos, protozoos y bacterias.

2.3.2.4. Nigrosina: Es una mezcla de tinturas sintéticas de color negro cuyo uso principal en la industria es como colorante para lacas y barnices de tintas de marcadores. En biología se utiliza para la tinción negativa de bacterias y del hongo encapsulado *Cryptococcus neoformans*, en la que, sin fijación previa, los microorganismos pueden ser apreciados en formas similares a las vivas, con contornos sin color contra un campo oscuro.

Otra sustancia empleada, no considerada colorante, es el mordiente. Son sustancias químicas (no colorantes), que tienen la propiedad de formar complejos insolubles con los colorantes, permitiendo así fijar el color sobre la célula. Especialmente se emplean como mordientes los óxidos de aluminio y cromo por formar precipitados insolubles. Los más usados son el yodo, el yoduro de potasio, ácido fénico, ácido tánico, entre otros.

2.4. Morfología microbiana

La morfología hace referencia a la forma, agrupación, tamaño de las células. En ella se vislumbra tener una recopilación de la manera como se presentan en forma y agrupación las clasificaciones de microorganismos.

2.4.1. Morfología bacteriana:

Una de las características más importante de las bacterias es su morfología, siendo ellas esféricas, alargadas o cilíndricas y en espiral o helicoidales.

a. Oval o esférica:

- . Se denominan cocos, cuyo diámetro oscila entre 0,2 a 25 μm .
- . Generalmente sin flagelos, por lo que son prácticamente inmóviles.
- . Están dispuestos aisladamente, en pares, cadenas, racimos y cubos
- . Divididos en uno, dos, tres y planos fortuitos.

b. Cilíndricas o alargadas:

- . Se denominan bacilos y tienen forma de bastón.
- . Su longitud y ancho varía por especie; ejemplo: *Clostridium sporogenes* (0,3 a 0,6/3,0 a 7,0 μm), *Pseudomonas spp* (0,5 a 1,0/2,0 a 3,0 μm), *Bacillus megaterium* (0,2 a 1,5/2,0 a 4,0 μm). En términos generales puede estar en: 0,2 a 2,0/1 a 15 μm

- . Sus extremos son rectangulares, redondeados o puntiagudos.
- . Muchas especies esporulan, principalmente de géneros *Clostridium* y *Bacillus*.
- . Muchas especies son flageladas, por lo que tienen motilidad.

c. Espiral o helicoidal:

- . Se presentan predominantemente como células individuales, sin unir.
- . Incluye a las espiroquetas, algunas de las cuales causan enfermedades.
- . Difieren entre sí en cuanto a la longitud, el número, la amplitud y rigidez de las paredes celulares.
- . Entre ellos existen:
 - .. *Espirales cortas*: Que son comas o vibriones de 0,3 a 0,6/1 a 5 μm . Entre ellas está el *Treponema pallidum*, *Vibrio cholerae*. Son bacterias Gram negativas
 - .. *Espirales cortos completos y enrollados o largos y retorcidos (Espirilos)*: Son bacterias Gram negativas, flageladas y de forma helicoidal o espiral. Su tamaño oscila entre 0,3 a 0,5/3,0 a 4,0 μm . Entre ellos están el *Spirillumminus*, *Spirillumserpens*.
 - .. *Espirales de mayor longitud (Espiroquetas)*: Bacterias Gram negativas cuya dimensión va desde 0,1 a 0,6/5 a 500 μm . Entre ellos están *Borrelia anserina*, *Spirochaetastenoptrepta*.

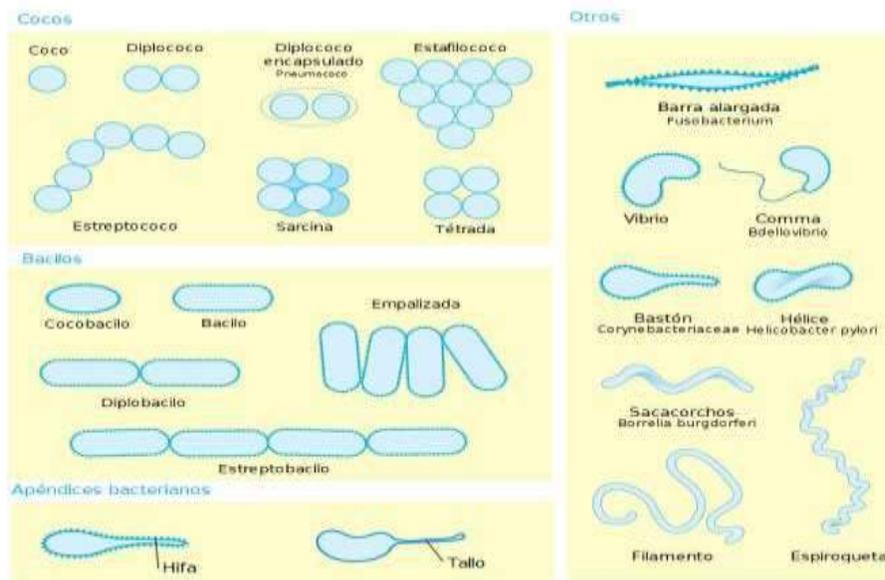


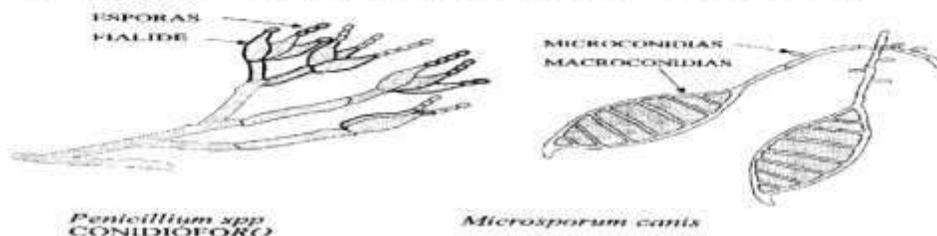
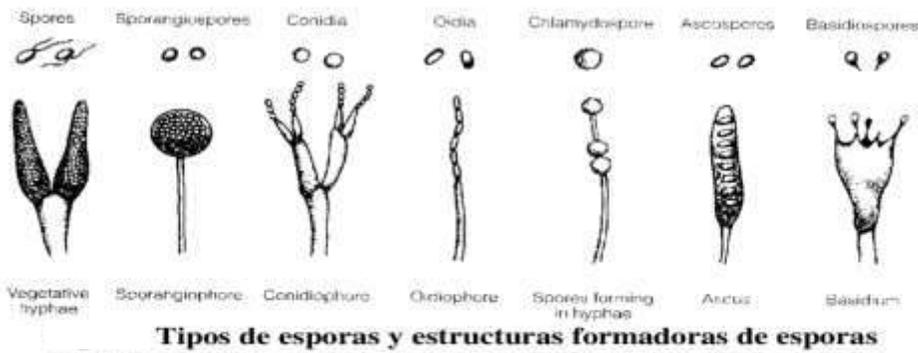
Figura 42. Morfología de bacterias
Fuente: Montoya (2008)

2.4.2. Morfología de mohos y levaduras:

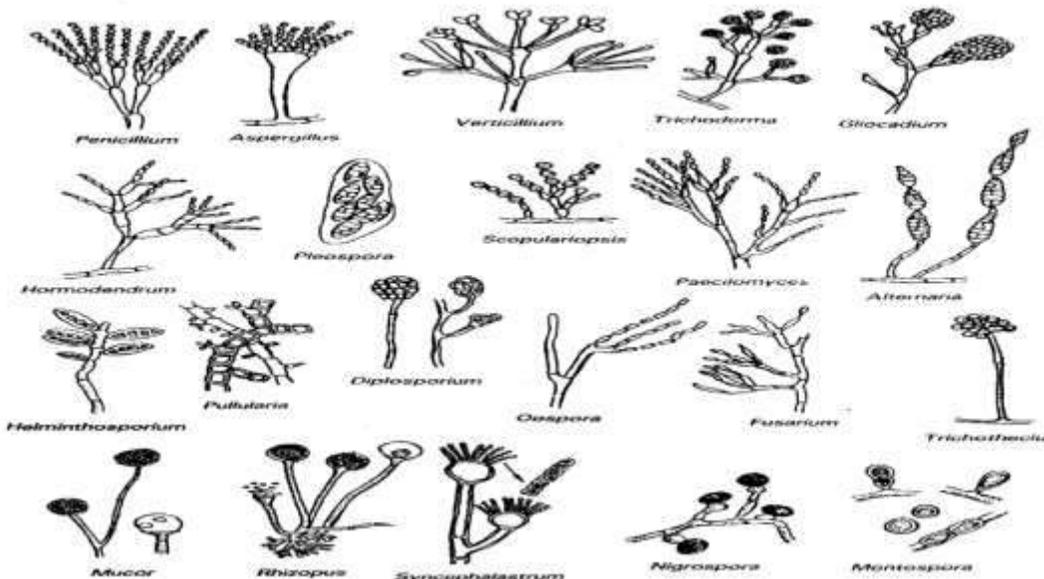
2.4.2.1. Mohos: En general son microorganismos eucariotas pluricelulares filamentosos, que no presentan pigmentos fotosintéticos y son quimioheterótrofos aerobios estrictos. A diferencia de las plantas, presentan un bajo grado de diferenciación en los tejidos. Poseen pared celular que contiene quitina y un polisacárido que le

da rigidez y es responsable de su morfología y en ocasiones celulosa. Algunos presentan cápsula, formada por polisacáridos, con propiedades inmunógenas y antifagocitarias (Tortora y otros, ob. cit).

La estructura o cuerpo vegetativo de un hongo se denomina talo, el cual está formado por filamentos, o hifas, de unas 5 μm de diámetro, que generalmente están ramificadas, siendo tubos largos que están formados por la pared celular de quitina (componente mayoritario) y el citoplasma con sus inclusiones y núcleos con la información genética. Las hifas pueden estar separadas en células por paredes transversales (septos) en los hongos superiores (Eumicetos), o carecer de paredes en los hongos inferiores (Ficomícetos).



Aspecto morfológico de hongos filamentosos



Tipos de hongos que se pueden observar creciendo en alimentos

Figura 43. Clasificación de algunos mohos y levaduras

Fuente: Tomado de Moreno (1988)

El conjunto de hifas se llama micelio. En el micelio se distinguen dos partes: una que penetra en el medio de cultivo y se extiende por su superficie (micelio vegetativo), y otra que se proyecta y contiene las esporas (micelio reproductor o aéreo). Los mohos crecen por el extremo de las hifas (crecimiento apical). Una pequeña cantidad de micelio es suficiente para la formación de un nuevo talo. En términos generales, un moho puede alcanzar tamaños variables, pudiendo ser microscópicos (2 a 10 μm), y macroscópicos, alcanzando varios milímetros.

2.4.2.2. Levaduras: Son hongos que crecen generalmente por gemación, en forma de agregados sueltos de células independientes, que pueden ser globosas, esférica, ovoide, alimonada, piriforme, cilíndrica, triangular e incluso alargada en forma de micelio verdadero o falso. En algunos casos, forman cadenas de células alargadas (pseudohifas), adheridas de modo suelto (blastospora), semejantes a un micelio, por lo que se les denomina pseudomicelio. Algunas especies forman breves extensiones de verdadero micelio, con frecuencia septado (tabicado). Hay especies de levaduras esporógenas. No existe, por tanto, un límite de separación definido entre levaduras y otros hongos que forman un micelio típico. Las dimensiones pueden oscilar de 1 a 9 μm de ancho y 2 a más de 20 μm de longitud según la especie, nutrición, edad y otros factores.

2.4.3. Morfología de los protozoos: Son organismos unicelulares, de naturaleza eucariota, heterótrofos, fagótrofos (depredadores de algas, bacterias y microhongos unicelulares o filamentosos), cuyo tamaño es variable, extendiéndose generalmente desde los 10 a 50 μm . Forma celular generalmente es constante, ovalada, alargada, esférica u otra, en algunas especies. Se extiende desde ameboides (pseudópodos), redondos o cilíndricos rodeados de cilios y de flagelos.



Figura 44. Morfología típica de protozoos

Fuente: Gamazo y otros (ob. cit)

2.4.4. Morfología de las algas: Son seres vivos de tamaño variable, enormemente diversas que van desde 1 μm de diámetro hasta gigantescas algas marinas de 50 a 100 metros de largo. Su forma es variable, que va desde una tipología de una hoja puntiaguda (*Euglena*) a ramificaciones extensas lineales.

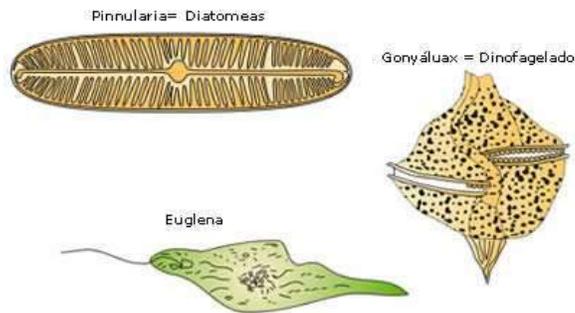


Figura 45. Principales grupos de algas microscópicas unicelulares
Fuente: Madigan y otros (ob. cit)

2.4.5. Morfología de los virus: Como se especificó anteriormente, es un parásito obligado, infeccioso, acelular, de tamaño muy diminuto, inferior a 0,1 μm , que solo puede ser observado por microscopio electrónico. La mayoría de los virus estudiados tienen un diámetro de entre 10 y 300 nanómetros (1 nm = 10^{-9} m). Algunos *Filovirus* tienen un tamaño total de hasta 1400 nm, sin embargo, solo miden unos 80 nm de diámetro.

Su morfología la define la estructura de las cápsides, las cuales van desde capsómeros helicoidales, icosaédricos hasta estructuras adicionales como una pared exterior compleja.

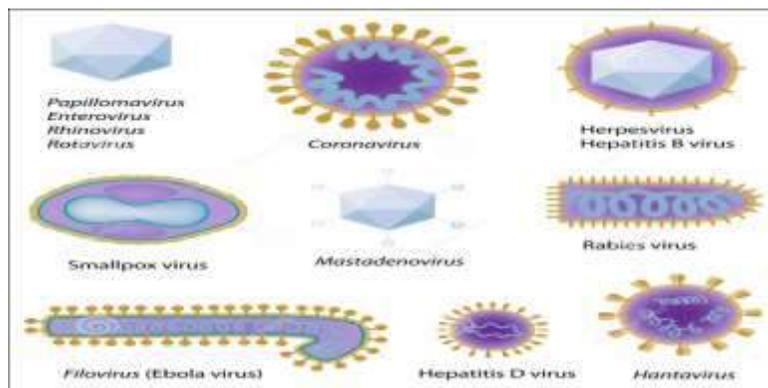


Figura 46. Morfología de virus comunes
Fuente: Shors (2009)

2.5. Agrupaciones bacterianas:

2.5.1. Oval o esférica:

- . Solas: Inicio celular. Algunos micrococcos.
- . Diplococos: En pares y se dividen en dos planos. Ejemplo: *Streptococcus pneumoniae*.

- . Estreptococos: En cadenas y se dividen en planos paralelos. Ejemplo: *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*.
- . Tétradas o tetracocos: Cuatro células. Su división es en dos planos perpendiculares. Ejemplo: *Pediococcus cerevisiae*, *Graffkya tetragena*.
- . Estafilococos: Irregular o racimos, formando una red. Es de división fortuita, en tres planos irregulares. Ejemplo: *Staphylococcus aureus*.
- . Sarcina: Agrupación cuboidal de 8 a 16 células. Se presentan en tres planos perpendiculares. Ejemplo: *Sarcina ventriculi*.

2.5.2. Bacilar o bastón:

- . Solas o aislados
- . Estreptobacilos: En cadenas, adosados a lo largo formando una agrupación en empalizada (*Haemophilus*). Pueden quedar adheridos por sus extremos y tomar apariencia de letras chinas (*Corynebacterium*).

REFERENCIAS CONSULTADAS

- Gamazo, C; López, I y Díaz, R. 2005. *Manual práctico de microbiología*. (3ra. Ed). España: MASSON, S.A. 102p.
- King, H. 2005. *The History of the Telescope (1955 – 2003)*. EEUU: Courier Dover Publications. 480p.
- Lafranconi. M. s/f. *Historia de la Microscopía. Introducción a la Biología*. Universidad Nacional de Mar de Plata. [documento en línea]. En: https://www.mdp.edu.ar/exactas/biologia/grupos/version%201_1/Practicos/archivo/049_055_LECTURA_Microscopia.pdf. [Consulta: Marzo 2, 2019].
- Madigan, M; Bender, K; Buckley, D; Matthew, W; Stahl, D; Dale, T y Martinko, J. 2015. *Biología de los microorganismos*. (14ª. Ed). EEUU: Pearson. 2830p.
- Montoya, H. 2008. *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. (2da. Ed). Colombia: Editorial de Universidad de Antioquia. 282p.
- Moreno, E. 1988. *Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados*. (1ra. Ed.). México: Universidad Autónoma de México. 109p.
- Pérez, V. 2012. *Guía práctica de Microbiología General*. UNELLEZ – VIPI. Programa Ciencias del Agro y del Mar. Venezuela: San Carlos. 110p.
- Reynoso, M; Magnoli, C; Barros, G y Demo, M. 2015. *Manual de microbiología general*. (1ra. Ed). Argentina: Universidad Nacional de Río Cuarto. 105p.
- Rodríguez, E; Gamboa, M; Hernández, F y García, J. 2005. *Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio*. (1ra. Ed). Costa Rica, San José: Editorial Universidad de Costa Rica. 480p.

Rodríguez, L y Salazar, M. 2014. *Manual de prácticas de laboratorio: Biología general*. Costa Rica: ENEUD. 188p.

Shors, T. 2009. *Virus: Estudio molecular con orientación clínica*. España: Editorial Panamericana, S.A. 668p.

Tortora, G; Funke, B y Case, C. 2007. *Introducción a la microbiología*. Argentina: Ed. Médica Panamericana. 959p.

CAPÍTULO III

CRECIMIENTO MICROBIANO

INTRODUCCIÓN

Estudiar el crecimiento microbiano es un aspecto fundamental para esta ciencia debido a que no sólo es evaluar la cinética de masificación celular, sino establecer principios sobre los factores que influyen en su desarrollo y la forma como inhibir y/o destruir ese conglomerado de agentes biológicos, en función a las necesidades que se tienen con ellos. Si la intención es evitar desarrollo microbiano, es interesante aplicar estrategias de barreras para hacerlo, en función a combinaciones inteligentes de diferentes factores que permitan minimizar su crecimiento; por el contrario, si la finalidad es generar biomasa o conversiones biológicas favorables en el proceso, entonces se proporcionan agentes físicos, químicos y/o biológicos que maximicen los efectos sobre la ecología del ambiente en el que se desarrollen y así lograr los resultados esperados.

Para un estudiante de ingeniería y tecnología de alimentos es clave dominar este conocimiento por ser el estudio del crecimiento microbiano el eje del control del desarrollo de las distintas especies; por ello se hace un bosquejo de lo que representa la curva de crecimiento, los métodos de determinación de poblaciones microbianas, las técnicas para aislar especies microbianas, para así posteriormente, involucrarse en los mecanismos de inhibición y/o destrucción de los mismos.

3.1. Principios básicos del crecimiento microbiano

En microbiología la palabra crecimiento se define como un incremento en el número de células, en la que se convierte en una función esencial de la vida celular, por tener un período de vida finito y la especie se mantiene como resultado del aumento continuo de la población (Madigan y otros, 2015). Este conocimiento de cómo las poblaciones microbianas se amplifican rápidamente, es muy útil para el diseño de métodos de control de crecimiento de las especies para determinar las estrategias a aplicar en función a la inhibición y /o destrucción de las mismas, o para favorecer su desarrollo.

El crecimiento microbiano como tal, constituye un aumento en la masa de células y no cambios en un organismo individual, denotando un incremento del número o de la población, por encima del inóculo original. Este aumento responde a una progresión geométrica de base dos, por lo que al iniciar desde una célula madre resultarían:

$$\text{Célula madre: } 2 \longrightarrow 2^2 \longrightarrow 2^3 \dots 2^{n+1}$$

Este crecimiento surge por la necesidad del microorganismo de multiplicarse, debido a que representa una máquina sintética de componentes, cuyos procesos bioquímicos suponen múltiples reacciones, producto de la transformación de la energía; además de biosíntesis de pequeñas moléculas, unidades básicas de macromoléculas, así como los diversos cofactores y coenzimas necesarias para las reacciones enzimáticas. Este proceso sucede fundamentalmente en procariotas, donde las principales reacciones celulares sintéticas consisten en reacciones de polimerización, por las que los polímeros (macromoléculas) se forman a partir de monómeros, y una vez que se fabrican se da el ensamblaje final de estructuras celulares como la pared, membrana citoplasmática, ácidos nucleicos, ribosomas, entre otros. En bacterias al completarse la carga enzimática surge la necesidad de reproducción porque caería en autólisis, por ruptura de la pared celular.

De acuerdo a Madigan y otros (ob. cit), otro factor en la multiplicación de las procariotas son las proteínas, que instituyen en la célula un aparato de división llamado divisoma o mesosoma, cuya formación comienza con un anillo alrededor del cilindro celular hacia el centro de ella. En este proceso ocurre luego de la duplicación del DNA (Ácido desoxirribonucleico), en función al progreso de la elongación celular, donde las dos copias del cromosoma se separan y cada uno termina en una célula hija.

Igualmente se suscita la biosíntesis de peptidoglicano, en el que interviene un transportador lipídico llamado bactoprenol, que es un alcohol muy hidrofóbico que se une a la unidad precursora del peptidoglicano, siendo ella el N-acetilglucosamina/N-acetilmurámico/peptapéptido. De esta manera el bactoprenol se conecta con enzimas que insertan los precursores en el punto de crecimiento de la pared celular y catalizan la formación de enlaces glicosídicos.

3.2. Crecimiento de las poblaciones

El crecimiento se representa también como un incremento de la masa celular; es decir, biomasa, donde la velocidad de ampliación experimenta un cambio en el número, en función al tiempo, en el que los componentes de los organismos se duplican y se suscita una generación en un intervalo de período. Estos tiempos de generación varían por cada especie microbiana, donde unas, como la *Escherichiacoli*, se divide en un intervalo de 17 a 20 minutos, mientras que otras pueden tardar hasta 1 a 3 horas, en función a las condiciones físicas, químicas y biológicas del ambiente en el que se desenvuelven.

En este aspecto, el crecimiento de las poblaciones microbianas responde a un incremento exponencial, cuya velocidad de aumento de células es inicialmente lento, pero se incrementa cada vez más con el tiempo. Es inicialmente lento porque la flora microbiana se está adaptando a las condiciones del ambiente, para que una vez que lo haya hecho, pueda entonces desarrollar los metabolitos primarios y secundarios dentro del medio, trayendo como consecuencia cambios favorables o no. Un ejemplo se puede vislumbrar en la leche, la cual estando no estéril, se puede dejar en condiciones que favorecen el desarrollo microbiano unas cuantas horas, en el que en las primeras fases del crecimiento exponencial, el efecto no es muy relevante; mientras que si se deja durante el mismo tiempo en dicha fase, el resultado podría ser desfavorable, con cambios en las condiciones organolépticas y nutritivas del producto.

Tomando en cuenta que el aumento de células que se produce en un cultivo responde a una progresión geométrica de base dos, existe una relación directa entre el número de células presentes inicialmente en el medio y las finales, en función del tiempo, tras un período de crecimiento exponencial, representado por:

$$N = N_0 2^n \text{ (Ec. 4)}$$

donde: N es el número final de células; N_0 es el número inicial, y n el número de generaciones que han ocurrido en un tiempo previsto.

Por ser de crecimiento exponencial, es necesario hacer transformaciones de la ecuación anterior:

$$\log N = \log N_0 + n \log 2$$

$$\log N - \log N_0 = n \log 2$$

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N - \log N_0}{0,301} \text{ (Ec. 5)}$$

$$n = 3,3(\log N - \log N_0)$$

Por otro lado se determina también el tiempo de generación (G), el cual representa los minutos requeridos para que la célula se divida, no siendo siempre el mismo para una misma especie bacteriana sometida a distintas condiciones. Puede calcularse mediante la siguiente expresión:

$$G = \frac{t}{3,3 \log(N/N_0)} = t/n \text{ (Ec. 6)}$$

donde: t es el intervalo de tiempo entre la medida del número de células que hay en la población en un momento dado de la fase logarítmica (N_0), y luego en otro punto posterior correspondiente al tiempo (N).

Los datos experimentales que se necesitan para calcular el tiempo de generación son:

- . El número de bacterias presentes al principio; es decir, el inóculo.
- . El número de bacterias presentes al final de un intervalo de tiempo dado.
- . El tiempo del intervalo.

Para ilustrar el cálculo se presenta un primer ejemplo, tomado de Madigan y otros (ob. cit), en el que se presenta una población final de $1,0 \times 10^8$, y una población inicial de 5×10^7 unidades formadoras de colonias, en un intervalo de tiempo de 2 horas. Se tiene entonces que para determinar el tiempo de generación (G) se hace:

Datos: $N_0 = 5 \times 10^7$; $N = 1 \times 10^8$; $t = 2$ horas

$$G = t/n$$

$$n = 3,3[\log 10^8 - \log(5 \times 10^7)] = 3,3(8 - 7,69) = 3,3(0,301) = 1 \text{ generación}$$

$$G = 2 \text{ horas}/1 \text{ generación} = 2 \text{ horas/generación.}$$

Ejemplo 2: Se tienen 1000 bacterias en un medio de cultivo óptimo y después de 4 horas de incubación, creciendo exponencialmente, se obtienen 100.000 bacterias. Calcule el tiempo de generación.

Datos: $N_0 = 1 \times 10^3$; $N = 1 \times 10^5$; $t = 4$ horas

$$G = t/n$$

$$n = 3,3[\log 10^5 - \log 10^3] = 3,3[\log(10^5/10^3)] = 6,6 \text{ generaciones}$$

$$G = 4 \text{ horas}/6,6 \text{ generaciones} = 240 \text{ minutos}/6,6 \text{ generaciones} = 36,36 \text{ min/generación}$$

Otro índice es la constante de la velocidad de crecimiento (K), expresada como:

$$K = \ln 2/G = 0,692/G$$

Tiene unidades de medida de horas^{-1} ; por lo que mientras G es una medida del tiempo que tarda una población de duplicarse, K es una medida del número de generaciones que ocurren por unidad de tiempo en un cultivo exponencial. Este conocimiento es esencial para optimizar las condiciones de cultivo de un microorganismo particular y también para probar el efecto (positivo o negativo) de algún tratamiento sobre el cultivo bacteriano.

3.3. Técnicas para determinar crecimiento microbiano:

- 3.3.1. Recuento en placas.
- 3.3.2. Valoración turbidimétrica.
- 3.3.3. Recuento directo al microscopio.
- 3.3.4. Recuento directo mediante contadores electrónicos.
- 3.3.5. Conteo por filtros de membrana.
- 3.3.6. Determinación del contenido de nitrógeno.
- 3.3.7. Determinación por peso húmedo y seco celular.
- 3.3.8. Determinación por cambios químicos del medio.
- 3.3.9. Contaje por múltiples tubos.
- 3.3.10. Métodos rápidos de determinación.

3.3.1. Recuento en placas

Consiste en hacer la siembra en una placa de Petri limpia y estéril para que en ella, luego de un período de incubación se puedan obtener las colonias de microorganismos y luego hacer el contaje respectivo. Entre ellas se tienen:

3.3.1.1. Siembra en superficie: Se tiene la placa de Petri con el agar incorporado, en el que ambos deben estar limpios y estériles. Sobre esta planicie se incorpora el inóculo microbiano y posteriormente se extiende para así separar las células y cada una de ellas forme su conglomerado de colonias. El procedimiento es el siguiente:

a. Preparar diluciones de la muestra: Esta muestra puede ser de procedencia líquida, sólida o semisólida. El fundamento de este proceso de dilución es reducir la población microbiana proveniente de la muestra hasta niveles cuantificables, de forma tal que se puedan emitir cantidades y así comparar con las normativas vigentes de cada país. El proceso consiste en sembrar la muestra en líquidos que pueden ser: agua peptonada (0,1%), caldo nutritivo, solución buffer – fosfato, o en medios de enriquecimiento.

Al hacer diluciones, lo que se quiere es reducir la población diez veces ($0,1 = 10^{-1}$), cien ($0,01 = 10^{-2}$), mil ($0,001 = 10^{-3}$), e inclusive hasta diez millones si es necesario; todo depende de la carga microbiana que se sospecha tener en la muestra. Por lo general se llega hasta 10^{-5} , máximo hasta 10^{-7} .

a.1. Si la muestra es sólida o semisólida: Se diluye bajo la relación peso/volumen (p/v: muestra /diluyente) en cantidades de: 50/450; 25/225; 20/180; 11/99; 10/90; 1/9 (todo ello depende del peso de la muestra). Por ejemplo, si la muestra pesa más de 50 gramos se tomaría las dos primeras, por el contrario, si es de bajo peso, podrían tomarse de la tercera en adelante. En este momento se estaría preparando la dilución 10^{-1} , es decir, reduciendo diez veces la muestra. Se recomienda tomar de varios puntos de la muestra,

preferiblemente reduciendo su tamaño y mezclando, por supuesto, en un equipo limpio y estéril, como un molino o un cortador, entre otros.

Para preparar la dilución 10^{-2} , se podría tomar una alícuota de 10ml y agregar en 90 ml de diluyente, o hacer la relación 1/9. De esta manera se estaría reduciendo la población cien veces. Para 10^{-3} , se tomaría 10/90, o 1/9. Así se continuaría hasta llegar a lo que se estima necesario, todo ello en función de la carga microbiana que se sospecha en la muestra.

Muestra...10⁻¹(50/450;25/225;20/180;11/99;10/90;1/9) ...10⁻²(10/90;1/9) ...10⁻³(10/90;1/9) ...

Una forma que permite economizar material de trabajo y tiempo, es preparar diluciones por intermedios, la cual consiste en lo siguiente:

Muestra...10⁻¹(50/450;25/225;20/180;11/99;10/90;1/9) ...10⁻³(1/90;0,1/9) ...10⁻⁵(1/90;0,1/9) ...

a.2. Si la muestra es líquida: Se diluye bajo la relación volumen/volumen (v/v: muestra/diluyente) en cantidades de 20/180; 11/99;10/90;1/9 (todo ello dependiendo del volumen de la muestra). Si es un volumen alto se tomaría 20 ml, previa agitación para homogeneizar. Si no hay forma de homogeneizar por ser un volumen muy alto; ejemplo, en una piscina, se recomienda tomar alícuotas de varios puntos.

Muestra...10⁻¹(20/180;11/99;10/90;1/9) ...10⁻²(10/90;1/9) ...10⁻³(10/90;1/9) ...

Al igual que en la muestra sólida y semisólida, se pueden hacer preparaciones intermedias para ahorrar material y tiempo, además de organizar mejor el trabajo.

Muestra...10⁻¹(20/180; 11/99;10/90;1/9) ...10⁻³(1/90;0,1/9) ...10⁻⁵(1/90;0,1/9) ...

b. Distribuir inóculo en el medio de cultivo: Consiste en agregar 0,1 ml de alícuota por dilución en la placa de Petri con agar solidificado, iniciando de la menor concentración a la mayor de ellas. La norma nacional (COVENIN), como muchas internacionales, alineadas con la ISO (en español: Organización Internacional de Estandarización), recomiendan hacer siembras en cinco placas por dilución, para de esta forma tener el suficiente apoyo estadístico y dar mayor confianza en los resultados obtenidos. Es importante tomar en cuenta emplear materiales limpios y estériles, además de un adecuado manejo de los mismos para evitar contaminación cruzada.

Luego de ello se hace la extensión del volumen agregado de la dilución con una varilla angular de vidrio, previamente embebida en alcohol y encendida en el mechero, para así esterilizarla. Dicha extensión no es más que desplazar este dispositivo de vidrio por toda la superficie del agar solidificado, apoyándose en la rotación de la placa y de la varilla para un mayor aprovechamiento del área.

c. Incubación: Una vez sembrada las placas se introducen en una estufa a una temperatura de 37 °C, por un espacio de 24 horas. En este tiempo y a esta condición óptima de temperatura se van a desarrollar las células microbianas y formarán sus colonias respectivas.

d. Determinación de las unidades formadoras de colonias por gramo o por mililitro (ufc/g o ml), dependiendo de la naturaleza de la muestra: Se hace contaje por dilución de cada placa para luego establecer un promedio y así calcular las ufc/g o ml. Para ello se procede a aplicar la siguiente fórmula:

$$\frac{ufc}{(g \text{ o } ml)} = \frac{N_{colonias}}{Dilución} \times 10 \text{ (Ec. 7)}$$

Tabla 9. Resultados del contaje de colonias por dilución en una muestra de queso

Dilución	Placa	Nº colonias	Promedio	Ufc/g (*)
10 ⁻¹	1	278	256,6	256,6 x (1/10 ⁻¹)x10 =
	2	299		256,6 x 10 ² =
	3	245		2,56 x 10 ⁴ =
	4	234		25.660
	5	227		
10 ⁻²	1	33	34,4	34,4 x (1/10 ⁻²) x 10 =
	2	40		34,4 x 10 ³ =
	3	36		3,44 x 10 ⁴ =
	4	34		34.400
	5	29		
10 ⁻³	1	4	4,4	4,4 x (1/10 ⁻³) x 10 =
	2	3		4,4 x 10 ⁴ =
	3	3		44.000
	4	5		
	5	7		

Fuente: Estimaciones del autor

Ejemplo: Si se tienen los siguientes resultados por dilución según la tabla 9, se procedería a establecer los promedios de colonias por dilución para luego hacer el cálculo respectivo según la fórmula anterior. Es importante acotar que la norma contempla que en contaje de bacterias, cuando supera las 300 colonias, se reporta de una vez incontable; mientras que en mohos y levaduras cuando supera las cien (100).

e. Comparar resultados con la normativa legal vigente: No es más que en función al resultado obtenido consultar con la norma del país para definir la aptitud del producto; es decir, para decidir si está apto para su consumo o para su procesamiento en caso de ser una materia prima. De esta forma se puede asegurar a

los consumidores y/o usuarios sobre la calidad del producto y que no represente un peligro de brote e intoxicación alimentaria.

3.3.1.2. Siembra en profundidad: Es una técnica en la que se incorpora 1 ml de las diluciones, pudiéndose hacer de dos maneras:

a. Incorporando 1 ml del inóculo a la placa de Petri: Se tiene la placa limpia y estéril, para sobre ella incorporar 1 ml de la dilución. Posteriormente se adiciona el agar, el cual debe estar en un tubo de ensayo dentro de un baño María para que se mantenga líquido, dado que a temperaturas inferiores a los 45 °C solidifica. Es importante tomar en cuenta que al momento de retirar de este baño el agar hay que esperar a que enfríe o tomarse la tarea de enfriarlo hasta temperaturas cercanas a los 50 °C.

Si se dispone de un ambiente estéril, como un espacio de flujo laminar, se puede incorporar un termómetro y medir; de lo contrario se tiene como práctica palpar el tubo y luego llevarlo a una zona sensible del cuerpo humano, como por ejemplo las mejillas, y si el individuo soporta la temperatura del momento, es un indicio de que está cercana o por debajo de esta referencia, por lo tanto, se puede versar en la placa con el inóculo. Se hace rotación de la placa y así distribuir el material biológico en el medio de cultivo. Se lleva a incubación a 25 hasta 37 °C por 24 horas, dependiendo el objetivo de la búsqueda microbiana (para hongos 25 °C, para bacterias 37 °C). Se hace el contaje para determinar ufc/g o ml.

b. Incorporando 1 ml de la dilución en doble capa: Una modalidad especial de siembra en profundidad es la de doble capa, tal como se hace para determinar coliformes totales y fecales en una o más muestras. En este caso se incorpora 1 ml de la dilución, luego 8 ml del agar violeta rojo bilis, se hace la rotación, se deja solidificar y posteriormente se agregan los 7 ml restantes contenidos en el tubo de ensayo. Se rota de nuevo, se deja solidificar y se incuba a 37 °C. Se hace el contaje respectivo.

c. Incorporando el material biológico por dilución en un tubo de ensayo con el agar: Este procedimiento se conoce como la técnica de la placa vertida, el cual consiste en agregar 1 ml de la dilución sobre el agar que está contenido en el tubo de ensayo, para agitarlo con movimientos suaves y luego incorporarlo a una placa de Petri limpia y estéril. Posteriormente se hace la rotación de la misma, se deja solidificar y se incuba en una estufa a la temperatura correspondiente, que generalmente es 37 °C por espacio de 24 horas. Si el objetivo es cuantificar mohos y levaduras, se deja a temperaturas cercanas a los 25 °C.

Independientemente del método empleado se hace la determinación de las ufc/g o ml, aplicándose la siguiente expresión matemática:

$$\frac{ufc}{(g \text{ o } ml)} = \frac{N \text{ colonias}}{Dilución} \quad (\text{Ec. 8})$$

En este caso particular de la expresión matemática, no se hace la multiplicación por diez, debido a que se emplea un mililitro y no el volumen en la siembra en superficie, en la que 0,1 ml es suficiente para el espacio que ofrece la placa de Petri, cuyo diámetro es de 9,0 a 9,2 cm. El procedimiento del cálculo es el mismo que la siembra en profundidad, a diferencia de la multiplicación por el factor 10.

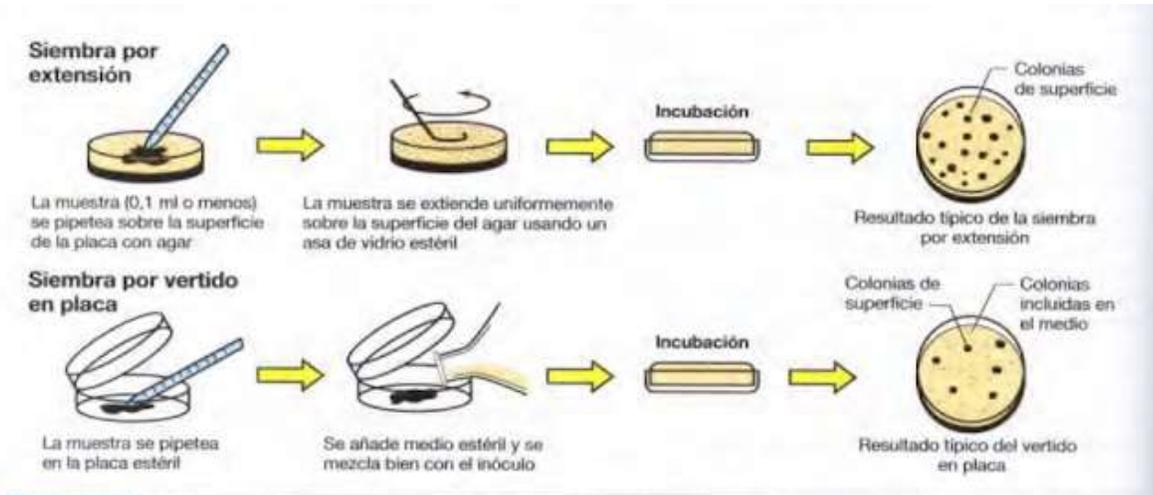


Figura 47. Procedimiento para siembra en superficie y en profundidad
Fuente: Reynoso y otros (2015)

3.3.2. Valoración turbidimétrica

Es una técnica en la cual se hacen valoraciones microbiológicas en función a la turbidez que puedan tener los medios líquidos de cultivo empleados en la siembra. Es una determinación aproximada de la cantidad de células en caldos, cultivos o suspensiones acuosas; en el que la luz absorbida por el equipo denominado colorímetro fotoeléctrico o espectrofotómetro, refleja la concentración de microorganismos presentes en un cultivo y detecta la luz no dispersada.

Su fundamento se basa en la capacidad de las células y partículas en general de absorber y/o dispersar la luz que incide sobre ellas. Cuanto mayor sea el número de células mayor es la turbidez del cultivo, la densidad óptica (D.O.) y menor la cantidad de luz no dispersada que emerge tras atravesar la muestra. La D.O. del cultivo es pues proporcional a la densidad celular; es por ello que un cultivo celular aparece turbio porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión, siendo proporcional al número de células.

Inicialmente se debe calibrar el equipo con agua destilada para obtener un ajuste del 100% de reflejo de luz, y de esta forma poder tener garantía de los resultados al introducir el vial correspondiente o tubos de ensayo con los líquidos sobre los que se hizo la siembra y de esta manera observar en la escala el número de células por mililitro. Se tiene como referencia que cuando un medio está muy turbio es porque hay entre 10^7 a 10^8 células/ml.

En un primer momento se puede tomar la muestra y llevar directamente al equipo para obtener un acercamiento a la cantidad de microorganismos presentes, sin embargo, lo ideal es hacer siembras en caldos,

mediante transferencias de cultivos, para así reducir la población a términos cuantificables y luego multiplicar por la dilución correspondiente. De esta manera se pudiese estimar con menor margen de error los valores presentes por generar menor turbidez y hacer reflejar mejor la luz absorbida.

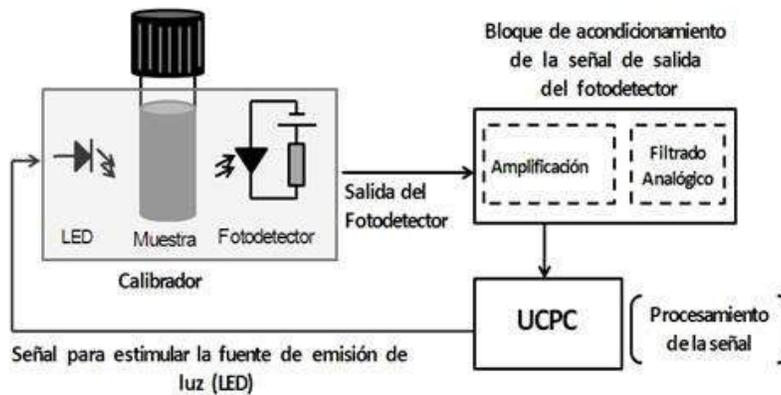


Figura 48. Valoración turbidimétrica del cultivo

Fuente: Acebo y Hernández (2012)

3.3.3. Recuento directo al microscopio:

Se determina directamente el número de células contándolas al microscopio con la ayuda de cámaras especiales que albergan un volumen conocido de líquido (Hemocitómetros, Cámara de Petroff- Hausser) (Tortota y otros, 2007). Presenta algunas limitaciones:

- . No se pueden distinguir las células vivas de las células muertas.
- . Las células muy pequeñas son difíciles de contar.
- . La precisión es difícil de lograr
- . El método no es adecuado para suspensiones celulares de baja densidad, es decir las soluciones deben contener aproximadamente 10^7 células/ml o más.

En el recuento directo al microscopio utilizando la cámara de Petroff-Hausser, la suspensión de la muestra se coloca en la cavidad cuadrículada de dimensiones conocidas de la cámara, y se tapa con el cubre objetos. Como se conoce el área de las cuadrículas y la altura de la cámara de recuento, el volumen ocupado por la suspensión en cada cuadrícula queda determinado. Por tanto, para obtener el número de bacterias por mililitro de suspensión, todo lo que se requiere es contar el número de microorganismos en varias de ellas y así calcular el promedio de recuento por cuadrícula y multiplicar este promedio por el factor correspondiente.

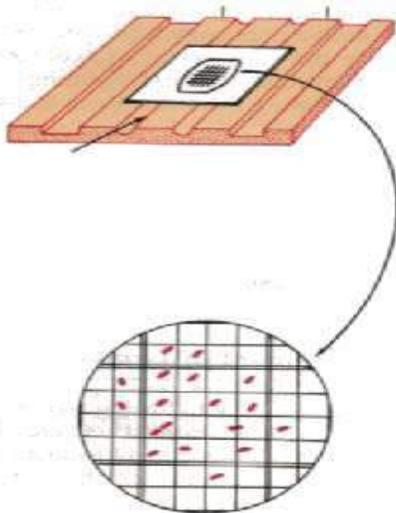
Por otra parte se puede emplear un microscopio calibrado sobre la platina con cuadrículas de tamaños entre 0,01 a 0,1 mm. Se procede a contar el número de segmentos de 0,01 mm para luego calcular el factor microscópico (FM):

$$FM = \frac{10000}{\pi r^2} \quad (\text{Ec. 9})$$

Se procede a determinar el contaje microscópico de células por mililitro (CMC/ml):

$$\frac{CMC}{ml} = FM \times N \quad (\text{Ec. 10})$$

donde N: es el número promedio de agrupaciones por campo microscópico



El retículo del fondo está dividido en 25 cuadrados (cada uno tiene 16 cuadrados más pequeños).

Volumen de la cámara = 0,02 mm³

Área de la cámara = 1 mm²

Para calcular el número de células por ml de muestra:

. Se cuentan todas las células de cuadros grandes y se establece un promedio por cuadro = 12

12 x 25 = 300 (número de células en 0,02 mm³)

300 x 50 = 15000 (número de células en 1 mm³)

15000 x 1000 = 1,5 x 10⁷ células/ml

Figura 49. Cámara de Petroff – Hausser

Fuente: Gamazo y otros (2005)

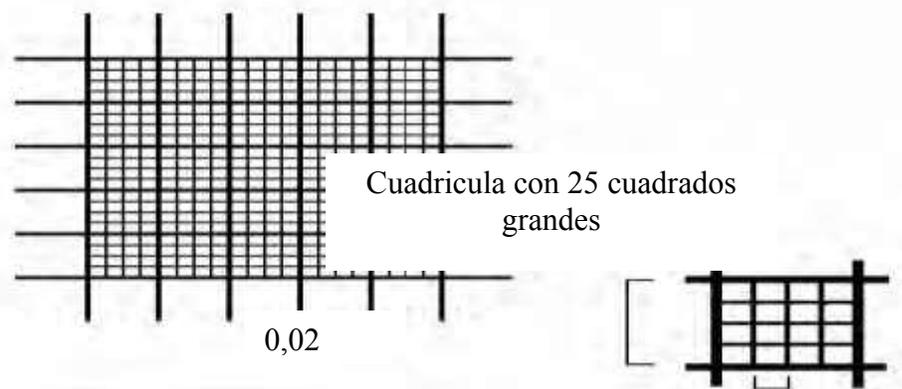


Figura 50. Contaje directo al microscopio

Fuente: Gamazo y otros (ob. cit)

Lo más conveniente es aplicar la ecuación siguiente:

$$\frac{\text{Número total de microorganismos}}{\text{ml}} = \frac{\text{Bacterias contadas} \times \left(\frac{1}{\text{Dilución}}\right)}{\text{N}^\circ \text{ cuadrados contados} \times \text{Volumen del cuadrado}} \quad (\text{Ec. 11})$$

Tipo de cuadro	Área (cm ²)	Vol (ml)	Factor (1/Vol)
Cuadrado total	1,0 x 10 ⁻²	2,0 x 10 ⁻⁵	5,0 x 10 ⁴
Cuadrado grande	4,0 x 10 ⁻⁴	8,0 x 10 ⁻⁷	1,25 x 10 ⁶
Cuadrado pequeño	2,5 x 10 ⁻⁵	5,0 x 10 ⁻⁸	2,0 x 10 ⁷

3.3.4. Recuento directo mediante contadores electrónicos

Los contadores electrónicos diseñados para contar glóbulos rojos se pueden usar para este fin. Esencialmente un contador electrónico consta de dos cámaras que están separadas por un material que no conduce la corriente, en este material no conductor hay un orificio de un tamaño similar al de las células a ser contadas. Cada cámara contiene un electrodo, la suspensión de células a ser contadas se coloca en una de las cámaras y se aplica presión para que las células pasen a la otra cámara a través del orificio, cada vez que una célula pasa a través del orificio ocasiona un cambio en la conductividad eléctrica que es registrado por un dispositivo electrónico y de esta manera el contador indica el número de células en esa suspensión.

Las limitaciones de este método son las siguientes:

- . Se cuentan células vivas y muertas.
- . Las suspensiones deben estar libres de partículas diferentes a los microorganismos que se están contando por que el aparato no puede distinguir entre una u otra.

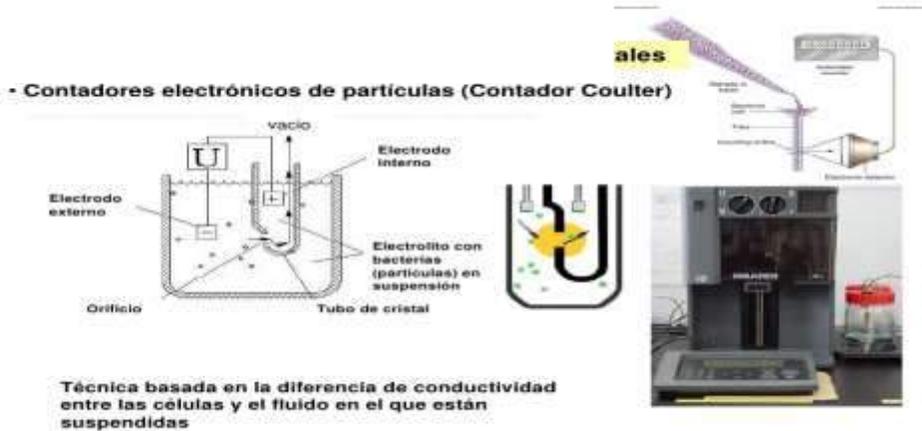


Figura 51. Contador electrónico de partículas Coulter

Fuente: Pommerville (2017)

3.3.5. Conteo por filtros de membrana

Se usa para suspensiones diluidas de bacterias. Se hace pasar un gran volumen de suspensión a través de una membrana de nitrocelulosa estéril, que retiene las bacterias. Este volumen está por el orden entre 100 a 500 ml de muestra. El filtro puede tener diámetros de 0,2 a 0,45 µm. Posteriormente, el filtro se deposita sobre la superficie de un medio de cultivo sólido y se incuba a una temperatura adecuada, generalmente 37 °C para bacterias. Las colonias se forman sobre el filtro y se cuentan, deduciéndose la concentración original en función del volumen de suspensión que se hizo pasar por el filtro. Para el cálculo del contaje microscópico de células por mililitros (CMC/ml) o microorganismos totales se aplica la siguiente expresión matemática:

$$\frac{CMC}{ml} = \frac{N^{\circ} \text{ colonias} \times 100}{\text{Volumen de muestra filtrada}} \quad (\text{Ec. 13})$$

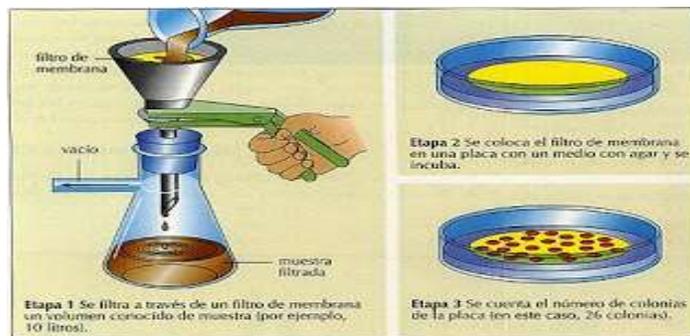


Figura 52. Conteo de microorganismos por filtros de membrana

Fuente: López (2015)

3.3.6. Determinación del contenido de nitrógeno:

Es una técnica muy aplicada en el área de investigación sobre metabolismo microbiano, para poblaciones concentradas, tomando como base que la proteína celular contiene 14% de nitrógeno seco. Se realiza en muestras libres de otra fuente de nitrógeno, empleando el equipo de micro-Kjeldahl, en el que se puede también obtener medidas de consumo de nutrientes o de producción de algún metabolito por unidad de tiempo como consumo de oxígeno (QO₂), y consumo de dióxido de carbono (QCO₂), producción de ácidos, entre otros).

3.3.7. Determinación por peso húmedo y seco celular:

3.3.7.1. Determinación del peso húmedo:

Es un método muy aplicable a organismos unicelulares (levaduras y bacterias) y hongos filamentosos de densas poblaciones. Para ello se emplea una centrífuga que permite eliminar el sobrenadante y luego se determina el peso del sedimento celular. Entre las desventajas se tiene que genera errores por retención del líquido intercelular en este equipo de altas revoluciones, pero es un método que permite determinar densidades por encima de 10⁷ células/ml.

3.3.7.1. Determinación del peso seco:

Es un método similar al anterior con la diferencia que el sedimento se seca antes de ser pesado, a temperaturas de 105° C por espacio de 12 horas o hasta tener peso constante. Las medidas de peso seco suelen representar el 10- 15% de los valores de peso húmedo. Permite determinar poblaciones altas, aunque es un método muy tedioso que requiere mucho tiempo. Se estima que 1 mg de peso seco equivale a aproximadamente 5×10^9 células.

3.3.8. Determinación por cambios químicos del medio:

Los microorganismos dan respuestas metabólicas a determinados sustratos, en función a las exoenzimas y endoenzimas que son capaces de producir. Tomando en cuenta este factor biológico se inoculan en medios de cultivo con sustratos específicos, en lo que los ensayos bioquímicos tradicionalmente usados, llamados pruebas bioquímicas convencionales son intentos simples que evidencian en forma rápida una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o determinada vía metabólica, crecimiento en presencia de inhibidores, entre otros.

No significan de ninguna manera un estudio profundo del metabolismo bacteriano, simplemente son medidas de la actividad bioquímica de la célula, que expresan valoraciones microbiológicas, en función al nivel de cambio que generan en el sustrato. Ejemplo: si en un sustrato rico en azúcares hay una fermentación ácido láctica, es posible que la densidad de bacterias responsables, como *Lactobacillus*, sea elevada, por encima de 10^7 células/ml.

Estas determinaciones bioquímicas pueden agruparse según los tipos de ensayo, siendo ellos: por enzimas respiratorias, por metabolismo de hidratos de carbono, por uso de compuestos nitrogenados, por pruebas de crecimiento, por sensibilización a antimicrobianos o antisépticos, por detección de pigmentos.

3.3.9. Contaje por múltiples tubos: Son pruebas que se realizan para determinar presencia de enterobacterias en muestras líquidas. Se pueden hacer siguiendo dos procedimientos fundamentales: Técnica del número más probable (NMP) o por pruebas revelativas.

3.3.9.1. Por número más probable: Conocida también como técnica del número más probable por emplearse de tres a cinco tubos por dilución de la muestra. Se fundamenta en que, en una serie de diluciones de la muestra sembradas en tubos con medio líquido, para que se observe desarrollo en el tubo debe por lo menos haber una célula en el inóculo sembrado. Con este sistema y aplicando análisis probabilístico según las diluciones y cantidades de tubos de la serie usada (triplicado, quintuplicado u otras variantes) se construyen tablas del NMP/100 ml de muestra, que se puede calcular con un 95% de confianza para cada una de las situaciones numéricas de la serie usada (Tabla 10).

Es una técnica muy empleada para el análisis de coliformes totales y fecales en agua y bebidas. Para ello se procede en cuatro etapas: a) Análisis presuntivo; b) Análisis confirmativo; c) Aislamiento selectivo; d) Identificación bioquímica.

a. Análisis presuntivo: Consiste en sembrar las diluciones previamente preparadas, según el protocolo para líquidos descrito anteriormente y luego agregar, bien sea en tres o cinco tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptosa (CLST), de acuerdo a la disponibilidad del analista. Se denomina así esta prueba porque los resultados positivos que se obtengan podrían ser por posibles coliformes totales y fecales. Faltaría diferenciarlos, además de evaluar, si hay presencia de otras enterobacterias. Se tomará como base el análisis en tres tubos.

. Preparar diluciones: 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} .

. Agregar 1 ml por dilución en tubos con CLST (cada uno de ellos debe contener en su interior un tubo Durham). por 24 horas

. Incubar a 37 °C

. Observar y anotar el resultado de tubos positivos por dilución para ir a la tabla 10. Se considera positivo el resultado en aquellos tubos donde ha habido turbidez y a la vez formación de gas, que queda atrapado en Durham.

Por ejemplo; si el resultado fuese tres positivos para dilución 10^{-1} ; un positivo para 10^{-2} y cero positivos para 10^{-3} , se anotaría (310). Al revisar la tabla el posible efecto por coliformes totales y fecales sería 43 bacterias por cada 100 ml; con un mínimo de 7 y máximo 210 por mililitro, amparado en un nivel de confianza del 95%.

Tabla 10. Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se utilizan 3 alícuotas de 10 ml, 3 de 1 ml y 3 de 0,1 ml.

Número de tubos positivos del total de			Índice del número más probable por 100 ml	Límites de confianza	
3 tubos de 10 ml	3 tubos de 1 ml	3 tubos de 0,1 ml		Inferior	Superior
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	89
2	2	0	21	4	47

2	2	1	28	10	150
2	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
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

Fuente: Reynoso y otros (ob. cit)

b. Análisis confirmativo: En esta segunda fase lo que se quiere es corroborar el resultado anterior y a la vez determinar cuántas son coliformes totales y fecales. Para ello se procede de la siguiente manera:

. De los tubos positivos, sembrar con una asada bacteriológica en Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante (CBVB) y en Caldo de Enriquecimiento para Coliformes (CEC).

. Incubar los tubos con CBVB a 37 °C y los de CEC a 45 °C. La intención es determinar en CBVB la presencia de coliformes totales (CT) y en CEC coliformes fecales (CF). Importante tomar en cuenta que los CT son enterobacterias muy parecidas en su morfología y ellas incluyen a la especie *Escherichia coli*, que es la considerada coliforme fecal. Dentro de las totales, aparte de *E. coli*, se tienen géneros como *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* *Citrobacter*.

. Observar y anotar los tubos positivos tanto para CBVB como para CEC y así establecer el total de CT y de ellas si hay o no CF y en qué cantidad.

Siguiendo con el ejemplo anterior (310), y suponiendo que en CBVB resultaron dos positivos para 10^{-1} ; cero positivos para 10^{-2} , y como en el análisis presuntivo no hubo positivos para 10^{-3} ; quedaría el número en 200, lo que generaría un total de 23 coliformes totales por cada 100 ml, con un mínimo de 4 y un máximo de 120 de ellos. Faltaría determinar cuántas bacterias *E. coli* hay; por lo que para ello se observan los resultados por dilución de los CEC. Suponiendo que el resultado fuese uno en 10^{-1} ; cero en 10^{-2} , y en 10^{-3} cero; implica el número 4 número más probable de CF por cada 100 ml, con un mínimo de 0,5 y un máximo de 20 por mililitro. Quiere decir entonces que 23 CT/100 ml, 4 podrían ser *Escherichiacoli*.

c. Aislamiento selectivo: Consiste en tomar por cada tubo positivo en CBVB y CEC, inóculo para hacer siembra en estrías en placas de Petri con un agar diferencial que puede ser MacKonkey, EMB (en español: eosinato azul de metileno) o Endo. El procedimiento sería:

- . De los tubos positivos de CBVB, tomar con el asa de siembra inóculo y sembrar en placa de Petri. En el caso del ejemplo anterior serían dos placas por obtener dos positivos en 10^{-1} .
- . De los tubos positivos de CEC, tomar con el asa de siembra inóculo y sembrar en placa de Petri. En el caso del ejemplo anterior sería un tubo por obtener un positivo en 10^{-1} .
- . Incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.
- . Observar colonias aisladas y diferenciar por pigmentación. En el caso de colonias típicas de CF, son rojas con el centro un poco más oscuro.

d. Identificación bioquímica: En este apartado se pretende definir la taxonomía de las enterobacterias aisladas, de acuerdo a los protocolos establecidos en la tabla 11. Partiendo de las particulares enzimáticas de los microorganismos, se procede a sembrarlos en determinados ambientes, con características esenciales que van a favorecer el desarrollo o no de las especies en ellos y en función a los resultados obtenidos se va apuntalando hacia su identificación.

En el caso de análisis de coliformes totales y fecales, interesa más determinar la presencia de *E. coli* por ser un microorganismo indicador de calidad del producto, donde la existencia de esta especie podría revelar la coexistencia de otras enterobacterias de interés como *Salmonella spp*, que son un poco más difíciles de determinar por estar en menores cantidades. Es por ello que la norma COVENIN contempla realizar el protocolo de las pruebas IMVIC (Indol, Rojo metilo, Voges – Proskauer y Citrato Simmons), descritas en el capítulo 6. La intención es diferenciar si en los CF hay presencia también de la especie *Enterobacteraerogenes*, que morfológicamente es muy similar a la *E. coli*.

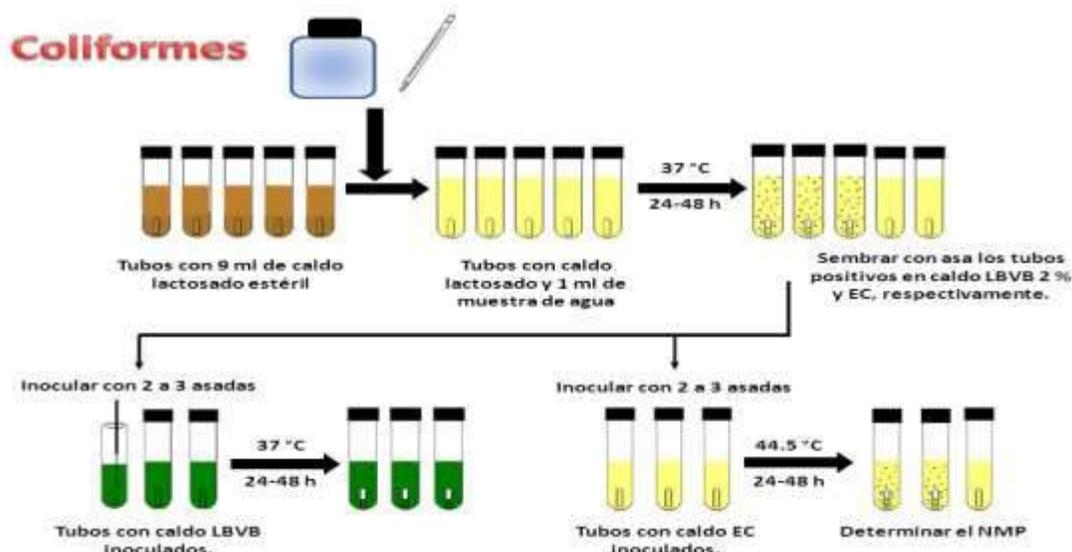


Figura 53. Determinación de coliformes totales y fecales por técnica del número más probable.
Fuente: Montoya (2008)

Tabla 11. Diferenciación bioquímica de las bacterias *E. coli* y *E. aerogenes*

Prueba bioquímica	Resultados	
	<i>Escherichiacoli</i>	<i>Enterobacteraerogenes</i>
Indol	+	-
Rojo metilo	+	-
Voges Proskauer	-	+
Citrato Simmons	-	+

Fuente: Reynoso y otros (ob. cit)

3.3.9.2. Pruebas revelativas: Es una prueba muy similar a la técnica del número más probable, que se emplea para determinar la presencia de enterobacterias en alimentos de naturaleza líquida. Consiste en cuatro etapas fundamentales, siendo ellas: a) Análisis presuntivo, b) Análisis confirmativo, c) Prueba final y, d) Pruebas bioquímicas.

a. Análisis presuntivo: Se realiza para localizar microorganismos capaces de fermentar lactosa con producción de gas, implicando presuntos coliformes. Sin embargo, como existe la posibilidad de que la formación de gas se deba a especies bacterianas no coliformes; es necesario realizar pruebas adicionales.

- . Se siembra la muestra en uno o más tubos, generalmente tres, en caldo lactosado (con tubo Durham).
- . Se incuba a 37 °C por 24 horas.
- . Se observa producción de ácido y gas.

b. Análisis confirmativo: Los cultivos productores de ácido y gas en la prueba anterior, se siembran en medios selectivos y diferenciales como agar MacKonkey, agar EMB o agar Endo, y caldo lactosa bilis verde brillante (CBVB).

- . Se siembran por estrías en placas de Petri de los positivos en Agar Mackonkey, EMB o Endo.
- . Se siembra con asa en el CBVB.
- . Se incuban las siembras a 37 °C.
- . Se observan colonias típicas en las placas, siendo ellas:

Tabla 12. Diferenciación de colonias típicas de las bacterias *E. coli* y *E. aerogenes*

Diferencias	
<i>Escherichiacoli</i>	<i>Enterobacteraerogenes</i>
Colonias pequeñas	Colonias mucoides grandes
Oscuras, con el centro negro	Rosadas, con centros oscuros

Fuente: Reynoso y otros (ob. cit)

En los tubos de CBVB se debe observar producción de gas en el tubo Durham.

c. Prueba final: Se aíslan y se preparan cultivos puros de los organismos que forman colonias típicas en los medios confirmativos, para así demostrar la morfología y fisiología típicas de los coliformes.

. Preparar cultivos puros de colonias típicas de coliformes en caldo lactosado y agar inclinado.

. Observar resultados: La fermentación del caldo lactosa y la demostración de bacilos cortos Gram negativos no esporulados, demuestra la presencia de coliformes.

d. Pruebas bioquímicas: IMVIC para diferenciar *Escherichiacoli* y *Enterobacteraerogenes*.

3.3.10. Métodos rápidos de determinación: Tradicionalmente, el recuento de células viables se ha realizado mediante el método estándar de recuento en placa, que, aunque sencillo, es laborioso, requiere un volumen considerable de tubos de ensayo y medio de dilución, y espacio para el almacenamiento y la incubación de las placas de cultivo. Los métodos rápidos y automatizados en microbiología de los alimentos requieren un tiempo reducido para la obtención de los resultados en comparación con los métodos “convencionales”, y son fáciles de usar, precisos y económicamente rentables.

Para Herranz (2014), esta serie de métodos en microbiología de los alimentos representan un área aplicada en continua expansión, en la que la rapidez en la obtención de resultados es esencial en la industria alimentaria para reducir los tiempos de espera en los procesos de producción y liberar más rápidamente los lotes producidos. Además, la rapidez es fundamental en la agroindustria porque permite la aplicación de acciones correctoras durante el procesado de los alimentos.

Aunque en la actualidad la mayoría de las técnicas rápidas se dirigen a la detección de bacterias, es previsible que se desarrollen nuevos métodos para la identificación de virus y parásitos implicados en la transmisión de enfermedades a través de los alimentos. Se espera que se incorpore el uso de los biosensores en esta industria alimentaria y de los microchips para la detección simultánea de varios patógenos, así como de envases inteligentes que alerten a los consumidores sobre la presencia de microorganismos alterantes o patógenos en los alimentos. Entre ellas se conocen los sistemas miniaturizados y kits de diagnóstico, los métodos inmunológicos y los métodos genéticos.

3.3.10.1. Sistemas miniaturizados y kits de diagnóstico: Son sistemas que permiten reducir el número de reactivos y medios a emplear en los análisis por constituirse en placas microtituladoras. Además de esta ventaja, facilitan el estudio en formato manejable, basados en el metabolismo de sustratos específicos por parte de microorganismos y su detección mediante diversos sistemas indicadores. En cualquier caso, la mayoría de los sistemas citados ofrecen la posibilidad de lectura e interpretación de resultados de manera automática. Dentro de ellos se destacan:

- . Tarjetas desechables para la identificación sencilla de colonias sospechosas mediante pruebas bioquímicas rápidas (O.B.I.S, Oxoid; placas Petrifilm).
- . Galerías que permiten la identificación de más de 800 especies de bacterias y levaduras (API, bioMérieux).
- . Tubos de plástico con compartimentos que contienen agar con distintos sustratos y con una aguja en su interior que posibilita la inoculación del tubo de forma rápida y sencilla a partir de una única colonia (BBL Enterotube y Oxi/FermTube, BD).
- . Soportes plásticos con pocillos de fácil inoculación que contienen sustratos cromogénicos y/o fluorogénicos en estado deshidratado que se rehidran en contacto con la muestra (BD; RapIDsystems y MicroIB, Remel; Biochemical ID systems, Microgen).
- . Sistema automatizado VITEX (bioMérieux) que, basándose en cambios de color de los sustratos o en la producción de gas de los cultivos inoculados en los pocillos de una tarjeta plástica que contiene los sustratos bioquímicos en forma deshidratada, puede identificar un cultivo típico de *Escherichia coli* en 2-4 horas.

	ONPG	ADH	LDC	ODC	[CIT]	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	[GEL]	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
Negativo																					
Positivo																					

Figura 54. Galerías API 20E para identificación de bacterias

Fuente: Hervé (2015)

. Sistema Biolog (AES Chemunex) que detecta la capacidad de los microorganismos para oxidar 95 fuentes de carbono. Los 295 (4×1028) patrones metabólicos posibles permiten, además de la identificación, el establecimiento de relaciones filogenéticas entre distintos aislados. El empleo de un único cromógeno como indicador rédox, el violeta de tetrazolio, que se reduce de forma irreversible a formazán (color violeta) como consecuencia de la actividad metabólica bacteriana, facilita la lectura visual de los resultados.

3.3.10.2. Métodos Inmunológicos: Se basan en la reacción específica entre un antígeno y un anticuerpo policlonal o monoclonal. En microbiología de los alimentos, el método inmunológico más empleado para la detección de microorganismos o sus toxinas es el ensayo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) tipo sándwich, donde en los últimos años, se han desarrollado sistemas que permiten realizar el ensayo ELISA de manera automatizada, dirigidos fundamentalmente a la detección de *Salmonella*, *E.*

coli O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. y toxinas estafilocócicas (Assurance EIA y TRANSIA PLATE, Biocontrol; TECA VIA, Biotrace International; Salmonella UNIQUE, Tecra; Detex, Molecular Circuitry Inc.).

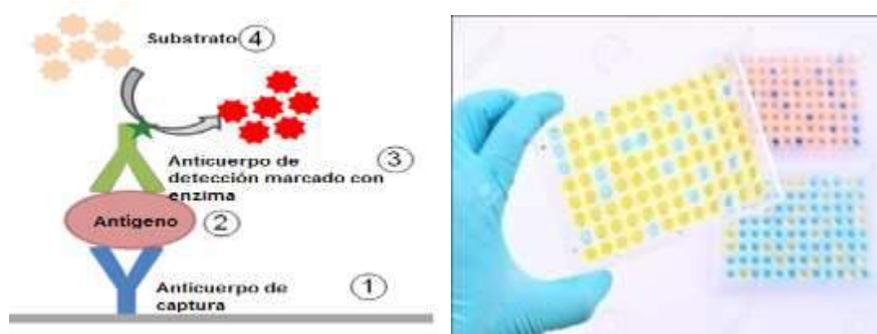


Figura 55. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA): Fundamento y galería
Fuente: Reyna (2017)

Un número considerable de laboratorios de microbiología de los alimentos emplea instrumentos automatizados basados en una variante de la tecnología ELISA conocida como ELFA (Enzyme-LinkedFluorescentAssay), en la que el producto final de la reacción es fluorescente en lugar de cromogénico, para la detección de los patógenos alimentarios mencionados (VIDAS, bioMérieux).

En ocasiones, se utiliza la técnica de separación inmunomagnética (SIM), que emplea partículas magnéticas recubiertas de anticuerpos específicos (Dynabeads, Dynal), para concentrar el antígeno de interés como etapa previa a la realización del ELISA. La SIM permite reducir el tiempo requerido para el enriquecimiento de la muestra, así como obtener suspensiones que contienen menor cantidad de partículas del alimento, lo que facilita su procesamiento posterior mediante distintas técnicas (hibridación con sondas génicas, PCR, entre otros).

Para laboratorios con un volumen moderado de muestras a analizar existen kits de diagnóstico basados en el principio de la inmunocromatografía de flujo lateral caracterizados por ser rápidos, sencillos y no requerir instrumentación especial (VIP, Biocontrol; Reveal, Neogen; RapidChek, StrategicDiagnostics).

. Otro tipo de ensayos inmunológicos rápidos y listos para usar son los basados en la inmunodifusión en un vial de agar para la detección rápida de serovaresmóviles de *Salmonella* (1-2- Test, Biocontrol) o en la aglutinación reversa pasiva con partículas de látex para la detección de microorganismos patógenos (Microscreen, MicrogenBioproducts) y toxinas microbianas (RPLA kits, Oxoid).

3.3.10.3. Métodos genéticos: En este sistema se detectan características celulares mucho más estables contenidas en los ácidos nucleicos, por hibridación de ellos. Los ensayos comerciales actuales emplean sondas genéticas (oligonucleótidos sintéticos) marcadas enzimáticamente que, tras hibridar con regiones específicas del ARN ribosómico (una célula bacteriana puede contener hasta 10.000 copias de ARN

ribosómico frente a una única copia de ADN cromosómico), catalizan una reacción que da lugar a un producto coloreado a partir de un sustrato cromogénico, lo que es indicativo de la presencia del microorganismo en el alimento (Fernández y otros, 2010).

En los últimos años se emplea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el ADN de los microorganismos y disponer así de una cantidad suficiente que permita su detección. Se trata de una técnica específica, sensible (en teoría, puede detectar una única copia del ADN en el alimento; en la práctica se necesitan unas 10^3 ufc/ml para una detección reproducible) y rápida, a lo que contribuye el desarrollo de metodologías alternativas de detección de los productos de PCR que evitan el procesamiento post-reacción. Dichas metodologías están basadas en el empleo de agentes intercalantes (por ejemplo, SYBR Green) o sondas específicas con doble marcaje fluorescente que, además de posibilitar la “visualización” del progreso de la reacción, facilitan la automatización del proceso y permiten la cuantificación de la cantidad de DNA presente inicialmente en la muestra ([PCR cuantitativo en tiempo real](#)).

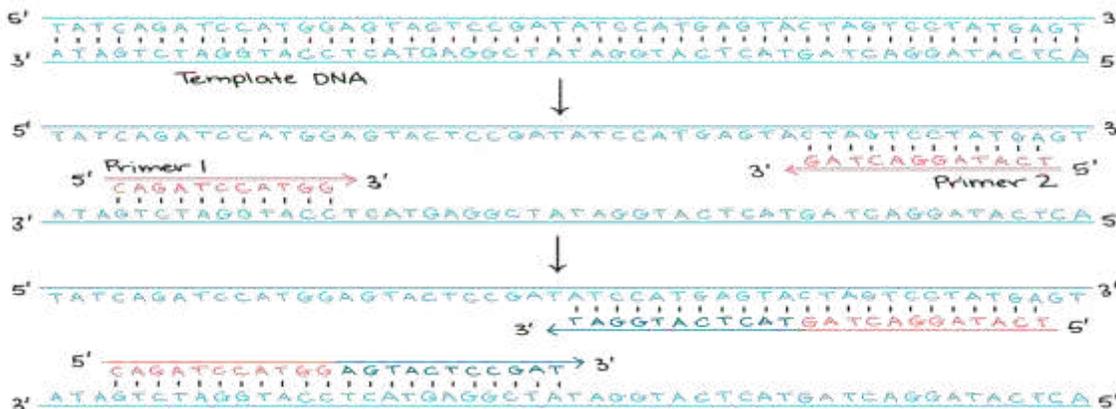


Figura 56. Reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el ADN de los microorganismos y facilitar su detección

Fuente: Pérez (2013)

3.4. Métodos de para aislar microorganismos

El objetivo de aislar microorganismos consiste en que ellos puedan desagregarse del aglomerado en el que encuentren en su población, para que de esta manera se multipliquen y puedan generar un cultivo puro. Al respecto, un cultivo puro -introducido por Joseph Lister en 1878- no es más que una masa compacta de células, observados a simple vista, donde todas ellas son iguales, producto de la descendencia de un único organismo. La expresión de *cultivo axénico* es más apropiada que el anterior, ya que este implica pureza genética; mientras que el otro, posiblemente no lo sea. Un cultivo axénico es aquel en que un organismo

(bacteria, hongo, alga, protozoo o virus), se reproduce en un medio libre de algún otro organismo vivo (Hernández, 2003)

Aunque muchas de las técnicas de determinación de población microbiana, en alguna de sus etapas contemplan estrategias de aislamiento, se tienen las siguientes, cuando lo que se requiere realmente es separar las células para que cada una forme su colonia respectiva; entre ellas están:

a. Siembra en placas:

a.1. Por estrías.

a.2. Por agotamiento.

b. Extensión en placa.

c. Dilución con el asa de siembra.

d. Enriquecimiento del cultivo.

e. Micromanipulación.

a. Siembra en placas: El inóculo se coloca sobre la superficie de un medio de cultivo previamente incorporado a la placa de Petri, para luego con el asa de siembra hacer la distribución al respecto.

a.1. Por estrías: Se toma una pequeña cantidad de material microbiano con un asa estéril y se desliza muy suavemente sobre el agar en la caja de Petri, rayando tanta superficie como sea posible, con la esperanza de que las bacterias al desprenderse del asa, caigan espaciadas individualmente.

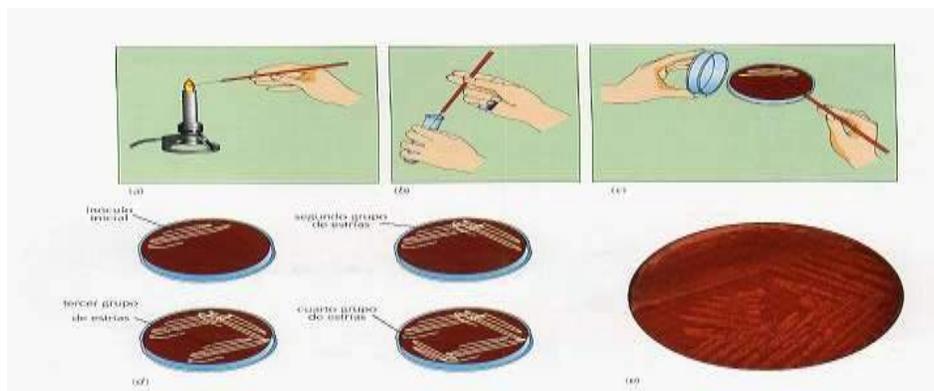


Figura 57. Procedimiento para la siembra en estría de bacterias

Fuente: Gamazo y otros (ob. cit)

En esta técnica se hace el trazado de la zona 1, se flamea el asa hasta el rojo vivo, se enfría en porción de agar libre, se traza la zona 2 y así sucesivamente hasta completar una cuarta zona. Después de incubadas, estas células individuales se dividen repetidamente hasta formar masas visibles sobre el agar, las cuales, idealmente se originaron a partir de una sola célula.

a.2. Por agotamiento: El deslizamiento sobre la superficie del agar se realiza sin levantar ni flamear el asa de siembra, de manera que en los últimos trazos, el material biológico esté lo suficientemente agotado como

para originar colonias bien separadas. A veces conviene sembrar en otra caja de Petri con la misma asa, sin flamear, y sin tomar nuevamente material biológico, lo cual asegura colonias bien aisladas.



Figura 58. Crecimiento de especies bacterianas sembradas por agotamiento.

Fuente: Gamazo y otros (ob. cit)

b. Extensión en placa: Consiste en aislar microorganismos en cajas de Petri con el uso de la varilla angular de vidrio, para lo cual se coloca una gota del inóculo en el centro de la placa con agar nutritivo y con esta ligera barra se dispersa sobre la superficie de la misma. La misma varilla se puede utilizar sin flamear, en una segunda placa. Previo a la dispersión inicial es importante esterilizar la varilla de vidrio, sumergiéndose en alcohol y quemándose cerca del mechero.



Figura 59. Siembra por extensión en placa con varilla angular de vidrio.

Fuente: Rodríguez y Salazar (2014)

c. Dilución con el asa de siembra: Conocida como técnica de placa vertida. Constituye una siembra en masa por diferentes pases o etapas, donde con el asa de alambre se toma material biológico del cultivo madre (una lupada) y se inocula en agar líquido estéril, para luego de éste, previamente rotado, inocular un segundo tubo, se rota y se siembra en el siguiente, hasta que se considere necesario. Generalmente es hasta un máximo de cinco tubos, considerándose adecuado hasta tres de ellos. Con ello lo que se busca es reducir la población microbiana hasta niveles cuantificables.

Es importante tomar en cuenta la temperatura del agar nutritivo en el tubo al momento de inocular, la cual no debe estar muy alta porque podría matar a mucha flora termosensible, como mohos, levaduras y bacterias Gram negativas; al igual que puede estar cercana a 45 °C porque se solidificaría el medio de cultivo, pudiendo traer problemas en el momento de versar en la caja de Petri.

Cada líquido estéril inoculado (agar enfriado), se vierte por separado en una caja de Petri limpia y estéril; se rota y se deja enfriar para incubar, generalmente a 37 °C por 24 horas. A medida que se hace la transferencia del cultivo, de un tubo a otro; en las placas se obtendrían cultivos puros de microorganismos, tal como se muestra en la figura siguiente:

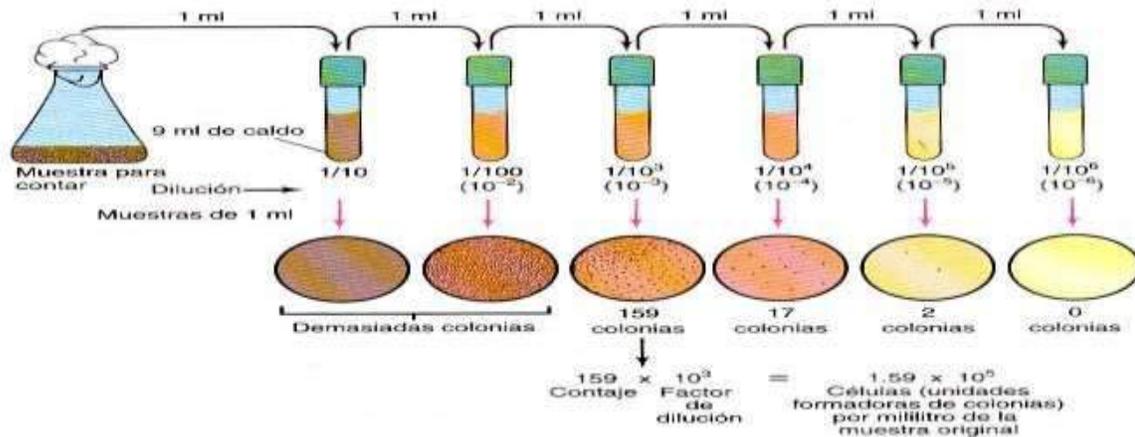


Figura 60. Siembra de bacterias por técnica de la placa vertida.

Fuente: Madigan y otros (ob. cit)

d. Enriquecimiento del cultivo: Consiste en hacer diluciones en medios de cultivo enriquecidos con algún componente, que sea capaz de favorecer una característica fisiológica y bioquímica del microorganismo de interés. Se puede sembrar en placas por estría, pr agotamiento o en masa, pasando el inóculo a través de una serie de transferencias a un medio de composición y condiciones de incubación que favorecen el desarrollo del microorganismo deseado.

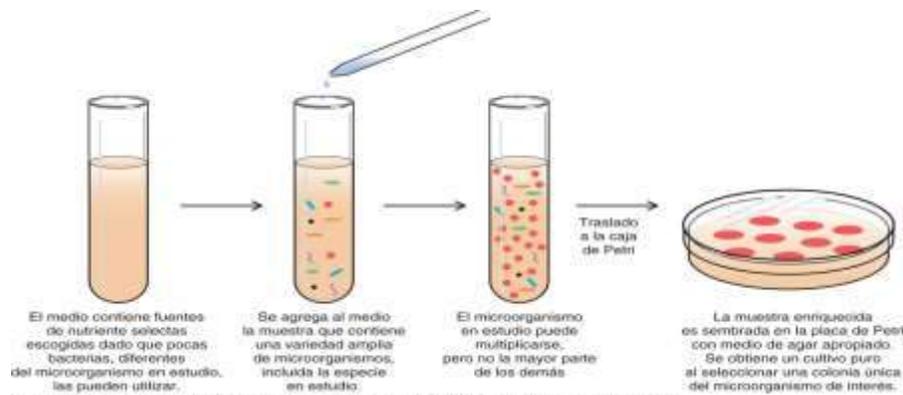


Figura 61. Cultivo de microorganismos por enriquecimiento

Fuente: Karrol y otros (2016)

e. Micromanipulación: Este método consiste en aislar un solo microorganismo, el cual es recogido con una micropipeta, de una suspensión de células en un líquido, mientras se examina la preparación con el microscopio. Son brazos artificiales de manipulación de objetos minúsculos, por lo que están acoplados a diferentes tipos de microscopios. En general constan de un sistema de manipulación simple o doble según la técnica a utilizar, que puede estar automatizado o no, sobre un material que solo puede observarse bajo grandes aumentos, el cual a su vez, puede estar conectado a una pantalla de un ordenador que permite observar con mayor claridad la manipulación que está realizándose, e incluso procesar los datos y guardarlos.

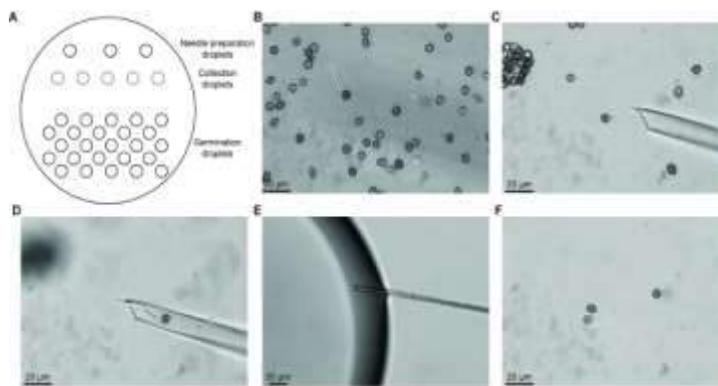


Figura 62. Micromanipulación de bacterias para su aislamiento.
Fuente: Ostrowski y Saville (2017)

3.5. Medios de cultivo para el análisis microbiológico

Un cultivo representa el crecimiento de poblaciones microbianas en ambientes artificiales preparados en el laboratorio; es decir, en medios que bajo condiciones de laboratorio como temperatura, humedad, presión de oxígeno y pH óptimos, bien definidos; representan requerimientos nutricionales adecuados para su desarrollo óptimo. Por lo tanto, un medio de cultivo es la mezcla de sustancias (naturales, sintéticas o ambas), que permite el crecimiento y la reproducción de microorganismos, así como puede permitir mantener su viabilidad. Para Madigan y otros (ob. cit), es un ambiente artificial que proporciona al microorganismo todos los nutrientes requeridos, en concentraciones adecuadas, para así permitir el desarrollo, principalmente de un cultivo puro.

El objetivo de estos medios es facilitar el estudio de poblaciones, que contienen miles o millones de células, dado que su pequeño tamaño limita la cantidad de información que pueda obtenerse de la misma, y de esta manera poder detectar la presencia de microorganismos en una muestra para su posterior

identificación. Desde la invención del microscopio y la puesta a punto de los medios de cultivo y el uso del agar como solidificante, hubo una importante evolución de la microbiología como ciencia.

3.5.1. Condiciones generales para el cultivo de microorganismos

Para el desarrollo microbiano en medios de cultivo es necesario fomentar una serie de factores relevantes, tanto físicos como químicos, que en algunos casos son ajenos por completo al propio medio. Entre ellos se tienen:

a. Nutrientes: Un medio de cultivo debe proporcionar los nutrientes esenciales para el crecimiento de una o más especies, con un contenido mínimo de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas. En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento. En un principio se tomaban como medios de cultivos compuestos naturales como extracto de carne, caldo de terneros, suero de leche, entre otros; ya hoy día, en estos medios artificiales la forma más extendida de aportar estas sustancias es utilizando peptona que, además, representa una fuente fácilmente asequible de nitrógeno y carbón porque la mayoría de los microorganismos, que no suelen utilizar directamente las proteínas naturales, tienen capacidad de atacar los aminoácidos y otros compuestos más simples de nitrógeno presentes en este compuesto.

b. Consistencia del medio de cultivo: En este aspecto se tienen varias formas de estos ambientes, partiendo de un medio líquido, al cual se le puede incorporar ingredientes como albúmina, gelatina o agar, para transformarlos en sólidos o semisólidos.

b.1. Caldo o medio líquido: Constituye un medio compuesto principalmente por extracto de carne y peptona, disuelto en agua, para luego distribuirlos en tubos de ensayo. Para su preparación no se requiere calentamiento, más si agitación. Se deben mantener en un potencial de hidrógeno (pH) de 7,2; así sería favorable para el desarrollo principalmente de bacterias. Se distribuye en tubos de ensayo a razón de 5 ml por cada uno, además de 10 ml en tubos en los que se investiga fermentación de carbohidratos. La composición básica del caldo nutritivo es la siguiente: extracto de carne (3 g), peptona (5 g) y agua (1000 ml).

b.2. Medio sólido: Además de los componentes del caldo, incorpora en su preparación el agar, el cual es un carbohidrato complejo obtenido de ciertas algas marinas y se emplea como agente solidificante, en concentración de 1,5%. Este material disuelto en agua se gelifica cuando la temperatura se reduce por debajo de 45 °C. Se puede distribuir su preparación en tubos de ensayo (agar en cuña o inclinado con 8 ml), en taco (horizontal con 8 ml) o en cajas de Petri, a razón de 15 ml cada una. Su composición para un agar nutritivo es: extracto de carne (3 g), peptona (5 g), agar (15 g) y agua (1000 ml).



Figura 63. Medios líquidos, sólidos y semosólidos para la siembra microbiológica

Fuente: Tortora y otros (ob. cit)

b.3. Medio semisólido: Constituye un medio de menor viscosidad que el sólido por agregarse 0,7% de agar para solidificar. Permite diferenciar microorganismos capaces de licuarlos; es decir, de pasarlos de un estado sólido a gaseoso, donde el tipo de siembra empleado es por punción o picadura.

3.5.2. Tipos de medios de cultivo

3.5.2.1. Medios naturales: Muy empleados en los inicios de esta ciencia, tomados de la naturaleza, en la que se aprovechan los nutrientes y factores físicos y químicos dados por las condiciones del medio como tal, sin modificaciones algunas. Eran medios de fácil preparación y dentro de ellos se usaban leche descremada, caldo de buey, jugos naturales, entre otros.

3.5.2.2. Medios artificiales: Se preparan disolviendo los ingredientes individuales o añadiendo agua a un producto comercial en forma de polvo, que contiene todos esos materiales necesarios, siendo los ingredientes básicos los siguientes:

a. Extracto de carne: Extracto acuoso de tejido de buey, concentrado hasta formar una pasta. Su función es proporcionar carbohidratos, compuestos orgánicos de nitrógeno, vitaminas hidrosolubles y sales.

b. Peptona: Producto que resulta de la digestión de materiales proteicos, como carne, caseína y gelatina. Constituye la principal fuente de nitrógeno orgánico; puede contener además algunas vitaminas y a veces carbohidratos.

c. Agar: Es un carbohidrato gelatinoso obtenido de la pared celular de ciertas especies de algas del género *Gelidium*, *Euchema* y *Gracilaria*, usado como agente solidificante, más no como fuente de nutrientes para las bacterias, aunque contiene polisacáridos.

d. Extracto de levadura: Constituye un extracto acuoso de células de levaduras, siendo una fuente rica en vitamina B; contiene además nitrógeno orgánico y compuestos carbonados.

Dentro de los medios artificiales se tienen:

3.4.2.2.1. De enriquecimiento.

3.4.2.2.2. Diferenciales.

3.4.2.2.3. Selectivos.

3.4.2.2.4. Generales.

3.4.2.2.5. De valoración.

3.4.2.2.1. De enriquecimiento: Contiene los nutrientes adecuados para el crecimiento de diversas especies microbianas, aun en las más exigentes. Es muy empleado para descubrir la presencia de microorganismos que están en baja proporción, o aquellos que no crecen en medios de cultivo ordinarios, por lo que requieren de ingredientes que estimulen el medio para el desarrollo de determinadas especies, e igualmente puedan, mediante determinados componentes químicos, inhibir cierto tipo de especies. El principio del cultivo de enriquecimiento es el control de los nutrientes y las condiciones de cultivo (la temperatura, el suministro de aire, luz, etc pH) de tal manera que se adapte sólo a la especie. Entre ellos se tienen: agar sangre, agar McConkey, caldo selenito cistina, caldo lactosado, entre otros.

3.4.2.2.2. Diferencial: Es un medio de cultivo que permite distinguir entre dos o más especies microbianas, basado en las propiedades metabólicas de ellas. En este medio pueden crecer varios tipos de microorganismos, pero uno de ellos tiene un aspecto distinto, manifestado por cambios bioquímicos. Ejemplo: Agar EMB (en español: Eosinato azul de metileno), en el que pueden desarrollarse diferentes especies de enterobacterias, en la que cada una de ellas manifiesta una pigmentación distinta en sus colonias que las caracteriza. Otro ejemplo de este medio es el agar TSI (en español: hierro tres azúcares).

3.4.2.2.3. Selectivo: Es un medio de cultivo en el que sólo puede crecer un tipo de microorganismo, en el cual, mediante el empleo de aditivos, puede permitir únicamente el crecimiento de agentes biológicos resistentes a éste. Un ejemplo de este tipo de medio se tiene en el agar Baird-Parker, el cual mediante el uso de componentes como telurito de potasio, inhibe el desarrollo de Gram negativas y favorece el crecimiento del género *Staphylococcus*.

3.4.2.2.4. Medios generales: Permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. Entre ellos están el caldo nutritivo y el agar nutritivo.

3.4.2.2.5. Medios de valoración: Muy empleados para una estimación cuantitativa y cualitativa de determinadas actividades microbianas en sustratos que incluyen componentes químicos o metabolitos primarios y secundarios como antibióticos, vitaminas, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, entre otros. Se tienen por ejemplo métodos como: determinación mínima inhibidora, valoración de actividad antimicrobiana, antibiogramas, valoración de vitamina B₁₂.

3.6. Curva de crecimiento microbiano

Es una representación gráfica de la determinación periódica del número de células viables por mililitro de muestra, previamente diluida, en función a una serie de tiempo; es decir, expresa las características inherentes al aumento y/o disminución de la población microbiana en función al tiempo de supervivencia de la misma, todo ello debido a las concentraciones nutricionales existentes y a las condiciones del ambiente en el que se desarrollan. El incremento de una población microbiana es el aumento del número de células como consecuencia de un crecimiento individual y posterior división. Es exponencial porque cada célula se divide dando dos de ellas.

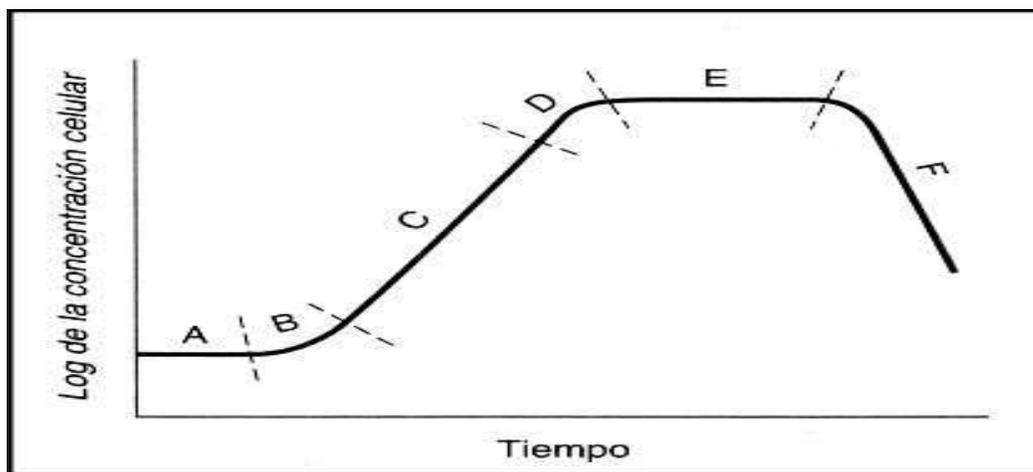


Figura 64. Curva del crecimiento microbiano

Fuente: Hall y otros (2013).

En la figura anterior se puede visualizar que una especie microbiana cumple un ciclo de vida en diversas etapas. En algunas recopilaciones se pueden expresar cuatro de ellas, pero en este caso se tienen seis fases, siendo ellas: A. Latencia; B. Aceleración positiva; C. Exponencial o logarítmica; D. Aceleración negativa; E. Estacionaria; F. Destrucción acelerada y G. Destrucción final o muerte.

A: Fase de latencia: Es un período de transición de los microorganismos por estar adaptándose al medio, dado que han sido transferidos a una nueva condición y su crecimiento no suele comenzar de inmediato. En un principio la población inoculada en el medio permanece temporalmente inalterada, donde cada una de ellas incrementa su tamaño, ocasionando que se generan las enzimas necesarias para su crecimiento en este nuevo ambiente, en el que una vez completadas, aumentan de dimensión y sienten la necesidad de dividirse, de lo contrario sufrirían autólisis; es decir, muerte por efectos de que la pared celular no soportaría la presión interna del microorganismo, estimada en 2 atmósferas.

En términos fisiológicos, se encuentra sintetizando protoplasma nuevo, enzimas y coenzimas para completar su actividad bioquímica, y de esta forma establecer ajustes en el medio físico que las rodea. Debido a ello y como completan la carga enzimática, atacan al final de esta etapa, más rápidamente al sustrato presente en el medio, iniciando entonces la generación de metabolitos primarios.

La importancia del conocimiento de esta fase está es que permite establecer estrategias para incrementar la vida útil de los productos, dado que como los microorganismos están en una etapa de adaptación, mientras más condiciones físicas y químicas adversas se contemplen, mucho más cuesta arriba va a ser para estos agentes biológicos desarrollarse en términos normales. Por otro lado, si se quiere que los microorganismos se adapten rápidamente al medio, porque se quiere masificar su población o porque se necesita que ejerza cambios favorables en el mismo, se le dan las condiciones requeridas para su crecimiento y así su acción en los componentes que proporciona este ambiente, sean extrínsecos o intrínsecos.

Por ejemplo; si se quiere evitar que un alimento rico en proteínas, como una carne fresca de vacuno, sufra una alteración por acción de microorganismos mesófilos, entonces con refrigerar ese medio es suficiente para retardar la adaptación de los microorganismos y así perdurar más tiempo en condiciones favorables. Por otro lado, si lo que se quiere es que la acción de los microorganismos sobre ese sustrato sea lo más rápido posible; por ejemplo, una fermentación alcohólica, en la que intervienen levaduras; se necesita que estos hongos unicelulares se adapten al medio y puedan desarrollar la conversión del carbohidrato a alcohol etílico, dándosele entonces las condiciones adecuadas para que ello suceda.

B: Fase de aceleración positiva: Al completar la actividad metabólica cada microorganismo se divide para evitar autólisis, dado que ya han completado su carga enzimática, incrementando así la velocidad de crecimiento. Ya en esta fase el microorganismo se ha adaptado al medio y genera metabolitos primarios en mayor cuantía. Esta etapa es importante para la industria de alimentos porque se pueden aprovechar algunos de esos metabolitos para su uso industrial y comercial, en el que representen un valor económicamente útil para la humanidad.

C: Fase exponencial o logarítmica: Es una fase en la que debido a que ya se ha iniciado el proceso de conversión biológica del medio y hay el aprovechamiento de los nutrientes, las células jóvenes inician una cinética de reproducción a velocidad prácticamente constante, obteniéndose un máximo de desarrollo. Se incrementa en promedios de 6 a 7 ciclos logarítmicos si las condiciones son óptimas y favorecen sus actividades fisiológicas y bioquímicas.

Es una etapa en la que el consumo de los componentes del sustrato se hace máximo y se va agotando mucho más rápido que en el resto del ciclo biológico; por lo que su disponibilidad se ve reducida hasta niveles en el que comienzan a escasear. Es importante conocer, que es en esta fase donde el nivel de metabolitos primarios se maximiza, hasta que por efectos de agotamiento de componentes nutricionales

disminuye su cinética. Al final de esta etapa ya comienzan a generarse metabolitos secundarios como mecanismo de protección de algunas especies, en el que el antagonismo se convierte en un medio de subsistencia microbiana.

Para la microbiología aplicada e industrial tiene gran relevancia este efecto metabólico, dado que se pueden obtener metabolitos primarios como vitaminas, aminoácidos, fermentaciones de cualquier tipo, entre otras, para su uso; además de ello, se puede obtener biomasa microbiana para su empleo como cultivo iniciador en algunos procesos. Por otra parte, se pueden también obtener antibióticos (metabolito secundario) para su aplicación en el ámbito medicinal.

D: Fase de aceleración negativa: Comienza una disminución de la fase de desarrollo debido al agotamiento de algunos nutrientes y a la producción de sustancias tóxicas durante el crecimiento. En esta etapa se pueden fundamentalmente obtener metabolitos secundarios y no primarios, producto de la escasez de nutrientes; por lo que se reduce el ritmo de multiplicación.

E: Fase estacionaria: En esta etapa la población microbiana permanece constante, quizás como resultado de la división celular o al equilibrio del índice de reproducción con el índice equivalente de mortalidad de estos seres vivos. Por efectos de la acumulación de productos tóxicos y agotamiento de nutrientes, la velocidad de reproducción es prácticamente similar a la de lisis o muerte celular.

F: Fase de destrucción acelerada: Se inicia la muerte violenta de los microorganismos a un ritmo superior al de reproducción debido al agotamiento pronunciado de los nutrientes del sustrato.

G: Fase de destrucción final o muerte: Debido al agotamiento de las sustancias nutritivas esenciales y la acumulación de sustancias inhibitoras; como ácidos, por ejemplo, el número de células viables desciende geométricamente. Es en esta etapa donde antes de la lisis celular, muchas de ellas permanecen atenuadas; es decir, sin actividad metabólica alguna, pero vivas aún; momento que se aprovecha en la industria farmacéutica para la elaboración de vacunas.

3.7. Factores que influyen en el crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano trata del aumento del número de células, en concentraciones que determinan una población muy superior a la inicial, siempre y cuando las condiciones de desarrollo sean las óptimas. A mayor velocidad de crecimiento en un determinado alimento significa mayor gasto de nutrientes, lo que a su vez implica mayores alteraciones en el mismo; sin embargo, si la intención es una conversión biológica controlada para la obtención de uno o más productos de interés, las necesidades nutritivas deben ser cubiertas y mantenidas, en ciertos casos, para que suceda la biomasa y la transformación de interés.

Para Hall (ob. cit), todos los microorganismos, igual que todos los seres vivos, necesitan un conjunto de factores que les permita crecer/vivir en un determinado medio ambiente. Estos factores son obviamente diferentes para cada microorganismo. Así de forma general, las bacterias requieren ambientes diferentes

que las levaduras y estas requieren ambientes diferentes que los hongos; existiendo entre cada uno de estos grupos más diferencias, dependiendo de cada especie.

Los diversos factores que influyen en el crecimiento de los microorganismos en los alimentos son generalmente designados como factores intrínsecos y factores extrínsecos; donde los primeros corresponden a las características físico-químicas del propio alimento y los segundos corresponden a las condiciones de almacenamiento y a las condiciones ambientales. Además, existen otros factores, los cuales tienen que ver con las características de los propios microorganismos y que son designados como factores implícitos.

Estos factores van a ejercer una selección sobre la flora microbiana inicial beneficiando, de este modo, unas especies en detrimento de otras. La manipulación de estos factores permite así obtener productos con mayor tiempo de vida y productos con una calidad microbiológica mayor. Dentro de ellos están:

3.7.1. Factores intrínsecos: Son aquellos propios del medio, en los que al estar presentes van a influir en el crecimiento de los microorganismos presentes en el ecosistema, que puede ser un alimento. En ellos están:

3.7.1.1. Nutrientes.

3.7.1.2. Potencial de hidrógeno (pH).

3.7.1.3. Agua disponible o actividad de agua.

3.7.1.4. Potencial óxido reducción (REDOX)

3.7.1.5. Otros factores: Agentes antimicrobianos naturales, estructura física o biológica de los alimentos.

3.7.1.1. Nutrientes: Corresponde al contenido de factores esenciales presentes en el ecosistema en mayor o menor cantidad. Hay una relación de los microorganismos con las proteínas, carbohidratos, lípidos y pectinas; además de ello hay necesidades de vitaminas, aminoácidos y otras series de componentes básicos. La nutrición es el proceso por el que los seres vivos toman del medio donde habitan las sustancias químicas que necesitan para crecer, y se requieren para dos objetivos:

- . Fines energéticos (reacciones de mantenimiento).
- . Fines biosintéticos (reacciones de biosíntesis o anabolismo).

Es por ello que para algunos microorganismos hay necesidades simples y otras hay necesidades complejas. Los microorganismos de necesidades simples son aquellos que con componentes de glucosa, agua y minerales son capaces de desarrollarse y nacer su ciclo de crecimiento; entre ellas se tienen enterobacterias, principalmente *Escherichia coli*. Mientras que los de necesidades complejas requieren de mayores componentes como vitaminas y aminoácidos, por lo que un medio ambiente puede proporcionar macro y micronutrientes. Entre ellos se puede citar el género *Streptococcus*.

Dentro de los macronutrientes se tienen:

- . Carbono: Una célula típica consta de aproximadamente 50% de carbono, que es el elemento mayoritario de las macromoléculas.

. Nitrógeno: Una bacteria típica contiene aproximadamente el 12% de nitrógeno (peso seco) y a su vez este macronutriente es un componente mayoritario de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares. La globalidad del nitrógeno utilizable está en forma inorgánica, bien como aminoácido (NH_3), nitrato (NO_3) o N_2 .

. Fósforo: En forma de fosfatos orgánicos e inorgánicos y es requerido por la célula para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos.

. Azufre: Es fundamental por ser un elemento estructural en los aminoácidos cisteína y metionina, y porque está presente en vitaminas tales como la tiamina, biotina, ácido lipoico, así como coenzima A. La mayoría de azufre celular proviene de fuentes inorgánicas, ya sean sulfatos o sulfuros.

. Potasio: Es necesario para una gran diversidad de enzimas, incluyendo varias implicadas en la síntesis de proteínas.

. Magnesio: estabiliza los ribosomas, las membranas celulares, los ácidos nucleicos y se requiere también para la actividad de muchas enzimas.

. Calcio: No es un nutriente esencial para el crecimiento de muchos microorganismos. Ayuda a estabilizar la pared celular bacteriana y juega un papel fundamental en la termorresistencia de la endoespora bacteriana.

. Sodio: Es requerido por algunos, pero no todos los microorganismos, y cuando lo es, es debido a la naturaleza química de su hábitat.

. Hierro: Considerado algunas veces como un micronutriente, es requerido en mayores cantidades que otras trazas de metales y por ello debe ser considerado como macronutriente. Juega un papel importante en la respiración celular, siendo un componente clave de los citocromos y de las proteínas que contienen hierro y azufre, implicadas en el transporte de electrones.

Dentro de los micronutrientes, que son elementos traza; son metales, muchos de los cuales forman parte de enzimas que son los catalizadores celulares. Entre los necesarios se tienen: cromo (Cr), cobalto (Co), cobre (Cu), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), Níquel (Ni), Selenio (Se), tungsteno (W), vanadio (V), zinc (Zn), hierro (Fe), entre otros.

De acuerdo a las exigencias nutritivas, los microorganismos se han dividido en dos grupos, según la forma de asimilar requerimientos nutricionales:

a. Según la fuente de energía:

a.1. Fotótrofos: Utilizan la energía radiante de la luz (Algas)

a.2. Quimiótrofos: Dependen de la oxidación de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos.

a.2.1. Quimiolitótrofos: Oxidan sustancias inorgánicas como fósforo, azufre, hierro. Un ejemplo de un género bacteriano está el *Thiobacillus*.

a.2.2. Quimioorganótrofos: Oxidan sustancias orgánicas como aminoácidos, vitaminas, ácidos nucleicos. Un ejemplo de ellas es el *Nitrobacter*, que oxida el amoníaco en nitrito.

Son aquellas que sólo requieren sustancias inorgánicas sencillas (SH_2 , S, NH_3 , NO_2 , Fe), entre otros.

b. Según la fuente de carbono:

b.1. Autótrofos: Asimilan el dióxido de carbono o ácido carbónico como fuente de carbono inorgánico. Un género típico es el *Chromatium*.

b.2. Heterótrofos: Incapaz de utilizar CO_2 como única fuente de carbono y requiere de uno o más compuestos orgánicos. Dependen de los autótrofos para la producción de carbohidratos y otros compuestos orgánicos. Es un tipo de nutrición en el que la principal fuente de carbono es orgánica; es decir, que el organismo no puede elaborar sus propios requerimientos nutricionales a partir de las sustancias inorgánicas. Así son casi todos los microorganismos. Dentro de ellos están:

b.2.1. Saprófitos: Microorganismos que se nutren de productos o restos de material inerte. Son importantes en la cadena alimenticia porque devuelven los nutrientes a la tierra por putrefacción y descomposición.

b.2.2. Parásitos: Un organismo que obtiene sus nutrientes a partir de un hospedador vivo, animal o vegetal. No necesariamente causa una enfermedad. Pueden ser facultativos u obligados.

c. Según la fuente de energía y carbono:

c.1. Fotoautótrofos: Aquellos que obtienen energía de la luz solar y satisfacen sus necesidades de carbono inorgánico con CO_2 . Dentro de ellas están las algas, algunas bacterias y los protozoos.

c.2. Quimioorganótrofos: Microorganismos que obtienen su fuente de energía al oxidar compuestos químicos orgánicos e inorgánicos y satisfacen sus necesidades de carbono con CO_2 . Ejemplo: Género *Thiobacillus* (oxidan azufre).

d. Según la fuente de nitrógeno:

d.1. Hemítrofos: Asimilan el nitrógeno inorgánico. Por ejemplo, género *Rhizobium*.

d.2. Heterótrofos: Asimilan el nitrógeno orgánico.

e. Según fuente de azufre y fósforo: Algunas bacterias requieren compuestos orgánicos de azufre, algunos compuestos inorgánicos y otras se satisfacen con azufre elemental. Entre ellas están las bacterias productoras de metano (*Methanobacterium*). El fósforo lo proporcionan usualmente los fosfatos, como sales de ácido fosfórico.

Otros elementos esenciales en la nutrición microbiana son los elementos metálicos como sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre y cobalto. Por otro lado muchos microorganismos requieren de vitaminas para la formación de sustancias que activan enzimas. Aunque algunos microorganismos son capaces de sintetizarlas en sus procesos metabólicos normales, algunas son capaces de sintetizarlas a partir

de otros compuestos del medio y otras no crecerán a menos que se les proporcione en el medio, una o más vitaminas preformadas.

El agua es otro factor esencial en la penetración de los nutrientes al interior de la célula y a su posterior asimilación. La célula microbiana tiene una composición cercana al 75% de agua, por lo que debe disponer de suficiente actividad de agua para su metabolismo.

3.7.1.2. Potencial de hidrógeno (pH):

Es una medida de acidez o alcalinidad de una solución que indica la concentración de iones de hidronios $[H_3O^+]$ presentes en determinadas sustancias. Se define también como el logaritmo negativo de base 10 de la actividad de los iones hidrógeno; por lo que se expresa como:

$$pH = -\log_{10}A_{H^+} \text{ (Ec. 14)}$$

Por otro lado se puede decir que es el logaritmo negativo de las concentraciones de iones hidroxilo:

$$pH = -\log_{10}A_{OH^-} \text{ (Ec. 15)}$$

Es una forma adimensional convencional de expresar el grado de acidez o basicidad de soluciones acuosas diluidas, en la que se miden las concentraciones de iones hidrógeno. La escala representativa va desde 0 a 14, con un valor neutro de 7. La escala va de 1 a 6 para ácidos; de 8 a 14 si es básico o alcalino. Es por ello que en función a esta escala los alimentos se clasifican en:

a. Alimentos alcalinos: Son todos aquellos de $pH > 7,0$. Son pocos los que están en esta clasificación; entre los que se citan galletas de soda, productos de pastelería, productos marinos, entre otros. El desarrollo de microorganismos se limita un poco; sin embargo, al estar cercanos a la neutralidad, algunas bacterias pudiesen crecer. De estar cercano a 9,0 o 10; es posible el crecimiento de mohos y levaduras, pero a baja cinética.

b. Alimentos de baja acidez: Son aquellos que tienen un pH entre 5,0 y 6,8; por lo que se consideran no ácidos. Entre ellos se tienen las carnes en general, pescados, productos lácteos y algunas hortalizas. Son alimentos en los que pueden desarrollarse principalmente bacterias por estar en el óptimo de su crecimiento que es de 6,5 a 7,5.

c. Alimentos medianamente ácidos: Son aquellos cuyo rango está entre 4,5 a 5,0. Es un indicador importante en la industria de alimentos para su tratamiento térmico o no térmico, dado que en aquellos productos con valores por encima de 4,5; hay posibilidades de crecimiento de bacterias alterantes,

esporuladas y toxoinfecciosas como el *Clostridium botulinum* en productos enlatados, por ejemplo. Entre este grupo se pueden encontrar algunas frutas, vegetales, sopas, pastas, salsas, entre otros.

d. Alimentos ácidos: Son aquellos que se encuentran en un pH por debajo a 3,7. En ellos pueden crecer microorganismos acidófilos como hongos y bacterias ácido lácticas. Entre estos alimentos pueden estar productos fermentados, o aquellos que han sido tratados con ácidos orgánicos.

Es importante considerar que el punto de demarcación del pH corresponde al valor de 4,5. Por encima de este valor, es necesaria la esterilización en alimentos de baja acidez, por haber posibilidades de presencia de bacterias esporuladas del género *Clostridium* y *Bacillus*, las cuales pueden generar alteraciones termófilas anaerobias (por *Clostridium*) o alteraciones de agriado plano (por *Bacillus*). En ellos no se aplicaría esterilización si la flora microbiana predominante es termosensible, como en el caso de la leche, donde se aplica pasteurización. Por otro lado, si el potencial de hidrógeno está por debajo de 4,5; se puede pensar en la pasteurización, tanto para eliminar flora termosensible como para inactivar enzimas propias del alimento.

Para Forsythe y Hayes (2007), la concentración de hidrogeniones tiene un marcado efecto en el crecimiento de los microorganismos. Al respecto, para la mayoría de ellos hay una concentración de iones de hidrógeno óptima para su crecimiento, aunque crezcan en unos límites de acidez o alcalinidad bastante amplios. Por lo general crecen mejor en el pH de su hábitat natural; sin embargo, hay un óptimo en el que su desarrollo es máximo y un mínimo que corresponde a la acidez máxima que permite su incremento.

A las mayorías de las bacterias les favorece un pH cercano a la neutralidad, siendo su óptimo 6,5 a 7,5. Algunas prefieren un pH más bajo, entre 4 a 6, creando generalmente estas condiciones ellas mismas por producir ácidos a partir de la fermentación de carbohidratos. Muy pocas prefieren condiciones alcalinas, como las *Vibriop* por ejemplo, que crecen bien en ambientes de pH entre 8,5 a 9,0. El rango de desarrollo de bacterias está entre 4 a 9.

En el caso de los mohos y levaduras, los ambientes ácidos pueden favorecer su crecimiento, por lo que se les considera acidófilas; es decir, tolerar pH bajo, pudiendo estar en alimentos ácidos y muy ácidos. Su rango oscila entre 2 a 9 para los mohos, con un óptimo de 5,0 a 6,0. Las levaduras se desarrollan entre 3,5 a 9,0, con un óptimo de 5,0. Es así como estos microorganismos son los principales responsables de la descomposición de productos de pH bajo, como salsas, cremas ácidas, mayonesas, ensaladas, entre otros.

Para la industria de alimentos es esencial conocer los rangos de pH en la que se desarrollan los microorganismos, porque de ello va a depender la naturaleza de los tratamientos que se les apliquen como mecanismos de conservación. Es importante destacar que la intención es asegurar al producto en su vida útil, además de evitar cambios organolépticos ni sensoriales en su composición; por el contrario, mantenerlos bajo el mínimo proceso para así conservar sus propiedades originales.

3.7.1.3. Agua disponible o actividad de agua (A_w):

La actividad de agua es un parámetro físico que refleja la medida de la cantidad de agua disponible en un ambiente y que de ella pueden disponer los microorganismos presentes en el mismo. Es la relación de presión de vapor del agua de la muestra y del agua pura a la misma temperatura:

$$A_w = \frac{\text{Presión de vapor del agua de la muestra}}{\text{Presión de vapor del agua pura}} \quad (\text{Ec. 16})$$

El agua es esencial en la célula microbiana, ya que alrededor del 75 al 80% de su peso vivo total la conforman y la necesitan para su desarrollo. En términos generales, estos seres vivos varían en sus necesidades acuosas, por lo que es la cantidad disponible de ella y no la total la que determina si ocurrirá o no el crecimiento del microorganismo y la velocidad en lo que lo hará.

La A_w es un factor adimensional que va de 0 a 1, que permite determinar la relación entre los moles de soluto del medio en el que se desenvuelven los microorganismos con respecto a los moles de solvente o cantidad de agua disponible en el mismo.

$$A_w = \frac{\text{Moles de soluto}}{\text{Moles de soluto} + \text{Moles de solvente}} \quad (\text{Ec. 17})$$

El agua pura tiene una A_w de 1,0; por lo que a medida que se incrementa la concentración de solutos, esta va disminuyendo a valores que pueden ser tolerables para los microorganismos. Al reducir la A_w por debajo del nivel óptimo se alarga la fase de latencia en el crecimiento microbiano, debido a que hay menor cantidad de humedad disponible y esto repercute en la cinética de las actividades metabólicas propias de las células, disminuyendo así la velocidad de progresión y la cantidad de sustancia celular sintetizada; por el contrario, cuando la humedad relativa es mayor que la A_w del alimento, esta tenderá a aumentar en su superficie.

Existen factores que influyen en la necesidad de agua de los microorganismos, siendo ellos:

- a. Propiedades nutritivas del sustrato.
- b. Acidez o alcalinidad.
- c. Contenido de sustancias inhibidoras.
- d. Disponibilidad de oxígeno libre.

e. Temperatura: Donde la mayor parte de los microorganismos toleran mejor actividad de agua baja si la temperatura es óptima.

La mayoría de las bacterias se desarrollan mejor en ambientes de actividad de agua entre 0,990 y 0,998; por lo que crecen muy bien cuya humedad está por encima del 75%. Hay bacterias como los micrococos y los estafilococos que pueden tolerar niveles de A_w cercanos a 0,86; convirtiéndose en células halófilas parciales; es decir, que soportan concentraciones de solutos un poco más elevadas, principalmente sal, cuyos valores en el ambiente pueden estar entre 5 al 7% de NaCl. Igualmente hay bacterias halófilas extremas, que son capaces de tener un adecuado crecimiento en concentraciones de 25 a 30% de NaCl.

Por otra parte, se tienen a las levaduras, quienes pueden tolerar ambientes con actividad de agua cercana a 0,83 – 0,88, convirtiéndose en muchos casos en osmófilas; es decir, que crecen en concentraciones altas de azúcar, por eso aparecen en mermeladas, jarabes, dulces, jaleas, entre otros. Los mohos soportan concentraciones osmóticas más exigentes, pudiéndose desarrollarse en niveles entre 0,7 a 0,75 de actividad de agua, por lo que pueden aparecer en productos deshidratados como harinas, azúcares, granos, entre otros.

La actividad de agua es un factor de crecimiento esencial que interviene en la conservación del alimento, debido a que reducir sus niveles implica bajar la presión de vapor de agua pura en el mismo, por lo que se incrementa la concentración de solutos. Esto trae como consecuencia que la actividad metabólica de las células microbianas disminuye, dándole mayor estabilidad al producto por prolongar la fase de latencia y así su vida útil. Ante esta perspectiva los alimentos se clasifican según su permanencia útil en:

a. Estables: Alimentos de baja actividad de agua ($A_w < 0,7$), que permanecen mayor tiempo sin descomponerse. Dentro de ellos están los cereales secos, harinas, azúcar.

b. Semiestables o semialterables: Alimentos de actividad de agua intermedia, por encima de 0,7 pero por debajo de 0,99. Permanecen menor tiempo en condiciones óptimas, por lo que se hace necesario recurrir a otras barreras de conservación para mantenerlos en el tiempo. Deben manipularse y almacenarse de manera correcta para su mayor permanencia. Dentro de ellos se pueden tener frutas, vegetales, algunos alimentos precocidos como salchichas, por ejemplo.

c. Alterables: Se incluyen aquellos alimentos cuya actividad de agua está por encima de 0,99, los cuales por su condición de humedad son vulnerables al ataque microbiano. Para poder permanecer más tiempo deben someterse a condiciones de conservación más exigentes, como el uso de las cadenas de frío, el uso de conservantes, empacados, entre otros. Entre ellos están las carnes, pescados, algunas frutas y hortalizas.

3.7.1.4. Potencial óxido reducción (REDOX)

Es una forma de medir la energía química de oxidación-reducción en una muestra, empleándose un electrodo para ello, quien la convierte en energía eléctrica y refleja su valor (conocido como ORP) en milivoltios. Para Frazier y Westhoff (2017), es un sistema denominado E_h , que se mide y expresa en milivoltios (mV),

donde un sustrato fuertemente oxidado tendrá un *Eh* positivo, mientras que si está reducido será *Eh* negativo. Indica las relaciones de oxígeno entre los mismos y es utilizado para especificar el ambiente en que un microorganismo es capaz de generar energía y sintetizar nuevas células. En esta perspectiva, los microorganismos aerobios precisan valores positivos y los anaerobios, por el contrario, negativos.

El electrodo empleado es de metal noble (de platino, plata u oro), el cual no interviene en la reacción química que se está llevando a cabo. El resultado determina si este potencial es positivo o negativo: positivo cuando se produce una oxidación (ganancia de moléculas de oxígeno o pérdida de moléculas de hidrógeno) y negativo cuando se produce una reducción (pérdida de moléculas de oxígeno o ganancia de moléculas de hidrógeno). Significa que si el potencial REDOX aumenta hay oxidación, y si disminuye hay reducción.

Para Forsythe (ob. cit), los procesos de oxidación y de reducción se definen en términos de migraciones electrónicas entre compuestos químicos; en la que la oxidación es la pérdida de electrones mientras que la reducción es la ganancia de ellos. Cuando se oxida una sustancia siempre se reduce simultáneamente otra, por captar los electrones liberados; es así como se convierte entonces este factor en un importante agente selectivo en todos los ambientes, incluidos los alimentos, que influye en los tipos de microorganismos presentes y en su metabolismo, debido a que las diferencias observadas en los productos finales del metabolismo, discernibles por el consumidor por diferencias de color o sabor, pueden ser en algunos casos la consecuencia de diferencias redox.

Por ejemplo: en los alimentos cárnicos cortados o en los productos no homogéneos como emulsiones, este potencial puede variar considerablemente de una parte a otra debido a altas concentraciones localizadas de diversos pares redox o de nutrientes como glucosa, fumarato o malato.

En síntesis, el potencial redox indica las relaciones de oxígeno de los microorganismos vivos y puede ser utilizado para especificar el ambiente en que un microorganismo es capaz de generar energía y sintetizar nuevas células sin recurrir al oxígeno molecular. Es por ello que los microorganismos aerobios necesitan para crecer valores redox positivos mientras que los anaerobios frecuentemente requieren valores redox negativos, pudiendo entonces oscilar los valores ORP entre -420 milivoltios (mV), para anaerobios y cerca de +300 mV, para areobios.

En los ambientes donde es limitado el acceso de oxígeno, los microorganismos que se desarrollan producen $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ como principales productos finales; aunque la producción de productos finales tales como ácidos orgánicos no son significativa. Entre los metabolitos secundarios pueden incluirse aminos, entre otros. Cuando el acceso al oxígeno es restringido ocurre la fermentación y pueden impartirse cambios de aroma al alimento antes de que se altere. Antes de que tales cambios sean detectables por el consumidor tiene que alcanzarse un alto número de microorganismos ($> 10^6$ /g).

En este particular, algunos microorganismos, como los aerobios estrictos y los anaerobios, sólo poseen un sistema metabólico terminal para obtener energía y en consecuencia sólo son activos dentro de un margen de potencial redox relativamente estrecho. Otros, como los anaerobios facultativos, tienen sistemas alternativos que pueden ser puestos en marcha o paro por el potencial redox o la presencia o ausencia de oxígeno.

De acuerdo a las guías para la calidad del agua de consumo humano (2011), para el tratamiento de agua potable, la Organización Mundial de la Salud, en 1971 adoptó un valor REDOX de 650 mV, en el que se inactivan casi instantáneamente los virus, incluso en altas concentraciones de ellos, y entre 650 a 700 mV, para inactivar bacterias, principalmente Gram negativos, al igual que mohos y levaduras.

3.7.1.5. Otros factores: Agentes antimicrobianos naturales, estructura fisicoquímica o biológica de los alimentos.

3.7.1.5.1. Sistemas antimicrobianos naturales: Son aquellos que están presentes en plantas, animales o microorganismos, que, por incorporarse al alimento como materia prima, constituye un factor de crecimiento de agentes biológicos de gran o diminuto tamaño. Es por ello que en el ámbito de la conservación de alimentos, van ganando espacios, sobre todo de las actividades antimicrobianas procedentes de extractos de varios tipos de plantas y partes de plantas que se usan como agentes saborizantes en algunos alimentos. Es así como la velocidad de deterioro microbiológico no solo depende de los microorganismos presentes, sino también de la composición química del producto y del tipo de carga microbial inicial.

Los antimicrobianos son compuestos químicos añadidos o presentes en los alimentos que retardan el crecimiento microbiano o inactivan a los microorganismos y por lo tanto detienen el deterioro de la calidad y mantienen la seguridad del alimento. Para Rodríguez (2011), en la mayoría de los casos, los antimicrobianos se usan principalmente para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras, y su acción depende en gran medida del pH, dado que cuanto más ácido es un alimento, más activo es contra los microorganismos.

Los sistemas antimicrobianos naturales pueden clasificarse por su origen:

a. Origen animal: Incluye proteínas, enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas tales como lipasas y proteasas y polisacáridos como el quitosán.

b. Origen vegetal: Incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas.

c. Origen microbiano: Incluye compuestos producidos por microorganismos.

Igualmente, continúan estando entre los aditivos alimentarios más importantes, debido a la demanda por parte del consumidor de productos frescos mínimamente tratados, quienes en sí pueden tener al menos tres tipos de acción sobre los microorganismos:

- a. Inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular.
- b. Daño a la integridad de las membranas.
- c. Interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales.

La mayoría de agentes antimicrobianos usados en alimentos solo inhiben el crecimiento de bacterias y hongos, más no eliminan su crecimiento, por lo que el producto tiene una vida de anaquel restringida, y es necesario el uso de otros factores de conservación que aumenten la vida media del producto. Muchos alimentos contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana, en el que en estado natural, pueden desempeñar el papel de prolongadores de la vida útil de los alimentos; incluso muchos de ellos han sido estudiados por su potencial como antimicrobianos alimentarios directos.

3.7.1.5.2. Estructura físico química o biológica del alimento: Se pueden presentar componentes químicos glucídicos (predominan hidratos de carbono), proteicos (predominan proteínas) y lipídicos (predominan lípidos); conformados por elementos bioquímicos comestibles, derivados de fuentes vivas como plantas y animales. Sucede que todos los alimentos están constituidos por los siguientes elementos en distintas proporciones: agua, hidratos de carbono, proteínas, lípidos (grasas), vitaminas, minerales, pigmentos, saborizantes y compuestos bioactivos.

Estos componentes están dispuestos de formas distintas en los alimentos, para darles su estructura, textura, sabor (flavor), color (pigmentos) y valor nutritivo. De hecho, la composición general de los mismos y la forma en que sus componentes se organizan, le otorgan sus características particulares, que influyen en el crecimiento de los microorganismos, dependiendo de su capacidad enzimática.

Cabe señalar que los agentes biológicos del alimento van acorde a la presencia de enzimas y microorganismos en el mismo, donde su acción puede generar metabolitos primarios y secundarios que inhiben o destruyen el crecimiento de otra flora competente; por lo que las sustancias inhibidoras, presentes originalmente en el alimento, añadidas intencionada o accidentalmente, o desarrolladas por el crecimiento microbiano o por los tratamientos que reciben los alimentos, pueden inhibir la multiplicación de los microorganismos o, como ocurre más a menudo, impedir el desarrollo de ciertos tipos específicos.

Es así como las bacteriocinas, los antibióticos y toxinas, pueden estar presentes en el ambiente en la etapa final del incremento exponencial, en diferentes niveles y aspectos de actividad para la conservación de alimentos. Un ejemplo de ello lo representan las bacteriocinas obtenidas, producto del metabolismo secundario de algunas bacterias acidolácticas.

3.7.2. Factores extrínsecos:

Son aquellos que dependen del entorno de donde se rodea el alimento, siendo ellos:

- 3.7.2.1. Temperatura ambiental.
- 3.7.2.2. Presión del vapor del agua durante el almacenamiento.
- 3.7.2.3. Presencia y concentración de gases en el ambiente.
- 3.7.2.4. Radiaciones ultravioletas.
- 3.7.2.5. Agentes químicos

3.7.2.1. Temperatura de conservación

La temperatura es uno de los factores de gran importancia, debido a que influye mucho en las velocidades de todas las reacciones químicas ligadas a los procesos de crecimiento; es por ello que la temperatura de un ambiente específico, sea este un medio de cultivo, un alimento, un huésped, una bebida, un cuerpo de agua, entre otros; puede determinar la celeridad del incremento microbiano. A medida que disminuye, se reduce su cinética de desarrollo, por lo que es un factor muy relevante en la conservación de productos; mientras que al aumentar, puede favorecer, hasta determinados rangos, el impulso de la progresión o crecimiento.

Es así como el efecto de la temperatura en los alimentos y en el desarrollo de agentes patógenos varía en función de los grados que se aplican, donde se manejan rangos de acción, con un óptimo, que puede favorecer su rápida ascendencia poblacional. La temperatura a la que crece con mayor rapidez un microorganismo es solo unos pocos grados mayores que la óptima, mientras que la mínima, es la más baja a la que tiene lugar el crecimiento del mismo y generalmente está bastante por debajo de la que en mejor cuantía se desarrolla mejor. En resumen, a más de 65 °C, se destruyen algunas de ellas (termosensibles); entre 5-10 °C y 65 °C, se evita la multiplicación; y de 8 °C a -18 °C, los patógenos se mantienen en estado latente, pero no se eliminan.

Tabla 13. Clasificación de los microorganismos de acuerdo a las temperaturas de incubación o ambiental

Grupo	Temperatura mínima (°C)	Temperatura óptima (°C)	Temperatura máxima (°C)
Hipertermófilos	60 – 70	90 – 100	105 - 110
Termófilos	35 – 45	45 – 70	60 – 80
Mesófilos	15 – 20	35 – 37	40 – 50
Psicrófilos/Psicrótrofos	0 – 5	15 - 20	25 - 30

Fuente: Tomado de Forsythe y Hayes (ob. cit)

Para Forsythe y Hayes (ob. cit), conocer los rangos de temperatura de acción de los microorganismos es esencial para la manipulación, fabricación, higiene y conservación del alimento y de la planta donde se procesa. Mantenerlos y conservarlos en las condiciones de frío adecuadas, así como establecer las mejores temperaturas de cocción y controlarlas, resulta fundamental para reducir el riesgo de proliferación de bacterias patógenas. En función a las relaciones de temperatura con el crecimiento microbiano se clasifican en:

a. Hipertermófilos: Son aquellos microorganismos que se pueden desarrollar en ambientes cuyas temperaturas oscilen entre los 60 a 110 °C, por lo que pueden soportar algunas temperaturas de pasteurización; es decir, tratamientos inferiores a 100 °C, generalmente a 72,5 – 75 °C por 12 a 15 segundos. Por ser la temperatura óptima entre 90 a 100 °C, se pueden conseguir en suelos que conforman estructuras volcánicas (terrestres y acuáticas), suelos ricos en minerales y aguas termales.

Agrupación principalmente arqueobacterias, que pueden vivir en el entorno de formaciones volcánicas oceánicas, de profundidades superiores a los 2000 metros, por elevarse el punto de ebullición por encima de 100 °C, por la elevada presión del mar. Igualmente pueden sobrevivir en aguas termales, en las cuales su temperatura está 5 °C por encima de la superficie de donde emergen. Entre estas especies de arqueas se tienen:

- . *Methanopyrus kandleri* (80 – 122 °C)
- . *Pyrolobus fumarii* (90 – 113 °C)
- . *Sulfolobus* (75 – 80 °C)

Entre las bacterias están:

- . *Thermus aquaticus* (75 °C)
- . *Aquifex* (85 °C)

b. Termófilos: Se aplica esta clasificación en microorganismos capaces de sobrevivir por encima de los 45 °C, hasta más o menos 80 °C. Muchas de ellas pertenecen al dominio *Archaea*. Se caracterizan por poseer gran cantidad de lípidos o grasas saturadas de cadena larga en su membrana celular; este tipo de grasas saturadas son capaces de absorber calor y pasar a estado líquido a altas temperaturas (fundir), sin destruirse. Por otra parte, sus proteínas estructurales y funcionales son muy estables frente al calor (termoestables), a través de enlaces covalentes y fuerzas intermoleculares especiales llamadas fuerzas de dispersión de London; también poseen enzimas especiales para mantener el funcionamiento metabólico a altas temperaturas. Dentro de ellas están:

. *Bacillus stearothermophilus*.

. *Sulfobacillus*.

. *Thermoanaerobacter*, entre otras.

c. Mesófilos: Son microorganismos que se desarrollan a temperaturas entre 15 a 45 °C, con un óptimo que oscila entre 30 a 37 °C, muy abundantes en ambientes cálidos, de climas tropicales, además de permanecer muchos de ellos como flora normal de animales de sangre caliente, cuya temperatura promedio es de 37 °C. En este rango se pueden encontrar principalmente bacterias, hongos (mohos y levaduras), algas, protozoos y virus, aparte de rickettsias, algunas arqueas y cianobacterias.

Se desarrollan en mayor abundancia bacterias, todo dependiendo de las condiciones de humedad y concentración de hidrogeniones del ambiente; por lo que representan una posición significativa en los tratamientos térmicos o no térmicos que se le pueden dar a los alimentos para prolongar la vida útil de los mismos. Todo esto surge por la presencia de bacterias esporuladas, quienes ante la condición extrema de temperatura (45 – 50 °C), desarrollan una endoespora, que por ser rica en ácido dipicolínico-calcio-peptidoglucano, la convierte en una estructura rígida, capaz de soportar esas condiciones adversas y así fomentar la sobrevivencia del microorganismo.

Es importante resaltar que, ante esta perspectiva, las bacterias esporuladas (*Bacillus* y *Clostridium*) pueden germinar en condiciones favorables y así generar una nueva célula madre, para luego por fisión binaria, poder multiplicarse y alcanzar niveles en los que las cantidades de toxinas expulsadas al ambiente pueden ocasionar patologías relevantes en el huésped. Ante esta condición de endoesporulación surge el concepto de la esterilización, que no es más que la destrucción total de los microorganismos, incluyendo sus esporas.

Por otra parte, dentro de este grupo se incluyen microorganismos termosensibles; como bacterias Gram negativas, mohos y levaduras, que ante tratamientos leves (por debajo de 100 °C), mueren. Es por ello que se tratan con temperaturas de pasteurización, predominando el efecto a 72,5 °C por espacio de 12 a 15 segundos, conocida como HTST (High Temperature Short Time), es decir, altas temperaturas corto tiempo.

La forma más común de conservar los alimentos ante el ataque de los grupos microbianos mesófilos, es empleando bajas temperaturas, como refrigeración o congelación. De esta manera se controlaría también el desarrollo de termófilos e hipertermófilos, de estar presentes.

d. Psicrófilos/Psicrótrofos: Son aquellos microorganismos que se pueden desarrollar a temperaturas entre 0 a 30 °C, con un óptimo cercano a 15 °C. Pueden adaptarse a condiciones de refrigeración comercial, cuyo rango está entre los 4 a 7 °C, con capacidad de multiplicarse a bajas temperaturas.

Los psicrófilos crecen a temperaturas de refrigeración y se encuentran en ambientes donde la temperatura está siempre por debajo de 15 a 20 °C, como suelos árticos y alpinos, altas latitudes, formaciones de hielo y aguas oceánicas profundas; siendo la mayoría de los microorganismos bacterias y arqueas, así como mohos y algunas especies de levaduras. La gran parte de las bacterias psicrófilas son Gram negativas y engloban géneros como: *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Vibrio*. Entre los Gram positivos pueden estar: *Bacillus*, *Clostridium* y *Micrococcus*, así como *Listeria*. Es importante especificar que los tres primeros de ellos realmente son mesófilos, con tendencias a ser termófilos facultativos, lo que sucede es que se incluyen en esta clasificación por sobrevivir a bajas temperaturas.

Los psicrótrofos son aquellos que pueden crecer a temperaturas por encima de 15 a 20 °C, pero también a temperatura cercana a los 7 °C, desarrollándose mucho en ambientes cuyas temperaturas son fluctuantes, como productos de origen animal, principalmente carnes crudas o cocidas, productos lácteos y mantequilla. Entre las bacterias psicrótrofas están: *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Psychrobacter*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Campylobacter*, *Achromobacter*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Clostridium*, entre otras.

3.7.2.2. Presión del vapor del agua durante el almacenamiento

Este factor físico es una propiedad coligativa de las soluciones, en las que sucede ósmosis por crearse una diferencia de presión en ambos lados, por lo que define la relación de presión osmótica que hay entre el microorganismo y el medio ambiente, para favorecer o no la turgencia entre ambos. Para el microorganismo el intercambio osmótico con el medio se da por la permeabilidad selectiva de la membrana citoplasmática en función a la disponibilidad de agua del ambiente donde se encuentre en ese momento. Es importante destacar que en función a ello se busca un equilibrio entre el producto con el medio ambiente y viceversa. En este particular, el alimento busca nivelarse con la A_w del ambiente y el ambiente con la A_w del alimento. Este potencial químico del agua define el sentido que pueda tener la curva de adsorción o desorción de humedad respectivamente, y de esta manera se evalúa el comportamiento del producto con respecto a la humedad relativa ambiental, que pudiese repercutir en la vida útil del alimento.

Por ser una propiedad coligativa, su efecto va a depender del número de partículas de soluto en relación al número de moléculas del solvente y no de su naturaleza misma. Para Pommerville (ob. cit), este fenómeno se trata de las relaciones de los líquidos en el ambiente, que constituyen el medio interno de los seres vivos, y en la que la membrana citoplasmática trabaja en función de regular la entrada y salida de solutos al medio extracelular en la que está inmerso el microorganismo. Las células microbianas tienen una concentración osmótica diferente a la del medio ambiente en el cual están suspendidas, siendo los cambios en la misma uno de los factores que amenazan o favorecen su desarrollo en estos ecosistemas; todo dependiendo si hay o no turgencia.

La turgencia sucede cuando la concentración osmótica del medio es ligeramente inferior a la presión de la célula, haciendo que el agua fluya hacia el interior de la misma; por lo que es una condición esencial para la difusión de nutrientes y para el mantenimiento de una presión hacia afuera. Se puede dar el caso en que la concentración osmótica del medio sea considerablemente inferior a la de la célula, por lo que la difusión del agua hacia el interior de la misma sea excesiva, originando un aumento de la turgencia. Este medio se conoce como hipotónico, en el que si no se regula la cantidad de agua que ingresa a la célula, puede suceder plasmóptosis, que no es más que la muerte o lisis celular por excesiva absorción de este líquido. Ocurre en células que no están rodeadas por una pared rígida, como el caso de los glóbulos rojos.

Por otra parte se tiene al medio hipertónico, el cual se presenta cuando la concentración osmótica del medio es mayor que la de la célula, habiendo difusión excesiva del agua hacia el exterior de la misma. En este caso sucede plasmólisis debido a que la célula se deseca a causa de la excesiva eliminación o salida de este líquido. En general las concentraciones de sal del 10 al 15% y de azúcar de 50 a 70% en medios ambientes, logran reducir los niveles de actividad de agua, por lo que hay un control del crecimiento microbiano.

En este particular se pueden tener microorganismos halofílicos o halófilos, que son aquellos que toleran altas concentraciones de solutos. Resisten estas condiciones por utilizar un soluto compatible con los procesos del interior de la célula, como iones o compuestos orgánicos. De ellos hay tres tipos:

- a. Los de bajo nivel:** Que toleran alrededor de 6% de sal, siendo la mayoría procariotas marinos. Los estafilococos en alimentos como queso aparecen por soportar estas condiciones.
- b. Los moderados:** Que toleran entre un 6 a 15% de sal, como mohos, levaduras y lactobacilos.
- c. Los extremos:** Por tolerar concentraciones de sal del 15 al 36% aproximadamente. Entre ellos están las halobacterias.

3.7.2.3. Presencia y concentración de gases en el ambiente

Tiene que ver con la concentración de oxígeno e hidrógeno presente en el ambiente; siendo el nivel de oxígeno disponible el que prevalece en la presencia de gases. Es por esta razón que la presencia de oxígeno

en el medio ambiente tiene mucha influencia en el tipo de microorganismos que pueden crecer en un determinado alimento y en la velocidad a la que se multiplicarán. Los gases principales que influyen en el desarrollo de estos seres vivos son el oxígeno y el dióxido de carbono, dando respuestas en función a la presencia o no de alguno de ellos; dividiéndose en cuatro grupos:

a. Aerobios estrictos: Son aquellos que se desarrollan en presencia de oxígeno diatómico libre. Los microorganismos usan el oxígeno para la oxidación del sustrato y de esta forma obtener energía. Dentro de esta clasificación se tienen bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Actinomycetes*, *Micrococcus*, *Rhizobium*, *Acetobacter*, *Nitrobacter*, *Brucella*, *Spirillum*, entre otras. También se ubican como aerobios estrictos los mohos.

Es importante este conocimiento para la industria de alimentos porque permite el empleo de estrategias de envasado libres de oxígeno para controlar su desarrollo. De esta manera se evita la incidencia de algunos patógenos importantes como *Bacillus* y *Pseudomonas*, principalmente en alimentos ricos en proteínas por ser de naturaleza proteolítica, pudiendo generar putrefacción. Por estar el *Bacillus* presente, hay posibilidades de que la endoespora que genere quede en el producto, y que luego por germinación se desarrolle, se multiplique y alcance niveles exponenciales en los que liberaría toxinas.

b. Aerobias facultativas: También se le puede llamar anaerobias facultativas. Pueden desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Pueden desarrollar un metabolismo respiratorio, usando el oxígeno presente; como también pueden desarrollar un metabolismo fermentativo, en ausencia de oxígeno, el cual no le es tóxico. Dentro de esta clasificación se pueden citar las proteobacterias como: *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter*, *Neisseria* y otras Gram negativas. Se tienen también algunas bacterias Gram positivas como *Staphylococcus*. Las levaduras entran en este grupo facultativo, tomando en consideración que en condición aeróbica se multiplica y en condición anaeróbica desarrolla fermentación de los carbohidratos.

En este caso hay que pensar en otra barrera distinta para alternarla con el envasado o empacado libre de oxígeno, dado que no le haría efecto significativo alguno. La ventaja es que como se desarrollan en su mayoría proteobacterias, con el empleo de calentamientos a temperaturas de pasteurización, se podría detener su crecimiento.

c. Anaerobias estrictas: Son aquellas que no son capaces de vivir en presencia de oxígeno, y en las que el aceptor final de electrones en su metabolismo es una sustancia diferente al oxígeno. En un primer caso se pueden involucrar como aceptor de hidrógeno moléculas orgánicas como piruvatos y acetaldehídos, suscitándose una fermentación; en un segundo caso, se pueden involucrar moléculas inorgánicas como sulfatos, por lo que sucede una respiración anaeróbica.

Es importante tomar en cuenta este fenómeno en la manipulación y conservación de alimentos, debido a que por favorecer la ausencia de oxígeno a algunas especies, el tratamiento al vacío aportaría un ecosistema exquisito para este grupo. Ante esta perspectiva es fundamental entonces aplicar una o más estrategias colaterales para prolongar la vida útil del producto y evitar toxoinfecciones, principalmente de la bacteria *Clostridium botulinum*, que es la más representativa de esta clasificación.

Dentro de este grupo se tienen:

- . Bacilos Gram positivos esporulados: Como *Clostridium*.
- . Bacilos Gram positivos no esporulados: Como *Actinomyces* (algunas pueden ser facultativas), *Bifidobacterium*, *Eubacterium* y *Propionibacterium*.
- . Bacilos Gramnegativos: Como *Bacteroides* y *Fusobacterium*.
- . Cocos Gram positivos: Como *Peptoestreptococcus*.
- . Cocos Gram negativos: Como *Veillonella*.

d. Microaerófilos: Son aquellos microorganismos que para sobrevivir requieren niveles de oxígeno muy inferiores a los que se encuentran en la atmósfera de la tierra; es decir, por debajo de 21%. Se estima que estos seres vivos pueden crecer a niveles de 5% apenas de oxígeno. Por otro lado hay los que sobreviven a concentraciones entre un 5 a 10% de dióxido de carbono. Entre ellos se tienen géneros de: *Streptococcus*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Borrelia*, *Neisseria*, *Lactobacillus* y *Listeria*. Algunos de estos microorganismos se ubican también en el rango de los anaerobios facultativos porque sus necesidades de oxígeno son muy mínimas; caso *Helicobacter* y *Neisseria*.

3.7.2.4. Radiaciones

Para Madigan y otros (ob. cit), la radiación es la emisión, propagación y transferencia de energía en cualquier medio en forma de ondas electromagnéticas o partículas. Consiste en la propagación de energía, la cual se puede manifestar en forma de ondas electromagnéticas que pueden propagarse en el vacío (la luz, los rayos infrarrojos, los X o los gamma) o en forma de radiación corpuscular que se hace a partir de partículas subatómicas, que son de tamaño menor que el átomo.

Atendiendo a su energía se clasifican en:

a. Radiaciones ionizantes: Corresponden a las de mayor energía (menor longitud de onda) dentro del espectro electromagnético, teniendo energía suficiente como para arrancar electrones de los átomos con los que interactúan; es decir, para producir ionizaciones.

Tienen aplicaciones en diversas áreas como mecanismo de esterilización de:

- . Material farmacéutico.
- . Diagnósticos y tratamientos médicos.

. Material médico – quirúrgico como guantes de cirugía, suturas, jeringas desechables, agujas, bisturíes, prótesis, entre otros.

. En la industria mecánica para evaluar la calidad de materiales a usar y en la fabricación de piezas para el ensamblaje.

. Alimentos envasados.

Los efectos de estas radiaciones son letales, tanto directos como indirectos; así como mutagénicos. Los directos se logran a altas dosis de radiación (como rayos X); los indirectos y mutagénicos a menores dosis (como rayos gama y cósmicos). En todos estos casos suceden daños al ADN de la célula, con roturas en sus cadenas helicoidales, incapaces de repararse (letal directo), cambios en el ADN capaz de repararse (mutagénicos) y autooxidación en el letal indirecto.

b. Radiaciones no ionizantes: Son aquellas que no poseen suficiente energía para arrancar un electrón del átomo; es decir, no son capaces de producir ionizaciones. Son de baja energía por lo que no son capaces de ionizar la materia con la que interaccionan. Se pueden clasificar en dos grupos:

b.1. Radiaciones electromagnéticas: A este grupo pertenecen las radiaciones generadas por las líneas de corriente eléctrica o por campos eléctricos estáticos. En ellas están las ondas de radiofrecuencia y telecomunicaciones, por ejemplo, y las microondas usadas en electrodomésticos.

b.2. Radiaciones ópticas: Pertenecen a este grupo los rayos infrarrojos, la luz visible y la radiación ultravioleta. Esta última es una radiación cuya longitud de onda va aproximadamente desde los 400 nm, en el que el límite de la luz violeta llega hasta los 15 nm, donde empiezan los rayos X.

Tabla 14. Longitudes de onda por radiaciones electromagnéticas

Radiación electromagnética	λ (longitud de onda, en nm)
Radiación infrarroja	800 - 10^6
Radiación visible	380 – 800
Ultravioleta (UV)	13,6 – 380
Rayos X	0,14 – 13,6
Rayos gama (γ)	0,001 – 0,14
Rayos cósmicos	< 0,001

Fuente: Frazier y Westhoff (ob. cit)

Dentro de las radiaciones no ionizantes, la ultravioleta tiene una importancia significativa para la industria de alimentos, debido a que fomenta esterilizaciones bacterianas de amplio espectro, con una dosis letal para células vegetativas entre 1800 y 6500 $\mu\text{watt}/\text{cm}^2$, aunque sobrevivirían las endoesporas, quienes

necesitan una dosis diez veces superior. Es una radiación de poco poder de penetración que no entra en objetos sólidos, penetra poco en los líquidos y pierde poder en el cristal.

Se aplica mucho en el control microbiológico de la calidad del aire en ambientes cerrados como quirófanos, por ejemplo; en salas de hospitales, en áreas de preparación de medios de cultivo para el análisis microbiológico de productos a nivel de laboratorios, en laboratorios de investigación, en industrias de beneficio de carnes para disminuir y controlar la población de aeróbios que llegan a la superficie de los cortes, entre otras aplicaciones. Para que tenga efecto en el ADN y ARN celular, la longitud de onda debe estar alrededor de 260 nm.

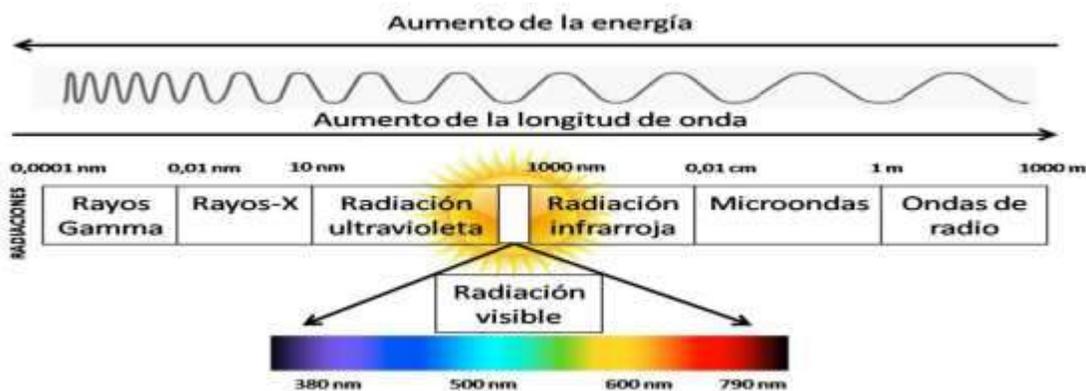


Figura 65. Tipos de radiaciones y el aumento de energía presente en ellas

Fuente: Karrol y otros (ob. cit)

3.7.2.5. Agentes químicos o sustancias inhibidoras

De acuerdo a Forsythe y Hayes (ob. cit), los alimentos contienen una serie de sustancias que afectan el crecimiento microbiano, las cuales pueden presentarse naturalmente en ellos, tener origen microbiano o añadirse artificialmente. Al estar naturalmente, conformaría un proceso de inhibición o destrucción por generar daños, fundamentalmente en la pared celular. Dentro de estos compuestos pueden estar ácidos nucleicos, ácidos orgánicos, solutos, enzimas, entre otros, que van a influir sobre la acción microbiana.

Por otro lado, es posible que las sustancias hayan sido elaboradas por otros grupos microbianos, producto de la conversión biológica de los componentes del alimento. En ellos se pueden presentar fermentaciones típicas de levaduras y bacterias, que modifican las condiciones de potencial hidrógeno del medio, que limitarían la continuación del desarrollo microbiano existente o que lleguen otras especies al alimento.

Estas sustancias pueden ser añadidas en el producto, bien sea como conservante, aromatizante, espesante o como nutriente. Modificarían las características sensoriales del producto, además de incrementar o disminuir niveles de soluto, o de ejercer efecto sobre el pH del mismo y así contribuir a prolongar su vida

útil. Un ejemplo de ello lo representan las sales curantes en productos cárnicos para inhibir desarrollo de *Clostridium botulinum*.

REFERENCIAS CONSULTADAS

- Acebo, D y Hernández, A. 2012. *Los métodos turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida*. Rev. CENIC Ciencias Biológicas. (44)1: 1 - 17
- Fernández, A; García, C; Sáez, J y Valdezate, S. 2010. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. [documento en línea] <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>. [Consulta: Abril 1, 2019]
- Forsythe, S.J y Hayes, P.R. 2007. *Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP*. (2da. Ed). España: Acribia, S.A. 489p.
- Frazier, W.C y Westhoff, D.C. 2017. *Microbiología de los alimentos*. (4ta. Ed). España: Editorial Acribia, S.A. 681p.
- Gamazo, C; López, I y Díaz, R. 2005. *Manual práctico de microbiología*. (3ra. Ed). España: MASSON, S.A. 102p.
- Hall, B. G; Acar, H; Nandipati, A y Barlow, M. 2013. *Las tasas de crecimiento son fáciles*. Mol. Biol. Evol. 31(1), 232–238.
- Hernández, A. 2003. *Microbiología industrial*. Costa Rica: EUNED. 267p.
- Herranz, C. 2010. *Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria*. Universidad Complutense de Madrid. [documento en línea] http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Monografico_VI_workshop_MRAMA.pdf. [Consulta: Abril 1, 2019]
- Hervé, B. 2015. *Nuevas tecnologías en diagnósticos microbiológicos: Automatización y algunas aplicaciones en identificación microbiana y estudio de susceptibilidad*. Rev. Med. Clin. CONDES (26)6: 753 – 763.
- Karrol, C; Hobden, J; Miller, S; Morse, S; Mietzner, T; Detrick, B; Mitchell, T; McKerrow, J y Sakanari, J. 2016. *Microbiología médica*. (27a. Ed). México: McGraw Hill Interamericana, S.A. 850p.
- López, K. 2015. *Validación del método filtración por membrana para análisis microbiológico de coliformes totales y Escherichiacoli en aguas marinas*. Bol. Cient. CIOH 2015; 33:215-220.
- Madigan, M; Bender, K; Buckley, D; Matthew, W; Stahl, D; Dale, T y Martinko, J. 2015. *Biología de los microorganismos*. (14ª. Ed). EEUU: Pearson. 2830p.
- Montoya, H. 2008. *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. (2da. Ed). Colombia: Editorial de Universidad de Antioquia. 282p.

- OMS. 2011. *Guías para la calidad del agua de consumo humano: cuarta edición que incorpora la primera agenda.* [documento en línea] <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272403/9789243549958-spa.pdf?ua=1>. [Consulta: Abril 14, 2019]. 686p.
- Ostrowski, L. A., Saville, B. J. 2017. [Natural antisense transcripts are linked to the modulation of mitochondrial function and teliospore dormancy in Ustilago maydis.](#) *Mol Microbiol.* (5)103: 745-763.
- Pérez, H. 2013. *Establecimiento de una reacción en cadena de la polimerasa para la detección de bacterias y hongos.* *Rev Mex Oftalmol.* 2014; 88 (2): 67 – 72.
- Pommerville, J. 2017. *Fundamentos de microbiología.* EEUU: Jones & Bartlett Learning; Edición. 944p.
- Raibaudi, R.M.; Fortuna, R.S. y Belloso, O.M. 2006. *Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas.* Universidad de Leida. [documento en línea] http://www.ciad.mx/dtaov/XI_22CYTED/images/files_pdf/brasil/olga.pdf. [Consultado: Marzo 25, 2019]
- Reyna, A. 2017. *Fundamento, etapas, estandarización y tipos de la prueba ELISA.* Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios. UNESR. Venezuela: Caracas. 60p.
- Reynoso, M; Magnoli, C; Barros, G y Demo, M. 2015. *Manual de microbiología general.* (1ra. Ed). Argentina: Universidad Nacional de Río Cuarto. 105p.
- Rodríguez, E. 2011. *Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas.* *Rev. Ra Ximhai* (7)1: 153 – 170.
- Rodríguez, L y Salazar, M. 2014. *Manual de prácticas de laboratorio: Biología general.* Costa Rica: ENEUD. 188p.
- Tortora, G; Funke, B y Case, C. 2007. *Introducción a la microbiología.* Argentina: Ed. Médica Panamericana. 959p.

CAPÍTULO IV

MÉTODOS DE CONTROL DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

INTRODUCCIÓN

Para la industria de alimentos, conocer los fundamentos técnicos y científicos de los métodos para controlar crecimiento de microorganismos, es un instrumento básico para la conservación del producto; bien sea, prolongando la fase de latencia de estas células, como destruyendo las mismas; todo ello en función a los efectos que pudiese generar en el sustrato. Desde esta perspectiva, la inocuidad e idoneidad de los alimentos está correlacionada con los métodos de inhibición y/o destrucción de los agentes patógenos, principalmente por la incidencia de hongos y bacterias, quienes son las más abundantes en este tipo de sustrato.

Es por ello que en este cuarto capítulo se presentan los métodos de inhibición; orientados a minimizar la cinética metabólica de los microorganismos, y los métodos de destrucción, quienes se dirigen a la eliminación parcial y/o total de la flora patógena y/o deteriorativa que pueda desarrollarse en los alimentos, basados en principios térmicos y no térmicos, con el objeto de mantener las condiciones organolépticas y nutritivas del producto.

4.1. Fundamentos de los métodos de control de crecimiento microbiano

Los microorganismos por ser seres vivos requieren ciertas condiciones físicas y químicas para desarrollarse en determinados ambientes, todo ello en función a los factores presentes en el ecosistema donde se encuentren. Esto significa que, si se le presentan las condiciones adecuadas, va a continuar sin barreras su curva de crecimiento, con los consecuentes efectos que se puedan suscitar en el mismo. Por ello es que para la microbiología como ciencia es clave fomentar procesos de enseñanza – aprendizaje en este contexto, para así ofrecer al estudiante técnicas de inhibición y destrucción; todo ello en las necesidades que se tengan dentro del proceso.

4.2. Métodos de inhibición

En un primer acercamiento, inhibir es sinónimo de reprimir o impedir la manifestación de un fenómeno ante determinadas condiciones. En el ámbito biológico, es minimizar los gastos energéticos para que los seres vivos puedan soportar condiciones adversas, que reducen su cinética metabólica, sin eliminarlos del todo. Los microorganismos en este caso, al vencer ese obstáculo y conseguir las condiciones adecuadas para su

desarrollo, simplemente lo van a hacer. En determinados casos, hay métodos de inhibición que logran destruir algunas especies, pero hay otras que logran superar esa barrera y sobreviven luego.

Dentro de los principales métodos para inhibir crecimiento microbiano se conocen:

4.2.1. Por frío.

4.2.1.1. Refrigeración.

4.2.1.2. Congelación.

4.2.2. Sustancias químicas.

4.2.3. Presión osmótica/actividad de agua.

4.2.4. Deshidratación.

4.2.5. Fermentación.

4.2.6. Envasado con oxígeno reducido

4.2.7. Método de barreras o tecnología de obstáculos.

4.2.1. Por frío: Los microorganismos tienen la particularidad de resistir bajas temperaturas, aún siendo termófilos y mesófilos. Algunas bacterias y hongos se conservan a temperaturas comunes del refrigerador (4,5 a 7 °C): otras pueden mantenerse en buen estado en cámaras de congelación profunda (-20 °C) o en recipientes con nieve carbónica (-50 a -70 °C), además de ello, pueden mantenerse en cámaras de criogenización (-196 °C). Significa entonces que no es un factor seguro de destrucción microbiana, siendo útiles para la conservación de alimentos, por disminuir el metabolismo celular.

No representan una esterilización o desinfección del producto. En todo caso, pueden ocasionar daño, bajo condiciones extremas, en las proteínas celulares, debido al aumento de la concentración de solutos en el agua que queda sin congelar; sin embargo, la mayoría de las supervivientes permanecen viables durante largos períodos de tiempo.

4.2.1.1. Refrigeración: Se aplica por encima del punto de congelación del producto, generalmente entre 4 a 7 °C, controlándose de esta forma el crecimiento de microorganismos mesófilos y termófilos, y retardando a los psicrófilos. Por otro lado, las bajas temperaturas conservan los alimentos por retardar su fase de latencia o adaptación, además de detener la curva de crecimiento, y así evitar las conversiones biológicas que desatan en los nutrientes que proporcionan los productos.

En el caso de los alimentos frescos, inhibe la acción de las enzimas autolíticas naturales; por lo que, mientras más bajas sean las temperaturas, más lentas serán las reacciones químicas, la acción enzimática y el crecimiento microbiano. Por otra parte, las temperaturas por debajo de 6 °C previenen el crecimiento de los microorganismos que producen intoxicaciones, a excepción del *Clostridium botulinum*, con la toxina tipo E.

4.2.1.2. Congelación: Se aplica a temperaturas inferiores a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, produciendo una disminución inicial rápida del número de microorganismos viables, sin esterilizar. No debe ser considerada como un método para destruir microorganismos transmitidos a los alimentos, debido a que muchos de ellos difieren en su capacidad de supervivencia. Algunas bacterias Gram positivas soportan condiciones de temperaturas bajas; mientras que las Gram negativas no; más si son capaces de generar endoesporas.

Los pH extremos aumentan la susceptibilidad de los microorganismos al frío, mientras que la presencia de azúcares y coloides la protegen; es por ello que se pueden desplegar microorganismos en productos conservados a bajas temperaturas, ricos en di o monosacáridos, como por ejemplo un helado. Igualmente, los mecanismos de fomentar congelación se basan en dos formas básicas:

- a. Congelación rápida.
- b. Congelación media.
- c. Congelación lenta.

a. Congelación rápida: Consiste en un enfriamiento brusco, donde se pretende alcanzar la máxima cristalización en un tiempo inferior a cuatro horas, generalmente entre 60 a 360 minutos; concluyendo el proceso tras lograr una estabilización térmica a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se utiliza para detener la acción de microorganismos, principalmente bacterias, y su proliferación durante el congelado y el descongelado.

Dentro de las principales ventajas que ofrece este tipo de congelación y la ultrarápida se tienen:

- . Se forman cristales pequeños de hielo, mucho más uniformes en tamaño; por lo que hay escasa destrucción de células al descongelarse.
- . Bloquea o suprime el metabolismo de los microorganismos en un tiempo más corto, por lo que la exposición con los factores de crecimiento microbiano se reduce, debido a que se produce una solidificación mucho más rápida.
- . No hay adaptación a las bajas temperaturas por los microorganismos, lográndose un choque térmico por transición brutal.
- . Se lleva a cabo por alguno de los siguientes métodos:
 - Inmersión directa del alimento (empaquetado o no), en el refrigerante. Por ejemplo: congelación de pescado en salmuera o de frutas en jarabes especiales, a temperaturas cercanas a -17 a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

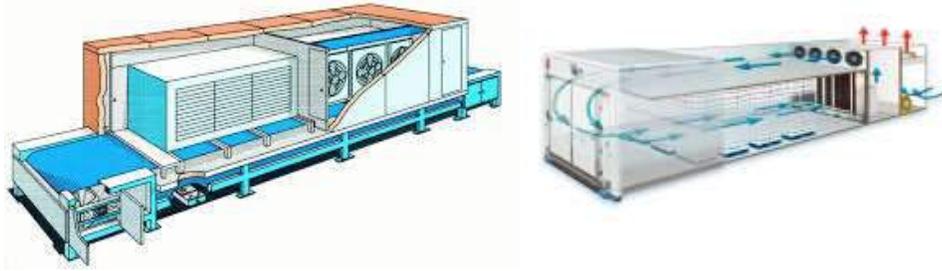


Figura 66. Equipos de congelación rápida de alimentos: Cámara frigorífica y túnel de congelación
Fuente: Benedykt (2014)

- Inmersión indirecta de los alimentos con el refrigerante: A través de la circulación del producto por conductos donde se inyecta aire frío, a temperaturas entre -17 a -45 °C.
- Por contacto directo o indirecto del producto con placas de metal (-30 °C). Es muy usado en carnes cuya presentación se puede manifestar en bandejas.

b. Congelación ultrarápida: Conocida como congelación criogénica. El alimento se introduce directamente en el nitrógeno líquido (-196 °C) o dióxido de carbono y freón (-80 °C), que sustituyen al aire frío para conseguir el efecto congelador por llevarse consigo el calor al evaporarse. Se denomina ultracongelación por requerir entre 5 a 60 minutos para lograr el objetivo. Su inconveniente es el elevado costo.

Dentro de las principales ventajas que ofrece este tipo de congelación y la ultrarápida se tienen:

- . Se forman cristales pequeños de hielo, mucho más uniformes en tamaño; por lo que hay escasa destrucción de células al descongelarse.
- . Bloquea o suprime el metabolismo de los microorganismos en un tiempo más corto, por lo que la exposición con los factores de crecimiento microbiano se reduce porque se produce una solidificación mucho más rápida.
- . No hay adaptación a las bajas temperaturas por los microorganismos, lográndose un choque térmico por transición brutal.

c. Congelación lenta: Se utiliza en productos de gran tamaño, los cuales son almacenados en amplios cuartos, cuando se requieren cámaras de gran capacidad para alojar suficientes cantidades. Es muy común encontrarlos en equipos domésticos, cuyos rangos de temperatura varían. En ellos se almacenan principalmente productos ricos en proteínas y algunas pulpas de frutas, siendo su principal inconveniente el daño en la descongelación por influir en el deterioro de componentes de los productos alimenticios porque el proceso destruye sus células.

La temperatura se reduce hasta el punto de congelación, por lo que el agua en el alimento se convierte en hielo y, finalmente, la temperatura se reduce aún más hasta el punto de congelación (normalmente -18°C). Es por ello que Benedykt (ob. cit), concluye que cuando se congela un alimento, hay tres etapas en el proceso:



Figura 67. Alimento ultracongelado

Fuente: Air Liquide (2019)

- . El agua libre que rodea las células del alimento es la primera que cristaliza en los métodos de congelación lenta.
- . En cuanto se destruye el equilibrio del agua, la misma en el interior de las células del alimento empieza a salir de éstas, destruyendo la pared celular. Cuanto más largo es el tiempo de congelación, mayor es la destrucción de las células.
- . Finalmente, los cristales de hielo se hacen tan grandes que las células se rompen completamente, causando –entre otros inconvenientes– un alto grado de pérdida de agua cuando el producto se descongela o se recalienta.

Dentro de las desventajas que presenta este método de congelación está el hecho de que se forman cristales muy grandes de hielo y eso ocasiona daño celular, rompiendo cavidades y componentes del producto, generando pérdidas de ellos, tal como sucede en la carne fresca descongelada, de la que se escapan porciones de hemoglobina en el agua que se libera. Por otra parte, ante el lento proceso de congelación, hay una exposición más larga en relación con los factores adversos, donde hay mayor tiempo para la difusión de materiales solubles, facilitando una adaptación gradual de los microorganismos. Su principal ventaja es que no hay efecto de choque del alimento.

Tabla 15. Tipos y técnicas de congelación de alimentos

TIPOS DE CONGELACIÓN		TÉCNICAS DE CONGELACIÓN	
LENTA	Para grandes cantidades	FLUJO DE AIRE	Corriente de aire frío
	Cámaras de congelación		Cámaras y túneles de congelación
	Bovino, porcino, ovino		Gases ecológicos: CO ₂ , NH ₃ , Glicol
MEDIA	Túneles de aire frío a 20 km/h y -40 °C	POR CONTACTO	Superficies frías
			Placas con láminas
			Mariscos y pescados
RÁPIDA	Para cocinas profesionales e industrias de alimentos	CRIOGÉNICO	N, CO ₂ , Freón líquido
	Enfriamiento brusco en menos de 4 horas		Ultracongelación: Inmersión del producto Costo elevado

Fuente: Adaptado de Abello Linde Corporation (2019).

4.2.2. Sustancias químicas: La adición de sustancias químicas inhibidoras durante la elaboración de alimentos, pueden controlar el crecimiento de casi todos los microorganismos. En este caso se da una conservación por acción de aditivos alimentarios, quienes representan sustancias que sin entrar a formar parte de la materia básica del producto, se encuentra en éste como consecuencia de cualquier circunstancia relacionada con su obtención, procesamiento, almacenamiento y envasado (Rodríguez, 2011). Con ellos se pretende, bien aisladamente o en combinación con otras formas de conservación, mantener los alimentos en su estado original y evitar pérdidas excesivas a causa de su deterioro. Entre sus objetivos están:

- . Conservar la calidad nutritiva de un alimento.
- . Proporcionar alimentos con destino a un grupo de consumidores con necesidades dietéticas especiales.
- . Aumentar la estabilidad de un alimento o mejorar sus propiedades organolépticas.
- . Favorecer los procesos de fabricación, transformación o almacenado de un alimento, siempre que no se enmascare materias primas defectuosas o prácticas de fabricación inadecuadas.

Tabla 16. Características de congelación de grupos de alimentos

PRODUCTO ALIMENTICIO	% DE AGUA	TEMPERATURA CONGELACIÓN (°C)	TIEMPO DE CONSERVACIÓN
FRUTAS	87 – 95	-0,9 A -2,7	hasta 8 – 10 meses
LÁCTEOS	87	-0,5	hasta 8 meses
VERDURAS	78 – 92	-0,8 A -2,8	hasta 10 meses
PESCADO	65 – 81	-0,6 A -2	hasta 3 – 6 meses
HUEVOS	74	-0,5	hasta 6 meses
CARNE	55 - 70	-1,7 A -2,2	hasta 12 meses

Fuente: Fuente: Adaptado de Bernad (2019).

Los conservadores químicos realizan la inhibición por interferencia a nivel de las membranas celulares, de la actividad enzimática o de los mecanismos genéticos de los microorganismos. Provocan modificaciones en el protoplasma celular y muchas veces la muerte por dañar algunas estructuras fundamentales de la célula, interfiriendo con uno o más procesos metabólicos esenciales.

Igualmente, cualquier agente químico que altere la estructura físico – química de la membrana citoplasmática, hace perder su capacidad selectiva, por lo que hay salida de los componentes de la célula, tales como aminoácidos, nucleótidos, coenzimas e iones inorgánicos; trayendo como consecuencia la lisis del microorganismo. La intención es prolongar la vida útil del alimento, más ante el incremento de la demanda sobre sus suministros a la sociedad, exigiendo minimizar las pérdidas por su alteración.

Entre los principales aditivos para inhibir desarrollo microbiano se tienen:

a. Ácidos orgánicos y sus sales: Se pueden adicionar para disminuir el pH e incrementar la acidez del alimento. De esta forma se controla el desarrollo de neutrófilos, basofílicos y algunos acidófilos, que no toleran alimentos ácidos y muy ácidos. Dentro de estos aditivos se emplean los ácidos: láctico, acético, propiónico y cítrico. Dentro de las sales de este conjunto están el lactato de sodio y el lactato de potasio, usadas como antimicrobianos en productos cárnicos y avícolas, por incrementar la concentración de solutos de los mismos y así disminuye la actividad de agua disponible para los microorganismos.

b. Propionatos: Son eficaces frente a mohos más no sobre levaduras y bacterias, afectando la permeabilidad selectiva de la pared celular. Su efectividad disminuye al aumentar el pH con un límite superior óptimo cercano a 5 o 6, dependiendo el tipo de alimentos. Es un ácido graso de cadena corta que abarca sales sódicas y cálcicas. Son muy empleados en panes, mantequillas, mermeladas, jaleas entre otros.

c. Benzoato de sodio: Es una sal de ácido benzoico, soluble en agua y ligeramente soluble en alcohol, muy empleada como agente conservante de productos a base de frutas y vegetales como compotas, encurtidos,

jugos, bebidas carbónicas, además de margarinas y mantequillas. Se debe emplear a pH entre 2,5 a 4,0, suficientes para inhibir la acción de bacterias por su acción sobre su sistema enzimático (Madigan y otros, 2015).

d. Ácido sórbico: Es un compuesto orgánico natural muy empleado en la industria de alimentos para evitar el desarrollo de mohos y levaduras en productos de quesería, panadería, confitería y otros productos como jugos, compotas y frutos secos. Su acción es más eficiente que el benzoato de sodio a pH por encima de 4,0; aunque ante bacterias no es muy inhibidor. Por su baja constante de disociación se puede usar en alimentos de pH máximo 6,5.

e. Acetatos: Dentro de sus variaciones como anión acetato, cuya base conjugada es el ácido acético, se forma el éster de acetato, recomendándose como conservadores el ácido dehidroacético, el ácido acético y el diacetato sódico. El primero actúa como fungicida y bactericida en envolturas de queso y bebidas a base de frutas; el segundo es muy efectivo sobre levaduras y bacterias, aumentando su actividad al disminuir el pH. Este se emplea como conservante y saborizante en diversos productos como vegetales, mayonesas, encurtidos, embutidos, entre otros. Inclusive se usa mucho en los hogares como desinfectante de superficies. El tercero se ha empleado en quesos fundidos y en envolturas de mantequilla (Reynoso y otros, 2015).

f. Nitritos y nitratos: Son sales que en definitiva no se consideran buenos conservadores químicos, aunque en la industria de embutidos se emplea, entre otras cosas, para inhibir el desarrollo de *Clostridium botulinum*. Su uso fundamental en la industria cárnica obedece al curado de este tejido animal, debido a que los nitritos liberan óxido nítrico, que forma nitrosomioglobina cuando reacciona con los pigmentos hemo de la carne y de este modo produce un color estable. Por otra parte, los nitratos se pudiesen usar como reservorios de nitritos, aunque ya su uso como tal está siendo restringido.

g. Dióxido de azufre y sulfitos: De acuerdo a Caracuel (2015), los sulfitos son derivados del azufre muy utilizado en la conservación de alimentos por sus propiedades fungicidas, bactericidas y antioxidantes, además de evitar cambios enzimáticos y no enzimáticos en ciertos alimentos. Su efectividad mejora a pH bajos. Aunque se ha objetado su incorporación en alimentos, por intolerancia de algunos consumidores; el dióxido de azufre se emplea en ocasiones para higienizar plantas procesadoras de vinos. En otrora era muy recomendado su uso, junto a varios sulfitos, como el sódico y el potásico, en la esterilización del zumo de uvas para su fermentación, por reducir eficientemente los enlaces disulfuros y así inhibir los mecanismos respiratorios de bacterias.

Aunque los sulfitos no tienen efectos teratógenos ni cancerígenos, se les atribuyen diversos efectos adversos relacionados con su ingestión, que afectan principalmente a algunos individuos asmáticos (5-10 %) y a personas con un trastorno del metabolismo de los Usos de los sulfitos como conservantes y necesidad de su control en alimentos sulfitos caracterizado por un déficit de la enzima sulfito-oxidasa, habiéndose registrado

en asmáticos reacciones adversas como dermatitis, dolor de cabeza, irritación del tracto gastrointestinal, urticarias, exacerbación del asma e incluso shock anafiláctico, y en el caso del trastorno metabólico hasta lesiones oculares y daño cerebral grave. La única medida viable, en estos casos, es evitar los alimentos y las bebidas que contengan sulfitos.

h. Óxido de etileno y propileno: Son gases que ejercen acción microbicida en la industria de alimentos; mucho más el óxido de etileno que el óxido de propileno. Para López (2014), el óxido de etileno es un gas que a temperatura y presión normal, tiene una densidad superior a la del aire y es soluble en agua. Su uso en alimentos es limitado a hierbas y especias, frutas secas, nueces, leches y huevos deshidratados en polvo, cereales y harinas integrales, entre otros; pero principalmente se aplica este gas para esterilizar productos médicos y farmacéuticos que no soportan altas temperaturas.

El óxido de propileno por su parte, es menos eficiente que el de etileno, pudiendo usarse para eliminar o inhibir flora microbiana en envases de ciruelas o frutas glaseadas, cacao en polvo, especias, almidón y nueces; sin embargo por la intolerancia de muchos consumidores y por las cargas que puedan traer las materias primas de los campos, la FDA (Food and Drug Administration), recomienda emplearlo en la sanitización de almacenes, materiales de plástico, productos químicos y farmacéuticos, además de materiales de hospitales.

i. Azúcares y sales: Son compuestos que reducen la disponibilidad de agua en el alimento por ser captadores de estas moléculas. De esta forma disminuyen la actividad de agua en el medio y fomentan un posible medio hipertónico, en el que la célula se deshidrata. Los azúcares deben su acción conservadora a la capacidad de retener agua y de esta manera no estaría disponible por los microorganismos, además de incrementar la concentración de solutos del producto.

Por otra parte, el cloruro de sodio se incorpora en el alimento como parte de la salmuera o como solución de curado, favoreciendo el control microbiológico y la fermentación ácido láctica, si fuese el objetivo o parte de él. La plasmólisis celular predomina a menores concentraciones (10 – 15%) que con el uso de azúcares (60 – 65%), teniendo los siguientes efectos:

- . Determina un aumento de la presión osmótica.
- . Deshidrata los alimentos y por ende las células microbianas.
- . Se ioniza para dar lugar a iones cloro, que son nocivo para los microorganismos.
- . Reduce la solubilidad del oxígeno en el agua.
- . Sensibiliza a las células frente al dióxido de carbono.
- . Interfiere a las enzimas proteolíticas.

j. Humo de madera: El ahumado consiste en una técnica en la cual se consigue humo quemando madera preferiblemente dura, para impregnar carne fresca o productos cárnicos. Entre los beneficios están que

adiciona sabores agradables al producto, mejora el color de la masa interna de la carne, ablanda y le da brillo exterior a la misma; además de contribuir a la conservación del mismo por los compuestos volátiles del humo, con efectos bacteriostáticos y bactericidas.

En este particular, Frazier y Westhoff (2017) especifican que esta acción antimicrobiana se debe al formaldehído que se genera, en el que hay presencia de fenoles y cresoles; además de los ácidos alifáticos, alcoholes primarios y secundarios, cetonas, acetaldehídos, entre otros compuestos. Su efecto residual es más efectivo contra bacterias que contra los mohos.

k. Especies y otros condimentos: El poder inhibitor de estos compuestos va a variar con las especies y la concentración y tipos de microorganismos presentes. Ejercen poder bacteriostático en el alimento pero pueden a la vez, favorecer el crecimiento de mohos y levaduras.

4.2.3. Presión osmótica/actividad de agua: El cambio de presión osmótica es uno de los factores que de continuo amenazan la existencia de los microorganismos en su ambiente, donde la mayoría de las bacterias son sensibles a baja actividad de agua en el medio, a diferencia de las levaduras y mohos que toleran mejor los ambientes hipertónicos. Es por esto que cuando se reduce la actividad de agua de un alimento, se pretende inhibir la acción bacteriana fundamentalmente, porque son más susceptibles a incrementos de la concentración de solutos en el medio.

Ante esta situación, los bacteriostáticos preferidos son aquellos que aumentan dichas concentraciones, tal como lo hacen las sales y los azúcares. A los mohos y levaduras se les denominan osmófilos por soportar concentraciones de 10 a 15% de sal; mientras que a los lactobacilos se les denomina halofílicos por resistir ambientes más hipertónicos en sal (25 – 30%). Igualmente están los halotolerantes, que sobreviven, más no se desarrollan, en concentraciones elevadas de presión osmótica y de sal, como el *Pediococcus cerevisiae*. De forma similar, existen microorganismos capaces de crecer en medios con elevadas concentraciones de azúcar (50 - 70%), conocidos como sacarolíticos, entre los que están los mohos y levaduras. cuyas tolerancias máximas no superan el 15 y el 70% respectivamente; por supuesto con sus excepciones, como es el caso de los lactobacilos para la obtención de ácido láctico en sustratos en salmueras a concentraciones del 25 al 30%.

En conclusión; el mecanismo de inhibición bacteriana es por plasmólisis, donde al reducirse la disponibilidad de agua por adición de sales y azúcares, se genera un medio hipertónico, en el que la concentración de solutos del medio supera a la de los microorganismos, sucediendo deshidratación celular. De esta manera se suspende el metabolismo y crecimiento de ellas, más no mueren, permaneciendo en estado latente o estática.

4.2.4. Deshidratación: Consiste en reducir la actividad de agua de la célula microbiana, pero esta vez, no por adición de solutos, sino por eliminación de líquidos de forma natural o artificial. La intención es

suspender la actividad metabólica y de crecimiento de los microorganismos, ocasionando un descenso de la población, en el que el tiempo de supervivencia de la misma depende de los siguientes factores:

. **Tipos de microorganismos:** Donde algunas bacterias Gram positivas son más resistentes a las bajas concentraciones de agua, por formar endosporas, las cuales pueden permanecer muchos años en este estado y luego activarse al conseguir condiciones óptimas para su germinación. El bacilo de Koch, por ejemplo, puede permanecer bastante tiempo en esputos secos, mientras que especies de cocos Gram negativas, como los gonococos y meningococos, son muy susceptibles a la desecación, pudiendo morir en pocas horas.

. **Condiciones físicas de la deshidratación:** Involucra el mecanismo de generación de calor para extraer agua del ambiente y de esta forma de la célula microbiana. No es igual una desecación natural que otra artificial, debido a que en la primera hay factores cambiantes, como la humedad, la temperatura, entre otras, que pueden inhibir crecimiento y dejar de hacerlo, dependiendo de las condiciones del momento. En las artificiales, las condiciones se pueden establecer fijas y así el mecanismo de acción es constante, logrando el objetivo mucho más rápido, minimizando las oportunidades a la célula de adaptarse.

. **Los métodos de desecación:** En el que la eficiencia de cada uno de ellos es una característica particular que los diferencia, en función al diseño de los equipos, a las condiciones operativas de los mismos, y a los tiempos de deshidratación. Entre ellos se tienen:

a. Secado solar o artificial: Es la técnica más antigua en la que los alimentos frescos se exponen a la luz solar, limitado a climas de inmenso sol y atmósferas secas, como es el caso de zonas tropicales, en el que las temperaturas superan los 35 °C, con humedades inferiores al 70%. Esta técnica prevalece aún en las manufacturas artesanales de alimentos, principalmente en las áreas rurales, donde no se disponen de equipos para sus tratamientos. De esta misma manera, el secado artificial corresponde a la exposición de alimentos frescos a lámparas de iluminación, para que con el calor irradiado se deshidrate el producto.

b. Secado mecánico: Es una forma controlada de calentamiento externo, en la que se aumentaría la temperatura del aire, con el propósito de disminuir la cantidad de agua del producto y así, en forma sincronizada, la de la flora microbiana presente en el mismo. La intención es reducir la humedad hasta niveles tolerables, en los que se puedan controlar agentes patógenos y/o deteriorativos, además de minimizar los efectos propios del producto, como enzimas, por ejemplo. Las formas principales de extraer humedad del producto y de esta manera incrementar los solutos en el mismo para disminuir la actividad de agua son:

. **Evaporadores u hornos:** Son equipos que se controlan para extraer del alimento gran cantidad de agua excesiva; para ello se trabaja con aire caliente con humedad relativa regulada. De esta forma se produce un intercambio de calor y por energía térmica se calienta el producto hasta niveles de evaporación del agua, inicialmente libre, que está en el mismo. En el mercado existen variabilidades de diseños que buscan lograr

el objetivo de reducción de agua, usando mucho las estufas, que son sistemas abiertos o cerrados en los que por algún mecanismo se genera calor y este se confina en su interior para tratar al producto que se incuba en él (caso ambiente cerrado), o por el contrario, se deja salir como aire caliente para que por convección o conducción, logre incrementar la temperatura en el alimento (caso abierto).

Las temperaturas usadas dependerán del producto a secar y de los microorganismos a controlar, para que de esta manera se logre el objetivo de inhibición y/o destrucción microbiana, sin modificaciones importantes del alimento, sobretodo de componentes organolépticos y nutricionales. Por otro lado, en estos equipos se pueden esterilizar materiales de laboratorio, tanto de vidrio, de plástico, como de metal, que se requieren para su trabajo en las diversas actividades que allí se generan. Dentro de ellos estarían: placas de Petri, pipetas, fiolas, espátulas, tubos de ensayo, entre otros, que necesitan estar, aparte de limpios y estériles; secos al momento de emplearse.

. **Liofilizadores:** Conocida como deshidrocongelación, la cual consiste en el secado que se logra mediante la sublimación del agua; es decir, el cambio de fase de sólido a gas, mediante condiciones de presión y temperatura menores a las del punto triple (punto donde convergen los tres estados de la materia), ya que por debajo de este no existe fase líquida. Se produce un congelado previo (a $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$), para luego bajo vacío lograr la sublimación del hielo, sin que aparezca el agua en su estado líquido. Entre sus ventajas para la industria de alimentos están:

- El producto mantiene por el mayor tiempo posible el aroma, sabor y nutrientes.
- Rehidratación instantánea.
- Bajo peso para fácil manipulación y transporte.
- No necesita refrigeración para el transporte y almacenamiento.
- Largo período de conservación por la eliminación del 95 al 99,5% de agua.
- Poca pérdida de actividad de los ingredientes.
- Pequeña disminución en la volatilidad de los productos químicos, los nutrientes y los componentes sensibles al calor.
- Cambios mínimos en las propiedades, ya que el efecto de crecimiento de los microorganismos y las enzimas no pueden ser ejercidos a bajas temperaturas.
- Muy aplicados en: café, té y otros extractos; vegetales y frutas; carnes y productos del mar; comidas preparadas; productos lácteos; tintes, productos farmacéuticos, pigmentos; entre otros.



Figura 68. Liofilizador al vacío para alimentos y frutas

Fuente: SoloStocks (2019).

4.2.5. Fermentación: De acuerdo a Raffino (2018), es un proceso bioquímico de oxidación incompleta de un carbohidrato, en el que no se requiere oxígeno para tener lugar, y que arroja una sustancia orgánica como resultado. Es un proceso catabólico; es decir, de transformación de moléculas complejas a moléculas sencillas y generación de energía química en forma de ATP (Adenosín Trifosfato).

Es un proceso de glucólisis que produce piruvato (ácido pirúvico) y que al carecer de oxígeno como receptor de electrones sobrantes de NADH (nicotinadenin dinucleótido) producido, emplea para ello una sustancia orgánica que deberá reducirse para así reoxidar el NADH a NAD⁺, obteniendo finalmente un derivado del sustrato inicial que se oxida.

Es uno de los métodos de procesamiento de los alimentos más antiguos que proporciona mayor seguridad; todo ello debido a la acidez generada por la producción de ácido láctico, a la presencia de bacteriocinas, a la alta concentración de sales y al ambiente anaerobio donde se lleva a efecto. Dependiendo de dicha sustancia final, habrá diversos tipos de fermentación. Entre ellas:

- . **Fermentación alcohólica:** Llevada a cabo por las levaduras principalmente, produce a partir de ciertos azúcares una cantidad de alcohol etanol, dióxido de carbono y ATP. Este es el proceso empleado para producir las bebidas alcohólicas.

- . **Fermentación acética:** Propia de las bacterias del género *Acetobacter*, transforma el alcohol etílico en ácido acético, o sea, el alcohol en vinagre. Es, no obstante, un proceso aeróbico, por lo que puede darse en los vinos expuestos al aire.

- . **Fermentación láctica:** Consiste en una oxidación parcial de la glucosa, llevada a cabo por bacterias lácticas o por las células musculares animales (cuando se quedan sin oxígeno para respirar). Este proceso genera ATP pero subproduce ácido láctico, lo cual produce al acumularse, la sensación dolorosa de fatiga muscular.

. **Fermentación butírica.** Descubierta por Pasteur, consiste en la conversión de las glucosas en ácido butírico y gas; esto último le confiere un olor típicamente desagradable. Es llevada a cabo característicamente por las bacterias del género *Clostridium* y requiere de presencia de lactosa.

. **Fermentación butanodiólica:** Se trata de una variante de la fermentación láctica, llevada a cabo por enterobacterias que liberan dióxido de carbono y generan butanodiol, un alcohol incoloro y viscoso.

. **Fermentación propiónica.** En este proceso intervienen el ácido acético, dióxido de carbono y ácido succínico, y se obtiene de todos ellos ácido propiónico; una sustancia corrosiva con olor acre.

Por suceder en las fermentaciones transformaciones biológicas de carbohidratos, se obtienen metabolitos primarios que pueden ser contraproductos para especies microbianas a determinadas concentraciones e inclusive contra la misma especie que desarrolla este proceso bioquímico. Ante este fenómeno, algunas especies se inhiben, otras pueden morir, mientras que otras sobreviven.

4.2.6. Envasado con oxígeno reducido o disminuido (ROP): Es el resultado de rodear a un alimento con una atmósfera que contiene poco o ningún oxígeno, dando lugar a un nivel bajo del mismo dentro de un envase cerrado herméticamente. El inconveniente de este tipo de mecanismo de conservación, es que pueden aparecer patógenos anaerobios estrictos y/o aerobios facultativos. Comprende una serie de procesos de envasado, entre ellos:

. **Cocción – refrigeración:** Consiste en llenar un recipiente -generalmente bolsa de plástico- del que se ha extraído del aire, con el alimento cocinado caliente, cerrándolo luego para que el calor se mantenga interno.

. **Envasado en atmósfera controlada (CAP):** Es un espacio en el que se mantiene su condición operativa estable de eliminación o sustitución de oxígeno, para así prolongar la vida útil del producto.

. **Envasado en atmósfera modificada (MAP):** Es el envasado de un producto en una atmósfera cuya composición gaseosa se modificó en su momento, haciéndola distinta a la del aire. Consiste en envasar los productos alimenticios en materiales que actúan como barreras gaseosas, cuyo ambiente se ha modificado para frenar la velocidad de respiración, el crecimiento microbiano y reducir la degradación enzimática, con la intención de prolongar la vida útil.

Utiliza un proceso de flujo de gas y cierre, o bien, la disminución del oxígeno por la respiración vegetal o por la actividad microbiana; siendo el gas más empleado el dióxido de carbono. El CO₂ sólido (hielo seco o nieve carbónica) controla el crecimiento microbiano al actuar como refrigerante durante el transporte y almacenamiento, quien por sublimación, desplaza el oxígeno requerido para las bacterias aeróbicas y al formar gas carbónico, disminuye el pH del alimento hasta niveles bacteriostáticos.

. **Sousvide:** Es un proceso especial que se aplica sólo a los ingredientes parcialmente cocinados o combinados con alimentos crudos que requieren un almacenamiento en refrigeración (<3°C) o en

congelación, hasta que el envase con el alimento se calienta inmediatamente antes de servirlo. Con esto se disminuye parte de la carga microbiana del producto pero no lo suficiente para convertirse en autoestable.

. **Envasado al vacío:** Se desplaza el aire del envase por completo, bien sea por técnicas de aplicación de gases como CO₂, o por el llenado completo en el mismo con el producto y soluciones de relleno, de forma que quede libre de oxígeno y así controlar desarrollo de aeróbios.

4.2.7. Método de barreras o tecnología de obstáculos: También conocido como método de obstáculo; no es más que hacer una combinación inteligente y programada de diversos factores de crecimiento microbiano para inhibir o destruir su población, bien sea de manera parcial o definitiva. Se inicia con la primicia de que muchos microorganismos pueden sobrevivir a algunos de los efectos adversos presentes en el medio; sin embargo, en ese intento se podrían quedar los agentes biológicos sensibles. Ante esta situación hay que ejercer un segundo efecto con otro agente para reducir a los sobrevivientes o parte de ellos y así minimizar el crecimiento, para en un tercero o cuarto intento se minimice al máximo la población microbiana original (Torrealba, 2013).

En esta combinación inteligente los factores de conservación interaccionan aditiva o sinérgicamente, lo que permite tener una estabilidad durante el almacenamiento y al aplicarlos en cantidades bajas se logra tener un efecto antimicrobiano mayor, que provoca una menor pérdida de calidad sensorial (Leistner, 2000). Consiste en prevenir el crecimiento microbiano empleando diversos factores que inciden en su desarrollo, dado que hay cepas que pueden tolerar algunos de ellos y continuar su ciclo de vida. La intención es que en uno de los obstáculos se inhiban algunas especies, y las que avancen, en una segunda, tercera o más barreras, se detengan.

Un ejemplo de esta combinación se tiene en el salchichón, el cual es un producto cárnico de baja humedad, ligeramente ácido y empacado al vacío. Con esta combinación de efectos lo que se quiere es reducir la acción del *Clostridium botulinum*, que por ser aerobia soporta el vacío al que es sometido, pero que no es capaz de generar neurotoxina a pH por debajo de 4,5. Con el empacado al vacío se controla desarrollo de mohos y aeróbios importantes como *Bacillus cereus*, y con la baja humedad se inhibe el desarrollo de levaduras que son facultativas ante el oxígeno y soportan pH por debajo de 4,5.

Esta tecnología se aplica por la necesidad de obtener alimentos de calidad, conservados mediante métodos que no afecten las propiedades sensoriales y nutricionales del producto; por lo que se quiere es que mantenga, en mayor cuantía, las condiciones intactas de frescura, con un enfoque de alimento mínimamente procesado (AMP). Lo que se pretende es asegurar la estabilidad del alimento mediante la integración de dos o más factores que influyen en el crecimiento microbiano, con el objetivo de prolongar su vida útil y se mantenga lo más natural posible.

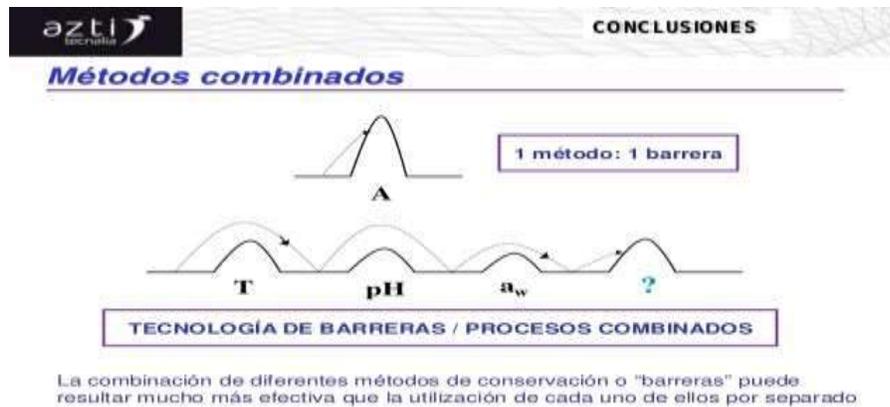


Figura 69. Métodos combinados para la conservación de alimentos.

Fuente: Escobar y otros (2013)

Aunque hay muchas posibilidades distintas de combinación de los diferentes obstáculos, en la práctica los procesos combinados se pueden clasificar en dos grupos:

- . Los que se basan en la acción específica sobre el microorganismos o enzima en cuestión de distintos métodos de conservación que actúan simultánea o sucesivamente.

- . Aquellos cuya acción se basa en la potenciación del efecto de otros métodos obteniéndose así un resultado sinérgico.

Dentro de los principales tipos de obstáculos o barreras se tienen:

a. Factores físicos:

- . Alta y baja temperatura.
- . Radiación ionizante.
- . Energía electromagnética.
- . Altas presiones.
- . Envasado.

b. Factores físico-químicos:

- . Baja actividad de agua.
- . Bajo pH.
- . Bajo potencial redox.
- . Sustancias antimicrobianas naturales.

c. Factores microbiológicos:

- . Flora competitiva, bacteriocinas.

4.3. Métodos de destrucción

Consiste en establecer métodos de eliminación total o parcial de una población microbiana, donde se tiene como objetivo la muerte de todo el conglomerado o parte del mismo, quienes representan un inconveniente para la vida útil del producto y para la seguridad de quienes lo adquieren para su uso como materia prima o para su consumo directo. Incluye la desaparición de aquellos microorganismos capaces de formar endoesporas.

Lo que se quiere es que la célula pierda la capacidad de reproducirse en un medio adecuado. Para ello, en la industria de alimentos se puede recurrir a diferentes alternativas, dependiendo si la destrucción es total o parcial de los microorganismos. Entre estas alternativas se tienen:

4.3.1. Esterilización:

4.3.1.1. Térmica

4.3.1.2. No térmica

4.3.2. Pasteurización:

4.3.2.1. Térmica

4.3.2.2. No térmica.

4.3.1. Esterilización: Es un proceso que tiene como fin la destrucción total de la población microbiana, incluyendo sus esporas. Se puede llevar a efecto por vía térmica o no térmica.

4.3.1.1. Térmica: Proceso de destrucción microbiológica con el empleo de calor, donde la aplicación de temperaturas altas va muy por encima del límite máximo de crecimiento, causando la muerte de la célula por coagulación proteica o por deshidratación de la misma, dependiendo del tipo de calor utilizado. En ambos casos se produce la inactivación de las enzimas necesarias para su metabolismo.

Para Barboza y Bermúdez(2010), es un tratamiento térmico más severo utilizado para los productos alimenticios de baja acidez ($\text{pH} > 4,6$), que inactiva esporas, extendiendo la vida útil del producto por varios meses, y utiliza temperaturas alrededor de 121°C durante varios minutos (por ejemplo, 15 min), siendo este calor el responsable de la inactivación microbiana y la reducción de la actividad enzimática que se produce en los productos alimenticios sometidos a tratamiento térmico, dando como resultado, un producto seguro y cuya vida de anaquel será mucho más larga que su equivalente no procesado.

La destrucción de microorganismos por acción del calor sigue una cinética de primer orden, en la que no hay efectos acumulativos. La muerte se debe a la destrucción o inactivación irreversible de una molécula o estructura esencial, como ADN cromosómico o daño irreparable en la membrana. El efecto de la esterilización en los microorganismos puede entonces ser expresado matemáticamente con la siguiente función logarítmica:

$$k \cdot t = \log N_t / N_0 \quad (\text{Ec. 18})$$

donde:

No: Número de microorganismos (esporas) originalmente presentes (recuento inicial)

Nt: Número de microorganismos (esporas) presentes luego de un tiempo dado de tratamiento (t)

k = constante específica de la reacción de muerte térmica (1/s)

t = tiempo de tratamiento (s)

La combinación de temperatura y tiempo de retención (el tiempo durante el cual el alimento es mantenido a la temperatura necesaria para lograr el efecto deseado) es muy importante, ya que determina la intensidad de tratamiento térmico. Es por ello que la cinética de la muerte microbiana se expresa bajo diversos parámetros a considerar:

. **Valor D:** Tiempo de reducción decimal; el cual es el tiempo, a cualquier temperatura, requerido para producir una reducción del 90% o un ciclo logarítmico de la viabilidad bacteriana. Generalmente la temperatura de referencia es de 121,1 °C. Este valor va a variar de acuerdo al organismo a evaluar.

La expresión anterior es útil para determinar el tiempo necesario para reducir la población a una temperatura dada, en el que cada microorganismo tiene un valor D que lo caracteriza a cierta temperatura. Para el *Clostridium botulinum*, este valor D = 0,21 m.

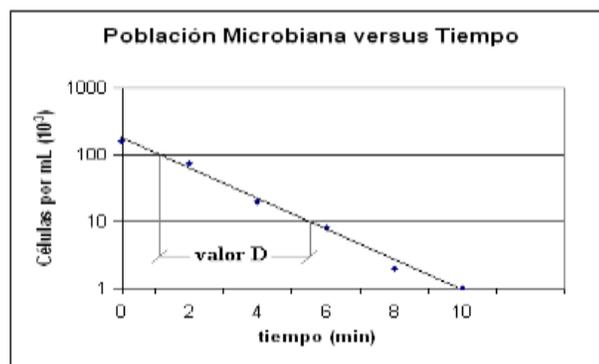


Figura 70. Determinación gráfica del valor D

Fuente: Sharma y otros (2010)

Como ejemplo se plantea una determinación del valor D, que consiste en la aplicación de un tratamiento en autoclave a 116 °C de un microorganismo, determinar tiempo de reducción decimal (TRD), según los siguientes datos de tratamiento:

Duración del tratamiento (min)	Número de microorganismos viables
5	340,0
10	65,0
15	19,0
20	4,5
25	1,3

Partiendo de que $F = D_{ref} \times (\log N_0 - \log N_f)$, se tiene que:

$$D_{ref} = F / (\log N_0 - \log N_f) = F / \log(N_0/N_f) = 20 \text{ min} / \log(340/1,3) = 8,27 \text{ min.}$$

Significa que a 116 °C se logra reducir la población en un 90% del total del proceso de 20 minutos.

. **Valor Z:** Corresponde al aumento o disminución de la temperatura necesaria para disminuir o aumentar diez veces el tiempo de calentamiento. ° F o ° C que se requieren para que la curva de resistencia térmica atraviese un ciclo logarítmico. Se puede decir entonces que es el aumento de la temperatura requerido para incrementar diez veces la tasa de muerte bacteriana; es decir, para reducir diez veces el valor D.

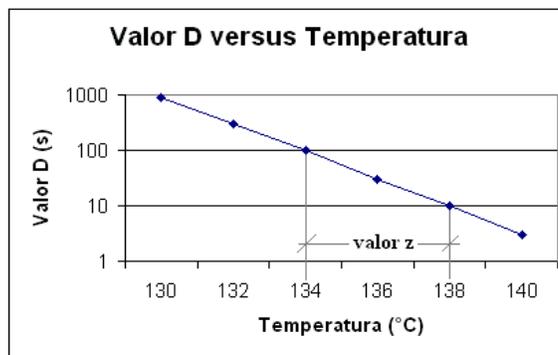


Figura 71. Determinación gráfica del valor Z

Fuente: Sharma y otros (ob. cit)

Ambos valores varían, dependiendo de la especie microbiana y de las condiciones del sustrato en el que se encuentran, tal como se muestra en la tabla 17.

. **Valor F:** Es el valor de esterilización, definido como el tiempo en minutos necesarios para destruir todas las bacterias y sus esporas a 121,1 ° C. (*Cl. botulinum* Fo = 2,52 min.) Reducción de esporas desde 10¹² a 1 esporas. De acuerdo a Forsythe (ob. cit), es el tiempo en minutos de cualquier tratamiento térmico, cuya

capacidad destructora de esporas o formas vegetativas de un microorganismo dado, equivale a la de 1 minuto a 12,1 °C. Se expresa de la siguiente manera:

$$F = D_{\text{ref}} \times (\log N_0 - \log N_f) \text{ (Ec. 19)}$$

donde:

D_{ref} : Tiempo de reducción decimal del microorganismo a una temperatura dada.

N_0 : Población de microorganismos iniciales

N_f : Es el nivel aceptable de supervivencia de microorganismos.

F: Valor de esterilización o tiempo a una temperatura dada.

Tabla 17. Variación de termorresistencia de algunos microorganismos de acuerdo a condiciones del sustrato

Microorganismo	Medio	Temperatura (°C)	Valor D (min)	Valor Z
<i>Brucella</i> spp		65,5	0,1 – 0,2	
<i>Bacillus cereus</i> (esporas)		100	5,0	6,9
<i>Clostridium botulinum</i> (cepas tipo A y B)		121,1	0,21	10
Escherichiacoli (O157:H7)	Carne de vaca	62,8	0,47	4,65
<i>Staphylococcus aureus</i> (toxina)		65,5	0,2 – 2,0	4,8 – 5,4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Suero fisiológico	60	0,4	3,9

Fuente: Adaptado de Forsythe (2003)

El concepto de 12D: Implica que el tratamiento térmico mínimo debe reducir la probabilidad de supervivencia de las esporas más resistentes de *Clostridium botulinum* a 10^{-12} . Es importante acotar que puesto que las esporas de esta bacteria Gram positiva no germinan ni producen toxinas a pH menor de 4,6; este concepto se cumple en alimentos medianamente ácidos y poco ácidos, cuyos rangos superan este valor.

$$F = D_{\text{ref}} (\log N_0 - \log N_f)$$

$$F = 0,21(\log 1 - \log 10^{-12}) = 0,21 \times 12 = 2,52$$

Este resultado expresa que el procesado del alimento a 121,1 °C durante 2,52 minutos debe reducir las esporas de *Clostridium botulinum* una espora.

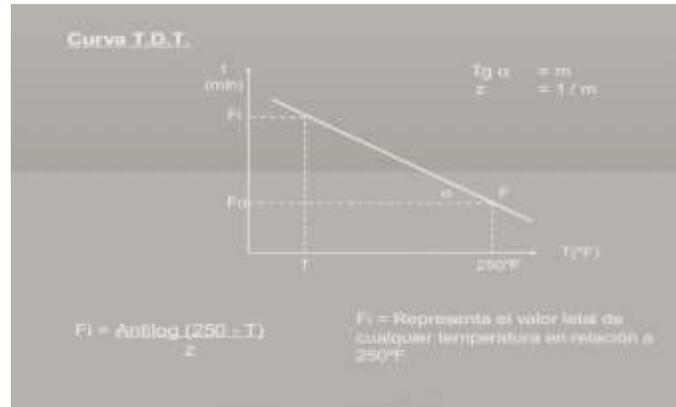


Figura 72. Representación gráfica del tiempo de destrucción térmica (TDT)

Fuente: Sharma y otros (ob. cit)

Para lograr este efecto de destrucción por calor se tienen dos alternativas:

a. Calor húmedo: Es el que emplea vapor de agua a una presión determinada para lograr la coagulación proteica de la célula. El equipo empleado en este caso se denomina autoclave, en el que se esterilizan medios de cultivo, productos enlatados, células microbianas, tratamientos de residuos peligrosos en hospitales, instrumentos de usos médicos y odontológicos, entre otros.

Se puede llevar a cabo con calentamientos a 100 °C para destruir agentes termolábiles como bacterias Gram negativas, mohos y levaduras; así como también a temperaturas por encima de este valor para destruir microorganismos termodúricos y termorresistentes como bacterias Gram positivas. La condición operativa de este método húmedo es a 121,1 °C por espacio de 15 minutos a una presión de 15 psi; razón en la que se destruye la población esporulada, fundamentada en la desaparición del *Clostridium botulinum*, quien representa una de las bacterias de mayor toxicidad en alimentos enlatados. Destruyendo a esta bacteria se elimina al resto de la flora.

En la aplicación de calor es importante conocer el tiempo de muerte térmica (TMT), que es el necesario para esterilizar completamente una suspensión de células y esporas bacterianas, a una temperatura dada; siendo la referencial 121,1 °C. A veces se le designa como el tiempo de destrucción térmica absoluto para distinguirlo del tiempo de destrucción térmica mayoritario, que es el necesario para destruir la mayoría de las bacterias o esporas presentes, y del ritmo de destrucción térmica, que representa la velocidad de destrucción.



Figura 73. Autoclave horizontal

Fuente: Bernad (ob. cit)

En la tabla siguiente se tienen algunas referencias del tiempo de destrucción de algunas bacterias y de las esporas de algunas de ellas:

Tabla 18. Tiempo de destrucción térmica de algunas bacterias y de esporas

Microorganismo	Condiciones operativas (°C/minutos)
La mayoría de las células vegetativas, bacterias, levaduras y mohos	80 /5 – 10
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	58 /30
	59/20
	65/2
<i>Staphylococcus aureus</i>	60/60
<i>Streptococcus faecalis</i>	
<i>Escherichia coli</i>	20-30/57,3
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	30/71
Esporas de <i>Bacillus subtilis</i>	100/15-20
Esporas de <i>Clostridium botulinum</i>	100/100-330
	121,1/15

Fuente: Adaptaciones de Madigan *et al* (ob. cit) y Frazier/Westhoff (ob. cit)

En la tabla 18 se presentan diversas condiciones de tiempo y temperatura para el tratamiento de esporas responsables del agriado plano, provenientes de género *Bacillus*. En la misma se puede notar que a mayor temperatura se necesita menos tiempo para lograr la destrucción.

Tabla 19. Influencia de la temperatura de calentamiento sobre el tiempo para destruir esporas del agriado plano

Temperatura (°C)	Tiempo de muerte térmica (min)
100	1200
105	600
110	190
115	70
120	19
125	7
130	3
135	1

Fuente: Frazier y Westhoff (ob. cit)

b. Calor seco: Es una forma de lograr reducir la población microbiana por letalidad de la misma, en la que se aplica aire caliente a temperaturas cercanas a los 170 – 171 °C por espacio de 2 horas. Este mayor tiempo de exposición se debe a que el vapor de agua es mejor conductor de calor que el aire caliente. Este proceso produce desecación de la célula, efectos oxidativos, fusión de membranas y elevados niveles de electrolitos, en los que la transferencia de calor facilita la disipación de agua de las células.

El equipo empleado para este tratamiento es la estufa de esterilización, cuyas temperaturas de acción varían de 120 a 180 °C, siendo la más recomendada para destruir microorganismos en implementos de laboratorio la que oscila entre 170 a 175 °C. Es importante destacar que este tipo de proceso se lleva a cabo para dejar libre de microorganismos a utensilios de trabajo para el análisis microbiológico como materiales de vidrio, plásticos, metálicos, entre otros. Entre sus ventajas están que no es corrosivo para metales e instrumentos, además de permitir la esterilización de sustancias en polvo y no acuosas, y de sustancias viscosas no volátiles. Otra forma de eliminar microorganismos por este mecanismo seco es la incineración, la cual se emplea para destruir material descartable contaminado, además de asas y agujas de siembra de células.

4.3.1.2. No térmica: Es el tratamiento que se le da a los alimentos a temperaturas bajas; es decir, que no llegan a establecer un calentamiento del producto. Aunque el objetivo principal del tratamiento térmico es la inactivación de microorganismos patógenos y las esporas (dependiendo del tratamiento) para proporcionar a los consumidores un producto microbiológicamente seguro; una serie de cambios tienen lugar en él, que altera su calidad final, en función a las características organolépticas y nutricionales.

En opinión de Barbosa y Bermúdez (ob. cit), para alcanzar el objetivo de destrucción de la flora microbiana termosensible y termorresistente, la pasteurización y esterilización térmica son las dos

operaciones unitarias de alimentos más comunes utilizadas en el mundo para procesarlos y conservarlos; sin embargo, en las últimas décadas, los consumidores se han vuelto más exigentes en cuanto a lo que comen y el precio que pagan, mostrando preocupación por la seguridad de sus alimentos. La mayoría de los productos en el mercado han sido tratados de forma muy intensa para garantizar la seguridad del consumidor pero mostrando daños significativos en sus características sensoriales y nutricionales.

Ante esta circunstancia los consumidores están buscando en sus alimentos, características similares al alimento fresco, junto con alta calidad sensorial y contenido nutricional, por lo que, para la agroindustria es importante establecer tecnologías de tratamientos no térmicos de sus productos, que puedan satisfacer necesidades del mercado a bajo costo. Surgen entonces técnicas como: filtración y sustancias químicas.

a. Filtración.

b. Sustancias químicas.

a. Filtración: Método práctico muy útil en el laboratorio y en la industria, para eliminar microorganismos de líquidos, que se descomponen o inactivan al someterse a las temperaturas de autoclave. Para Madigan y otros (ob. cit), la esterilización por filtración se logra por el paso de un líquido o un gas a través de un material capaz de retener los microorganismos presentes. Se emplea para materiales sensibles al calor, tales como ciertos medios de cultivo, azúcares, soluciones de antibióticos y medicamentos y ciertas sustancias químicas. Se aplica además para la esterilización por frío de bebidas y productos farmacéuticos, aclaramientos de zumos de frutas, vinos y cervezas, y en el tratamiento de aguas superficiales y residuales. Existen varios tipos de filtros, entre ellos los que más se usan son los filtros de profundidad y los filtros de superficie o filtros de membrana. Los primeros de ellos están elaborados por un material fibroso (papel, asbesto o fibra de vidrio) dispuesto al azar, de manera que dentro de la estructura del filtro se crean vías tortuosas donde pueden quedar retenidos la mayoría de los contaminantes presentes. Entre sus ventajas se encuentran su alta capacidad de retención de partículas sobre su superficie y a través de toda su estructura y que permiten filtrar grandes volúmenes. Sin embargo, tienen como desventajas que no presentan un tamaño de poro uniforme y existe la posibilidad de liberación, hacia el material filtrado, de partículas y microorganismos que hayan crecido dentro del filtro. Dadas sus características los filtros de profundidad se usan principalmente como prefiltros, ya que permiten eliminar las partículas grandes, pero no la eliminación total de los microorganismos.

Los filtros de superficie o de membrana generalmente son elaborados de acetato de celulosa o nitrato de celulosa y contienen poros de tamaño uniforme. Este tipo de filtro tiene como ventaja que al conocer exactamente el tamaño de poro que presentan, se pueden seleccionar filtros capaces de retener la totalidad de los microorganismos presentes en una solución; sin embargo, se saturan rápidamente y la velocidad de filtración a través de ellos es lenta. Para la filtración esterilizante se pueden usar combinaciones de un filtro

de profundidad con un filtro de superficie que tenga un tamaño de poro entre 0,1 a 0.22 μm . La mayor parte de los filtros de membrana se pueden esterilizar en autoclave y luego se manipulan asépticamente al ensamblar el equipo.

Estos tipos de filtros son muy empleados a nivel de laboratorio y en industrias de procesamiento de productos farmacéuticos, vitamínicos, de ácidos orgánicos, sueros inmunológicos, entre otros. Por otro lado, en las industrias donde se procesan bebidas de altos volúmenes, como cerveza y vino, se emplean filtros por placas para retener partículas grandes ($>2,2 \mu\text{m}$), confinados de celulosa, diatomeas, o diseños de filtros prensa. Las filtraciones por membranas se hacen para retener micropartículas, con tamaños menores a 2 micras, en la que las sustancias de mayor tamaño que los poros son separados totalmente, mientras que las más pequeñas son obstruidas parcialmente, dependiendo de la construcción de una capa de rechazo en la membrana. De esta manera se logran separar microorganismos y esporas presentes en el producto, garantizando de esta manera su asepsia.

Por otro lado, Hillie (2007), especifica que existe además la nanofiltración de productos en las que se hace pasar un fluido a través de una membrana semipermeable a una determinada presión de forma que se produce una separación basada en el tamaño de las moléculas que pueden atravesar dicha membrana (entre 0.001 y 0.01 mm). Es muy aplicada en purificación de aguas residuales y potables, eliminación de sustancias orgánicas, tales como microcontaminantes e iones multivalentes, así como en la retención moderada de sales univalentes. Entre otras aplicaciones de esta técnica están la eliminación de pesticidas de aguas subterráneas y de metales pesados de las aguas residuales, ablandamiento del agua, purificación y recuperación de productos y subproductos, concentración y separación de azúcares, entre otros.

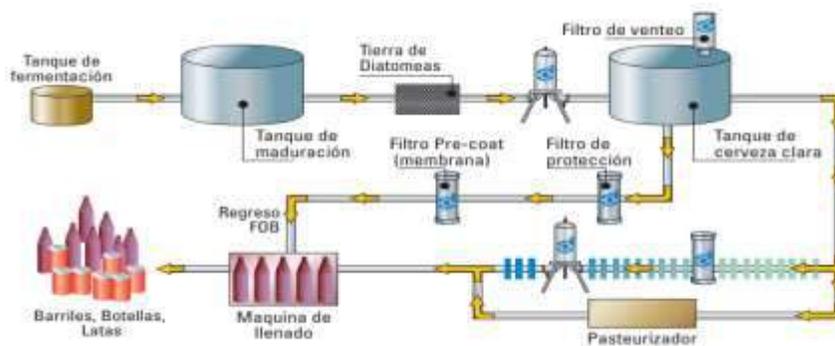


Figura 74. Proceso de filtración de la cerveza

Fuente: Hernández (2003)

b. Sustancias químicas: Son sustancias puras que tienen propiedades constantes, que integran entidades moleculares metálicas y no metálicas, determinadas en unidades orgánicas e inorgánicas. En función a los

elementos y compuestos que la conforman y su ordenamiento por las propiedades físicas y químicas, pueden o no separarse en otras por alguna técnica específica. De esta manera forman agregados como óxidos, ácidos, sales, bases y compuestos orgánicos.

Estas sustancias ejercen efectos significativos en el control microbiológico dentro de la industria de alimentos, en el que, dependiendo de su grado de acción se clasifican en:

. **Desinfectante:** Agente que mata las formas vegetativas de los microorganismos, pero no necesariamente las formas resistentes o esporuladas. En este caso la desinfección se da cuando se ejerce acción o efecto de destrucción de los agentes infecciosos. De acuerdo a SanSebastiano y Bigliardi (2017), los desinfectantes más ampliamente usados en la industria de alimentos son los halógenos: ácido hipocloroso, dióxido de cloro y yoduros; los peróxidos: peróxido de hidrogeno y ácido per acético y los surfactantes incluyendo los surfactantes catiónicos y sustancias anfóteras.

. **Antiséptico:** Producto que se opone a la sepsis (putrefacción), bien sea previniendo o deteniendo el desarrollo o la acción microbiana, destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento o actividad.

. **Higienizante:** Agente que reduce la población microbiana a niveles que se juzgan no perjudiciales, según las exigencias de salud pública. Se aplican comúnmente sobre objetos inanimados y para el saneamiento diario de materiales y utensilios.

. **Germicida:** Agente que mata las formas vegetativas de los gérmenes, pero no necesariamente las formas esporuladas resistentes. Es prácticamente lo mismo que desinfectante, aunque su aplicación es contra toda clase de microorganismos infecciosos o patógenos.

. **Bactericida:** Cualquier agente que destruye bacterias.

. **Bacteriostático:** Inhibición del crecimiento y reproducción de bacterias sin eliminarlas.

. **Antimicrobiano:** Interfiere en el crecimiento y actividad de los microorganismos.

La acción perjudicial de una sustancia química es su efecto específico sobre algunos componentes de la célula viva, previniendo el crecimiento o causando la muerte de la siguiente manera:

. Acción química sobre las estructuras microbianas, especialmente sobre la membrana celular, perdiendo propiedades selectivas; por lo que habría salida de componentes esenciales como aminoácidos, nucleótidos, iones orgánicos, compuestos nitrogenados y fósforo.

. Desnaturalización y precipitación de proteínas.

. Oxidación de grupos químicos esenciales para la actividad de ciertas enzimas y coenzimas, por lo que se altera el metabolismo celular.

. Lesión de núcleos y genes, por aplicación de sustancias químicas con actividad particular para ácidos nucleicos, como formaldehído, que reaccionan con radicales amino e hidróxilo de nucleoproteínas, al igual que con otras proteínas.

En atención a lo expuesto, la eficacia de la desinfección química depende de factores como: tiempo, temperatura, concentración de la sustancia, pH del medio, y características de los microorganismos. Es así como distintas sustancias químicas trastornan los microorganismos en varias formas, por lo que debe cumplir una serie de requisitos para considerarse ideal. Entre ellos están:

- El producto químico, a bajas concentraciones, debe tener un amplio espectro.
- La sustancia debe ser soluble en agua u otros solventes, en volúmenes que permitan su uso efectivo.
- La sustancia debe ser estable a lo largo del tiempo; es decir, de alta prolongación de la acción antimicrobiana.
- No debe ser tóxica para las personas y animales.
- Debe presentar homogeneidad, de forma que los ingredientes activos estén presentes en cada aplicación.
- No debe combinarse con material orgánico extraño.
- Debe mantener actividad antimicrobiana a temperatura ambiente y a la del cuerpo.
- Tener capacidad de penetración.
- No ser corrosiva ni teñir.
- Debe tener poder desodorante y capacidad detergente.
- Disponibilidad y costo.

En función a estas características, para la selección de un agente químico antimicrobiano hay que tomar en cuenta los siguientes factores:

- . Naturaleza del material al cual se le va a someter a tratamiento.
- . Tipo de microorganismo, donde unos son más susceptibles que otros a agentes químicos como el caso de las bacterias Gram positivas.
- . Condiciones ambientales: Temperatura, pH, tiempo, concentración y presencia de materia orgánica extraña.

b.1.Principales grupos de agentes antimicrobianos

b.1.1. Fenol y compuestos fenólicos: Usado por Lister por vez primera en 1860, en su trabajo para desarrollar técnicas quirúrgicas asépticas. Se emplea como bacteriostático y bactericida, generalmente en solución acuosa del 2 al 5%; aunque ya hoy en día está en desuso como ácido fénico, sustituyéndose por aceite fénico. Representa un buen desinfectante para superficies, equipos de laboratorio y objetos inanimados, desnaturalizando proteínas y dañando membranas celulares. Los virus y esporas bacterianas son ligeramente resistentes a su acción, en la que su actividad antimicrobiana se puede reducir a temperaturas bajas, pH alcalino, presencia de materia orgánica y jabones.

b.1.2. Alcoholes: Son compuestos químicos orgánicos que contienen un grupo hidroxilo (-OH), en sustitución de un átomo de hidrógeno, de un alcano, enlazado de forma covalente a un átomo de carbono,

grupo carbinol (C-OH). Se utilizan los alcoholes propílicos e isopropílicos en concentraciones del 70 al 90%, por ser los mejores desinfectantes de la piel, siendo de efecto bacteriostático y bactericida por eliminar células vegetativas pero de poco efecto sobre las esporas. Su acción se basa en la desnaturalización y coagulación proteica, siendo muy usado en el tratamiento cutáneo. Las concentraciones superiores al 60% son efectivas contra virus, solo si no hay material proteico.

b.1.3. Halógenos y sus compuestos: Los halógenos se utilizan en las industrias química, de tratamiento de aguas, de plásticos, farmacéutico, papelerero, textil, militar y petrolífero (Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo). Consta de los siguientes elementos: flúor, cloro, bromo e iodo y el elemento radiactivo astato; siendo los más usados el cloro y el iodo, como agentes blanqueadores y desinfectantes en diversas industrias.

En la tabla siguiente se pueden observar sus usos:

Tabla 20. Uso de los halógenos y sus compuestos

Halógeno	Usos	Industria
Bromo	Extracción de oro y perforación de pozos petroleros y gas. Retardador de la llama del plástico Fabricación de agentes refrigerantes	Minera e hidrocarburos Polímeros
Cloro	Desinfectante de material descompuesto. Depuración de agua potable y residual. Blanqueador de prendas de vestir e industria papelerera.	Refrigeración Alimentos, manejo de desechos Agua potable, alimentos
Flúor	Higiene bucal Fabricación de combustibles para reactores nucleares y pozos petrolíferos	Lavandería y papel Odontología Hidrocarburos
Iodo	Desinfectante para el tratamiento de agua	Aguas residuales (No muy recomendado)
Bromo y cloro	Blanquear y tratar lana para que no encoja	Textil
Dióxido de cloro	Tratamiento de agua potable y de piscinas Blanqueador de cueros, carnes, verduras y pescado. Bactericida y antiséptico	Agua potable y residual Alimentos

Fuente: Adaptado de Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo (ob. cit)

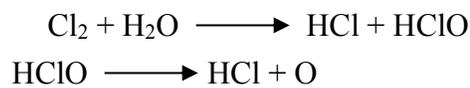
b.1.3.1. Cloro y compuestos clorados: Los compuestos clorados están muy extendidos en la naturaleza, constituyendo alrededor del 2 % de la superficie terrestre, principalmente en forma de cloruro sódico en el

agua del mar y en depósitos naturales como los de carnalita y silvina. Por consiguiente, comprimidos en forma líquida, es muy empleado para depurar abastecimiento de agua municipal. Dentro de ellos, como polvo o soluciones se usan frecuentemente:

. **Hipocloritos:** Muy empleado en la industria alimentaria para la desinfección de las superficies. Las soluciones más ampliamente usadas de ácido hipocloroso en el sector industrial son aquellas con sales de hipoclorito de sodio [NaOCl], que tienen un cloro activo de 10-14% y las sales de hipoclorito de calcio [Ca(OCl)₂], que contienen 30% de cloro activo. El sódico es empleado en concentraciones del 1% para higiene personal y del 5 al 12% para desinfección casera. Se emplea también como blanqueador para la ropa.

Igualmente se emplea el hipoclorito de calcio conocido como cal clorada, en concentraciones de 5 al 70%, que es muy eficiente para la limpieza y desinfección de la industria láctea y en sistemas de servicio de comida, como restaurantes y comedores. Es importante tomar en cuenta que no debe emplearse directamente en utensilios reutilizables en el que se han servido alimentos, sin antes retirarlos con agua y jabón, porque puede generar compuestos tóxicos en los que puede haber presencia de cloroformos.

El modo de acción se basa en que el cloro y los compuestos clorados se combinan con las proteínas de la membrana celular y con las enzimas, para así reducir o interferir en la síntesis de proteínas u oxidar el grupo amino (-SH-, -NH₂-), o los núcleos de indol de las enzimas y coenzimas. Además tiene acción germicida en células vegetativas, esporas y virus, en la que la formación de ácido hipocloroso que se genera al añadir cloro al agua, que luego se descompone a cloruro de hidrógeno (HCl), en el que el oxígeno liberado lo convierte en un fuerte agente oxidante de los constituyentes celulares.



En la industria la desinfección es llevada a cabo a pH neutro o ligeramente ácido, teniendo cuidado de no acidificar demasiado la solución porque cuando el pH está por debajo de 4 se libera gas cloruro que es altamente tóxico.

. **Iodo:** Es un agente altamente efectivo y es único en cuanto a su efectividad contra toda clase de bacterias, esporas, hongos y virus. Por ser halógeno, constituye un agente de oxidación de los grupos -SH-, -NH₂- o los núcleos de indol de las enzimas o coenzimas. Las soluciones son utilizadas principalmente para tratamientos cutáneos, particularmente como desinfectante de la piel, sobretodo en las preoperaciones.

b.1.4. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂): Según González y otros (2010), es un compuesto químico muy reactivo, conocido también como agua oxigenada, estructurado por hidrógeno y oxígeno. Este producto

puro es un líquido incoloro, mientras que el que se comercializa como solución acuosa, tiene un contenido de hasta 33-37% del compuesto reactivo y otros aditivos que impiden la descomposición del mismo.

Es un antiséptico general que actúa sobre los microorganismos, haciendo vulnerables las estructuras de protección de las células, con efectos oxidantes, mediante los siguientes mecanismos de acción:

- . Oxidación de los grupos sulfhídrico y los dobles enlaces de las enzimas de las bacterias.
- . Provoca una alteración conformacional de las proteínas que crean enzimas determinantes del microorganismo, con la pérdida de su función y por lo tanto, la muerte celular.
- . A nivel de virus puede trasladar esta capacidad de desnaturalización de las proteínas actuando sobre la de las cápsides, para que posteriormente pueda ejercer efecto sobre el material genético del mismo.
- . A nivel de esporas, la enzima catalasa presente en los tejidos degrada el peróxido de hidrógeno, produciendo oxígeno y así puede trasladar su poder oxidante a la desorganización del ácido dipicolínico, dificultando la germinación de esporas anaerobias.

b.1.5. Metales pesados y sus compuestos: Son grupos químicos no muy bien definidos que tienen propiedades metálicas. Dentro de ellos están los de plata y cobre, además de algunos tóxicos como mercurio, plomo, cadmio y arsénico. Ellos ejercen un efecto oligodinámico a pequeñas cantidades, evitando crecimiento de microorganismos en los ambientes donde se presentan trazas de estos compuestos. Tienen también un efecto bacteriostático por reaccionar con los grupos –SH- de enzimas o coenzimas, precipitando así las proteínas (Pommerville, 2017).

Los compuestos de metales pesados, por su parte, tienen actividad germicida o antiséptica, siendo los de mayor uso los de mercurio y compuestos orgánicos de él; como el merthiolate, que hoy día se usa en presentación blanca (benzalconio), en concentraciones de 0,1 a 0,2%. Es un antiséptico de heridas pequeñas, actuando eficientemente sobre bacterias Gram positivas y negativas, virus y hongos. Tienen mayor uso terapéutico en piel que en la limpieza y desinfección de industrias de alimentos.

Se tiene también el cloruro de mercurio [HgCl₂], empleado como desinfectante y no en equipos de procesamiento de alimentos por ser muy tóxico, causante de hemorragias estomacales e intestinales, daños renales y del cerebro. Se utilizaba como aditivo en el tabaco y como purgante y catártico para eliminar parásitos. En este aspecto Gimferrer (2011), determina que hoy día no es muy recomendado su uso en la industria de alimentos por sus emitir vapores corrosivos y tóxicos a temperaturas por encima de 40 °C, siendo irritantes para ojos, piel y vías respiratorias.

Dentro de las principales aplicaciones del mercurio se tienen:

- Extracción de oro y plata de las minas.
- Auxiliar en la producción de químicos de cloro-álcali.
- En manómetros, que miden y controlan la presión.

- En termómetros, para medir la temperatura.
- En interruptores eléctricos y electrónicos.
- En lámparas fluorescentes.
- En amalgamas dentales, aleado con otros metales.

Igualmente, los compuestos de mercurio tienen, entre otras, las siguientes aplicaciones:

- En pilas.
- Como biocidas, para controlar o destruir microorganismos, por ejemplo en la industria del papel, en pinturas o en semillas.
- Como antisépticos en productos farmacéuticos.
- Para análisis químicos.
- Como catalizadores, para hacer más eficaz la fabricación de otras sustancias químicas, en pigmentos y tintes, detergentes y explosivos.

b.1.6. Detergentes: Son sustancias con propiedades físico – químicas, que eliminan la suciedad sin corroer el material, por tener la capacidad de disminuir la tensión superficial de las partículas adheridas a una superficie. Tiene además capacidad humectante y de enjuague. Rompen las membranas celulares por combinarse con lípidos o proteínas, con salida de compuestos nitrogenados y de fósforo.

Dentro de los detergentes se tienen los aniónicos y catiónicos.

. **Aniónicos:** Son más activos en soluciones ácidas, con propiedad detergente en el anión, siendo muy empleado en medios de cultivos selectivos, eliminando bacterias Gram positivas. Ejemplo: Lauril sulfato sódico $[\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3]^- \text{Na}^+$

. **Catiónicos:** Más activos en soluciones alcalinas, con propiedades detergentes en el catión, siendo muy empleado para la desinfección de la piel, limpieza o actividad de productos; eliminando bacterias Gram positivas y Gram negativas. Dentro de ellos están los haluros de amonio cuaternario, cuyo modo de acción antimicrobiana se realiza por: inhibición enzimática, desnaturalización de proteínas y disrupción de la membrana celular, con pérdida de constituyentes vitales.

b.1.7. Aldehídos: Son compuestos orgánicos caracterizados por poseer el grupo funcional $-\text{CHO}$. Entre ellos están el glutaraldehído y el formaldehído. El primero de ellos tiene efecto de amplio espectro antimicrobiano entre 0,1 a 1,0%, siendo efectiva contra bacterias vegetativas, esporas bacterianas, hongos, esporas fúngicas y virus. Muy empleado en la estandarización de materiales urológicos, en la fabricación de resinas, plásticos, solventes, pinturas, perfumes y esencias, desinfección de equipos médicos, odontológicos y de laboratorio. No es muy recomendado en la industria de alimentos por ocasionar enfermedades ocupacionales en los trabajadores como dermatitis, alergia respiratoria y asma.

El formaldehído puede obtenerse de la oxidación semiparcial del metanol sobre catalizadores sólidos. Puede adquirirse como paraformaldehído, que al calentarse libera este compuesto, o en solución acuosa que contiene del 37 al 40% de formaldehído. Reacciona con grupos $-NH_2$ - y $-OH$ -, donde la presencia de materia orgánica extraña la modifica muy poco. Es eficaz contra las esporas bacterianas, reaccionando con sus enzimas y ácidos nucleicos, además de coagular proteínas. Sus gases se emplean mucho en la esterilización de ambientes cerrados como laboratorios, aunque es muy indeseable porque sus vapores son muy irritantes de piel y ojos.

b.1.8. Quimiestabilizadores gaseosos: Métodos para esterilizar materiales sensibles a las altas temperaturas, como jeringas, materiales de plástico, piezas de tela, vidrio; además de áreas cerradas. Para ello se utiliza el óxido de etileno, exponiéndose este gas en una zona confinada a temperatura ambiente, con la objeción de ser muy inflamable, aún a bajas concentraciones. Es bastante efectivo contra esporas bacterianas y de alto poder de penetración. Su acción es por inactivación de enzimas del microorganismo.

b.1.9. Ácidos o álcalis: Los ácidos son sustancias químicas que cuando se disuelven en agua, producen una solución con una actividad de catión hidronio mayor que el agua pura, lográndose un pH menor que 7. Un álcali es un compuesto químico que tiene carácter básico, cuyo pH supera la neutralidad. Su efecto está en los iones OH^- , quienes destruyen las membranas y paredes celulares, siendo muy utilizados en la desinfección de corrales, criaderos de aves, cerdos, lavado de utensilios de cocina y artefactos; además de emplearse en la industria de alimentos, sobretodo en la láctea.

Entre los más empleados están la sosa cáustica ($NaOH$: hidróxido de hidrógeno); cuyo pH es de 13,5; siendo muy utilizado para destapar sistemas de tubería doméstica, fregaderos, inodoros, elevar pH en piscinas, en la fabricación de jabones, procesamiento de algodón, lavandería, entre otros. Otro muy utilizado es el agua de cal [$Ca(OH)_2$], empleado en aguas de consumo y aguas residuales industriales de carácter inorgánico, además de lodos orgánicos.

b.1.10. Antibióticos: Sustancia química de origen microbiano o derivado sintético, que en muy pequeña cantidad posee actividad contra estas células, eliminándolas o impidiendo su crecimiento. Para Madigan y otros (ob. cit), es una sustancia secretada por un microorganismo, que tiene la capacidad de afectar a otros microorganismos. El objetivo es conseguir la erradicación del microorganismo patógeno; por lo que es necesario aplicar una dosis en una concentración superior a la mínima con la que es capaz de inhibirlo.

Se considera ideal cuando:

- . Es de amplio espectro; es decir, efectivo contra muchas especies.
- . Evita el desarrollo de formas resistentes de parásitos.

. No debe eliminar la flora microbiana del hospedador, debido a que la alteración de la flora normal puede estropear el equilibrio natural corporal, permitiendo que los microorganismos patógenos o patógenos restringidos, establezcan una nueva infección.

. No debe producir en el huésped efectos secundarios indeseables como reacciones alérgicas, alteraciones nerviosas, irritaciones renales y del tracto gastrointestinal.

. No debe inactivarse por los ácidos del estómago al administrarse oralmente, además de no unirse a las proteínas de la sangre al inyectarse, para así no precipitarlas.

. Lograr concentraciones elevadas en tejidos o en la sangre, que inhiban o maten al agente infeccioso.

. Deben ser estables.

. Deben ser solubles en agua, solución salina y líquidos corporales.

Dentro de las sustancias más empleadas se tienen las siguientes clases, que están agrupadas por estructura: aminoglucósidos, ansamicinas, carbacefen, carbapenem, cefalosporinas (desde primera a quinta generación), glicopéptidos, macrólidos, monobactámicos, penicilinas, polipéptidos, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas, fenicoles y otros como lincomicina y etambutil.

La acción que ejerce el antibiótico en la célula microbiana es muy variable, dependiendo la clase. Dentro de su acción antimicrobiana está:

. Inhibir la síntesis de proteínas.

. Bloquear la formación de genes anormales.

. Inhibir síntesis de pared celular bacteriana.

. Prevenir la división celular bacteriana, inhibiendo la síntesis de pared celular.

. Interrumpir la síntesis de peptidoglicano.

. Alterar la permeabilidad de la membrana citoplasmática.

. Inhibir la replicación y transcripción del ADN.

. Bloquear la biosíntesis de ácidos grasos.

. Actuar sobre las proteínas que transportan electrones en la cadena respiratoria de los ácidos grasos.

. Producción de radicales libres tóxicos para los parásitos.

Muchas cepas microbianas han desarrollado resistencia a determinados antibióticos, por lo que para el año 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS), publica una lista de patógenos invulnerables a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. Esta surge por la imperante necesidad de guiar y promover la investigación y desarrollo (I+D) de nuevos antibióticos, como parte de las actividades de este organismo para combatir el creciente problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos. Dentro de este elenco se tienen las siguientes prioridades:

Prioridad 1: CRÍTICA

- . *Acinetobacterbaumannii*, resistente a los carbapenémicos.
- . *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos.
- . Enterobacteriaceae, resistentes a los carbapenémicos, productoras de betalactamasas de espectro extendido (ESBL).

Prioridad 2: ELEVADA

- . *Enterococcusfaecium*, resistente a la vancomicina.
- . *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina.
- . *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina.
- . *Campylobacter* spp., resistente a las fluoroquinolonas.
- . *Salmonellae*, resistentes a las fluoroquinolonas.
- . *Neisseriagonorrhoeae*, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas.

Prioridad 3: MEDIA

- . *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina.
- . *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina.
- . *Shigella* spp., resistente a las fluoroquinolonas.

4.3.2. Pasteurización: Método creado por Louis Pasteur en 1864, junto a Claude Bernard, que consiste en somerter al producto líquido a temperaturas de calentamiento por debajo de los 100 °C, con la intención de eliminar flora termosensible, que, a diferencia de la esterilización, no destruye esporas de microorganismos, ni es capaz de eliminar flora termofílica. La intención es controlar el desarrollo microbiano de los alimentos líquidos, alterando lo menos posible sus características físicas, químicas y organolépticas, garantizando así seguridad alimentaria. Para Barbosa y Bermúdez (ob. cit), la pasteurización se usa comúnmente para productos alimenticios de alta acidez (pH < 4,6), y así extender la vida útil del producto durante corto tiempo, que puede ser un par de semanas. También es utilizada para alimentos de baja acidez seguida de refrigeración.

Este proceso se emplea cuando:

- . El alimento generalmente es líquido.
- . Los tratamientos térmicos más elevados dañarían el producto.
- . Uno de los fines perseguidos es la destrucción de los gérmenes patógenos, que pudiesen generar intoxicaciones, como en la leche que se busca eliminar: *Mycobacterium tuberculosis*, *Coxiellaburnetti*, *Escherichiacoli*, *Brucellamelitensis* y *Brucellaabortus*.

. Los agentes de alteración más importantes no son muy termorresistentes, como la levadura de los jugos de las frutas.

. Los microorganismos supervivientes se controlan por otros métodos de conservación adicionales, como ocurre en la refrigeración de la leche pasteurizada y homogeneizada.

. Se destruyen los agentes competitivos, permitiendo una fermentación beneficiosa que generalmente se realiza por la adición de algunos fermentos o iniciadores, como la elaboración de quesos.

Dentro de este proceso de pasteurización se pueden aplicar métodos térmicos y no térmicos.

4.3.2.1. Térmica: Se realiza con la finalidad de reducir la población de microorganismos patógenos y/o deteriorativos, a la vez de desactivar enzimas que pueden modificar las características del alimento. En términos generales, se emplean temperaturas por debajo del punto de ebullición de cualquier tipo de alimento, dado que en la mayoría de los casos, al ser superiores al mismo, pierden irreversiblemente ciertas condiciones físicas y químicas del producto. Dentro de las térmicas se tienen:

a. Mantenimiento a baja temperatura (LHT: Low Temperature Holging): Conocido como proceso VAT, de tinaja o calentamiento lento. Consiste en someter al líquido a un calentamiento a 63 °C por 30 minutos en recipientes grandes, para luego dejar enfriar en un tiempo previsto o hasta alcanzar condiciones de manejo. Fue el iniciador de esta operación unitaria presentado por Pasteur y por ello; en honor a su nombre, se denominó tal cual como se lee: Pasteurización.

Se considera hoy día un método artesanal por no manejarse, en general en un ambiente cerrado y por lo lento del proceso; sin embargo, por ser económico, se emplea aún en algunos procesos de manufactura de alimentos a nivel de instalaciones domésticas, rurales, comunitarias, en las que no hay fondos suficientes para adquirir una tecnología de avanzada en este proceso. Un ejemplo típico es la pasteurización de la leche en algunas fincas para elaborar quesos.

b. Mantenimiento a elevada temperatura corto tiempo (HTST: High Temperature/ Short Time): Es una técnica de calentamiento del producto, bien sea en lote (batch) o en flujo continuo, en el que se hace pasar por intercambiadores de calor, a una condición operativa de 72 °C por 12 - 15 segundos, lográndose así una mayor automatización del proceso. Es muy empleado en algunas plantas de elaboración de cervezas, tratamiento de leche cruda, yogures, helados, jugos de frutas, sopas, entre otros. Su principal ventaja es la rapidez del efecto de reducción microbiana, pudiendo manejarse mayores volúmenes de producción y su desventaja es la operatividad del equipo, la cual debe hacerse por personal especializado en el mismo. Además de su costo de adquisición y mantenimiento.

c. Proceso UHT: Conocido como ultrapasteurización o uperización, es un proceso térmico que se realiza en un proceso continuo de procesamiento de alimentos líquidos, a temperaturas cercanas a 150 °C por corto espacio de tiempo, siendo una condición operativa común la de 149 °C por 1 a 2 segundos, reduciéndose

así un gran número de microorganismos presentes en estos productos líquidos, sin alterar mucho las condiciones y propiedades bromatológicas.

Se pudiese pensar que con este método se consigue una completa esterilización, sin embargo no es así porque no se logra una destrucción total de la flora presente; algunos sobreviven a esta acción, eliminándose células vegetativas en su totalidad, pero no todo el conglomerado de endoesporas. Se consigue una esterilización comercial en combinación con la sinergia de aplicación del control de otro factor de crecimiento, debido a que la esterilidad absoluta puede degradar innecesariamente la calidad del alimento. Significa que el producto se puede mantener estable a condiciones de almacenamiento, ni supone un peligro para la salud del consumidor.

4.3.2.2. No térmica: Se lleva a efecto a temperaturas por debajo de lo habitual del proceso térmico, generalmente a condiciones de tiempo ambiental, con el objeto principal de convertir el alimento en inóculo e idóneo; es decir, sin representar un riesgo fehaciente de toxiinfección, al manejarse con otras barreras de conservación que prolonguen su vida útil.

Para lograr este efecto de inocuidad, se ha avanzado mucho hacia la conservación con aplicación de prácticas de mínimo proceso, surgiendo desde entonces tecnologías emergentes, orientadas a incrementar su vida útil y mantener su calidad original; siendo el el objetivo principal de estas nuevas tácticas, el procesamiento de un producto seguro que conserve sus características sensoriales en la mayor medida posible así como el contenido de nutrientes. Dentro de estas propuestas se tienen:

a. Altas presiones hidrostáticas (APH): Es una tecnología de gran interés en la industria de los alimentos debido a que es efectiva en la conservación de los mismos. Aunque se considera más como una alternativa de pasteurización; por ir avanzando progresivamente en la destrucción de esporas, se promueve como una técnica de esterilización en constante crecimiento. Se denomina también pascalización, presurización o simplemente alta presión. Para Tellez y otros (2001), la APH provoca la inactivación de las células microbianas sin alterar la calidad sensorial ni los nutrientes de los alimentos. Es muy aplicado en la pasteurización de jugos de frutas, mermeladas, jaleas de manzana.

Entre sus ventajas de aplicación están:

. El tratamiento evita la deformación de los alimentos, debido a que la presión se transmite uniforme e instantáneamente. A diferencia de lo que ocurre con los procesos térmicos, el tratamiento APH es independiente del volumen y de la forma de la muestra, con lo que se reduce el tiempo requerido para procesar grandes cantidades de alimentos.

. No produce deterioro de nutrientes termolábiles como por ejemplo vitaminas (no destruye la vitamina C en los zumos), frente a los métodos tradicionales de pasteurización; ni altera otros compuestos de bajo peso molecular, fundamentalmente aquellos responsables del aroma y sabor.

. No se altera el sabor natural, ni la coloración del alimento, pues las altas presiones no favorecen la reacción de Maillard o de pardeamiento no enzimático.

. No produce residuos, se trata de una energía limpia, lo que iría en consonancia con las políticas medioambientales de la actualidad.

. No precisa de la incorporación de aditivos al alimento.

. Mejora o provoca la aparición de propiedades funcionales en los alimentos.

. Tiene poco gasto energético.

Con respecto a las desventajas se tienen las siguientes:

. El alto costo del equipo.

. Con los equipos de APH disponibles hasta ahora en el mercado, se dificulta el diseño de procesos continuos, aunque sí hay algunos discontinuos que operan en línea (ejemplo: zumos de frutas).

. Imposibilidad de aplicación en algunos alimentos (frutas, verduras) porque perderían su forma y aspecto original.

. La desconfianza del consumidor a decidirse a comprar un producto “presurizado” por ser algo novedoso y desconocido.

En este particular, Velázquez y otros (2005), determinaron que el mayor grado de inactivación sobre los microorganismos se lleva a cabo en la etapa logarítmica de crecimiento, donde los microorganismos Gram negativos son más sensibles a las altas presiones; les siguen las levaduras, hongos, los Gram positivos y por último las esporas; en los que el modo de acción preponderante es el incremento de la permeabilidad de la célula, lo que ocasiona inhibición de reacciones energéticas y desnaturalización de enzimas esenciales para el crecimiento y reproducción de la célula.

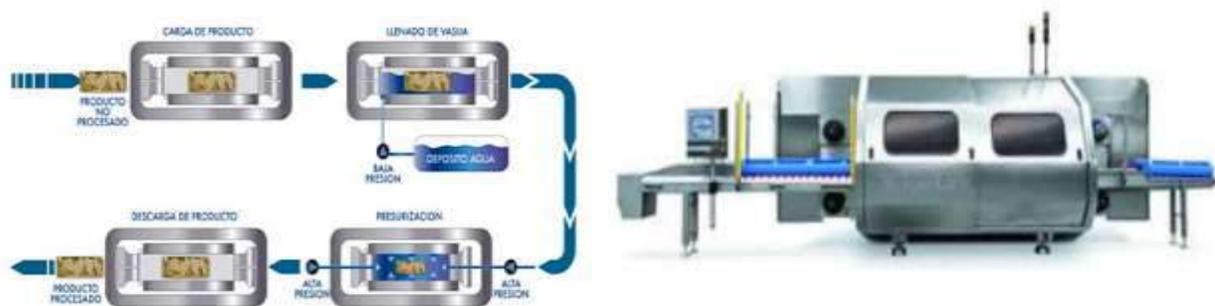


Figura 75. Esquema de funcionamiento de una unidad APH (arriba). Equipo de APH (abajo).

Fuente: Pradas y Moreno (2016).

Por otra parte, informan estos autores que se aplica presión al alimento envasado de manera isostática, superior a 400 MPa por espacio de 5 a 20 minutos para células vegetativas y para esporas 1000 MPa, en ese mismo intervalo. El proceso se lleva a cabo en un equipo que consta de una cámara de tratamiento con

chaqueta, un sistema generador de alta presión, un medio transmisos de presión y un controlador de temperatura.

b. Pulsos de alta intensidad de campo eléctrico (PEF): Los campos eléctricos pulsantes de alta intensidad (CEPAI) constituyen una de las tecnologías más prometedoras para la conservación de los alimentos, que involucra la utilización de pulsos eléctricos de alto voltaje en el alimento colocado entre dos electrodos, para de esta forma lograr pasteurizar alimentos líquidos (Fernández y otros, 2001). El tratamiento se realiza a temperatura ambiente o por debajo de ésta, en milésimas de segundos, y las pérdidas de energía por calor son minimizadas.

Para Cerón, Palou y López (2010), esta tecnología es considerada superior al tratamiento térmico convencional debido a que reduce grandemente los cambios que ocurren en las propiedades sensoriales (sabor, color), y físicas (textura, viscosidad) de los alimentos; además de conservar los atributos sensoriales de ellos, sin introducir cambios químicos significativos, pudiendo no ser considerado como aditivo alimentario. Por el contrario, es una tecnología efectiva, segura y limpia.

Es una tecnología emergente que se trabaja con interruptores de alto voltaje a frecuencias altas (0,1 a 5000 Hz) por espacio de 0,14 a 5 segundos, a un voltaje de 15 a 80 kV/cm. A estas condiciones operativas se logra una ruptura dieléctrica de la membrana celular por electroporación, donde las cargas acumuladas en ambos lados de la membrana celular se atraen, por lo que se comprime y su espesor se reduce , dando por resultado la destrucción física, siempre y cuando el tamaño del poro sea de 0,3 a 0,5 nm.



Figura 76. Equipo de pulsos eléctricos de alta intensidad

Fuente: Rivas (2012)

Los estudios realizados han demostrado su efecto en la inactivación de células vegetativas como: *Escherichiacoli*, *Salmonella typhimurium*, *Stretococcus thermophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Pseudomona fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, entre otros; donde las bacterias son menos sensibles que las levaduras y las esporas son más resistentes. Las bacterias Gram positivas son más resistentes que las Gram negativas ante este proceso no térmico. Es muy empleado en la industria de jugos de frutas de Alemania y Estados Unidos, al igual que en leche, yogurt y huevo líquido.

c. Campos magnéticos oscilantes (CMO): Son campos generados por pulsos de naturaleza electromagnética, empleando para ello electromagnetos de corriente alterna. Se logra la inactivación microbiana con estos campos, empleando pulsos de 5 a 50 Teslas (1 Tesla = 10.000 Gauss), generado con bobinas superconductoras. Con estas condiciones se logra una reducción del número de células vegetativas por autólisis y con efecto inhibitorio en el crecimiento del microorganismo (Fernández y otros, ob. cit).

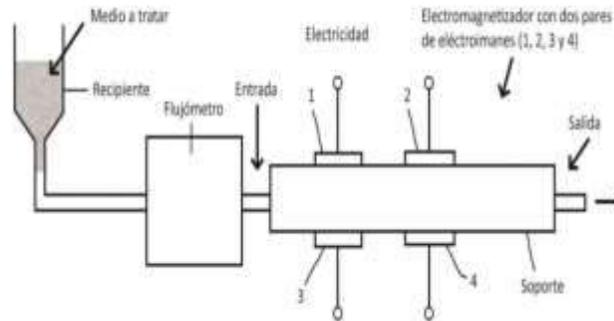


Figura 77. Campos magnéticos y oscilantes en la conservación de alimentos

Fuente: Zapata y otros (2005)

d. Ondas sónicas y ultrasónicas: Son ondas sonoras de alta frecuencia, que se usan para desintegrar células microbianas y para eliminar microorganismos del equipo y cualquier partícula de polvo o de otro material (incluido los microorganismos) de la superficie de los utensilios que hay en el líquido, siendo entonces efectivo para descontaminar instrumentos delicados para su limpieza. Tiene usos también en técnicas especializadas de diagnósticos y cirugías.

Su mecanismo de acción para destruir flora sensible en la industria de alimentos, es por el uso de unidades llenas de líquidos, a través del cual pasan ondas sonoras que permiten que se produzcan pequeñas burbujas, que cuando alcanzan un cierto tamaño, estallan violentamente, en ciclos de compresión y expansión. Este fenómeno es conocido como cavitación, donde la fuerza generada permite eliminar agentes microbianos presentes, por ruptura de su pared celular.

e. Irradiaciones: Consiste en exponer los alimentos, envasados o a granel, a cantidades controladas de radiaciones ionizantes (generalmente rayos gamma) durante un período de tiempo dado para conseguir ciertos objetivos deseables (Forsythe, ob. cit). Para este autor, en alimentos se pueden establecer mediante radiaciones ionizantes, por electrones de alta energía u ondas electromagnéticas producidas por elementos radiactivos como rayos X o rayos gamma; logrando su efecto por prevención del desarrollo de bacterias al dañar su ADN, así como poder retrasar la maduración de productos vegetales al originar en sus tejidos ciertas reacciones bioquímicas.

La irradiación máxima para alimentos está en el orden de 1 a 10 kGy (la unidad de medida es el Gray, que equivale a un Jul de energía absorbido por kg de alimento irradiado), y ha sido una técnica aceptada por más de 60 países. Genera una reducción y no eliminación total de ciertas especies como: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocitogenes* y *Vibrio spp*, asociados a carnes, agua y productos del mar. En el ámbito médico se utiliza para esterilizar implementos quirúrgicos, material hospitalario, soluciones, entre otras. Si se aplica por encima de 10 kGy, puede lograrse la esterilización; sin embargo, es contraproducente por generar reducciones significativas en los componentes de los alimentos, como vitaminas en frutas.

En este mismo orden de ideas, las radiaciones no ionizantes, como tecnología ultravioleta, se utiliza mucho para controlar crecimiento microbiano en ambientes cerrados, superficies de alimentos y otros enseres empleados en la agroindustria, con niveles bactericidas de 265 nm.

REFERENCIAS CONSULTADAS

- Abello Linde Corporation. 2019. Congelación y refrigeración de alimentos. [Documento en línea] https://www.abellolinde.es/es/processes/freezing_and_cooling/food_chilling_and_freezing/index.html . [Consulta: Abril 5, 2019]. España: Madrid.
- Air Liquide CreativeOxigen. 2019. *Ultracongelación de alimentos*. [Documento en línea] <https://industrial.airliquide.com.mx/industrias/alimentos>. [Consulta: Abril 5, 2019] México.
- Barbosa-Cánovas, G. V., y Bermúdez-Aguirre, D. 2010. *Procesamiento no térmico de alimentos*. Scientia Agropecuaria. [documento en línea] <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=357633694008>[Consulta: Mayo 4, 2019]
- Benedykt, A. 2014. *Sustainable Process Engineering. Prospects and Opportunities*.EEUU: Walter de Gruyter GmbH & Co KG. 411p.
- Bernad: Equipamiento e industria de alimentos. 2019. *Técnicas de congelación de alimentos*. [Documento en línea] <https://www.josebernad.com/tecnicas-de-congelacion-de-alimentos/>. [Consulta: abril 5, 2019] España: Albacete.
- Caracuel, A. 2015. *Usos de los sulfitos como conservantes y necesidad de su control en alimentos*. Restauración colectiva. [Documento en línea] <https://www.restauracioncolectiva.com/autor/ngel-caracuel>. [Consulta: mayo 2, 2019].
- Cerón, T; Palou, E y López, A. 2010. *Pulsos eléctricos: Fundamentos y aplicaciones en alimentos*. México: Universidad de las Américas. Dpto. de Ing. Quím, Alim. y Amb. Temas selectos de ingeniería de alimentos (4)1: 9 – 26.

- Escobar, A; Márquez, C; Restrepo, C y Pérez, L. 2013. *Aplicación de tecnología de barreras para la conservación de mezclas de vegetales mínimamente procesados*. Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín 67(1): 7237-7245. 2014.
- Fernández, J; Barboza, G y Swanson, B. 2001. *Tecnologías emergentes para la conservación de alimentos sin calor*. Arbor CLXVIII, 661 (enero 2001). 155-170p.
- Forsythe, S.J y Hayes, P.R. 2007. *Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP*. (2da. Ed). España: Acribia, S.A. 489p.
- Forsythe, S.J. 2003. *Alimentos seguros: Microbiología*. España: Editorial Acribia, S.A. 410p.
- Frazier, W.C y Westhoff, D.C. 2017. *Microbiología de los alimentos*. (4ta. Ed). España: Editorial Acribia, S.A. 681p.
- Gimferrer, N. 2011. *Mercurio en alimentos*. EROSKI Consumer. [Documento en línea]<http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2011/09/12/203056.php>. [Consulta, mayo 5, 2019].
- González, E. 2010. *Producción de peróxido de hidrógeno*. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile. Facultad de Química. [Documento en línea] <https://es.scribd.com/doc/103301394/Produccion-de-Peroxido-de-Hidrogeno-Erick-Gonzalez>. [Consulta Mayo 4, 2019]. 1 – 12p.
- Leistner, L. 2000. *Basic aspects of food preservation by hurdle technology*. International Journal of Food Microbiology (55): 181– 186.
- López, L. 2014. *Óxido de etileno, utilización como agente esterilizante y riesgos para la salud del personal sanitario*. Universidad de Antioquia. Colombia: Medellín. CES Salud Pública. 2014; 5: 154-162.
- Madigan, M; Bender, K; Buckley, D; Matthew, W; Stahl, D; Dale, T y Martinko, J. 2015. *Biología de los microorganismos*. (14ª. Ed). EEUU: Pearson. 2830p.
- Pommerville, J. 2017. *Fundamentos de microbiología*. EEUU: Jones & Bartlett Learning; Edición. 944p.
- Pradas, I y Moreno, J. 2016. *Aplicación de altas presiones hidrostáticas en la industria alimentaria*. España: Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Córdoba: 1-18 p.
- Raffino, M. 2018. *Fermentación*. [Documento en línea] <https://concepto.de/fermentacion/#ixzz5sxTwTRuX>. [Consulta: Mayo 4, 2019]
- Reynoso, M; Magnoli, C; Barros, G y Demo, M. 2015. *Manual de microbiología general*. (1ra. Ed). Argentina: Universidad Nacional de Río Cuarto. 105p.
- Rivas, A. 2012. *Aplicación de Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad en una bebida mezcla de zumo de naranja y leche: Efectos sobre Escherichiacoli, Saccharomycescerevisiae, componentes nutricionales y calidad*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España. 270p.
- Rodríguez, E. 2011. *Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas*. Rev. Ra Ximhai (7)1: 153 – 170.

- SanSebastiano, R y Zoni, L. 2017. *Desinfectantes y su uso en la industria de alimentos. (Parte 1)*. República Dominicana: AgroBiotek. [documento en línea] <https://sanidadealimentos.com/tag/roberta-zoni-laura-bigliardi/>. [Consulta: Mayo 8, 2019]
- Sharma, S.K, Mulvaney, S.J., Rizvi,S.S.H. 2010. *Ingeniería de Alimentos. Operaciones unitarias y prácticas de laboratorio*. México: Editorial Limusa, S.A. 358p.
- SoloStocks. 2019. *Liofilizador industrial para alimentos y frutas*. [venta en línea] <https://www.solostocks.com/>. [Consulta: Mayo 3, 2019].
- Tellez, L; Ramirez, J; Pérez, C; Vázquez, M y Simal, J. 2001. *Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de alimentos*. Cienc. Tecnol. Alim. (3)2: 66 – 80.
- Torrealba, M. 2013. *Constructo teórico de la gestión del conocimiento en comedores escolares. Un acercamiento etnográfico complejo a la inocuidad*. Trabajo de ascenso. UNELLEZ – VIPI. Venezuela: San Carlos. 322p.
- Velázquez, G; Vázquez, P; Vázquez, M y Torres, J. 2005. *Aplicaciones del procesado de alimentos por alta presión*. Cienc. Tecnol. Aliment. (4)5, 343-352.
- Zapata, J; Moreno, G y Márquez, E. 2005. *Acción de un campo magnético sobre un cultivo aireado de Saccharomyces cerevisiae*. Interciencia (30)7: 111 – 123.

CAPÍTULO V

MICROORGANISMO Y ENFERMEDAD

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son células procariotas o eucariotas que ejercen funciones metabólicas propias, de las que pueden resultar determinados efectos en el alimento y en quienes los consuman, alterando el equilibrio fisiológico del huésped. Esta condición se manifiesta cuando el agente responsable de ello es capaz de desarrollar metabolitos secundarios en el ambiente donde se localice, representando una amenaza para el consumidor o usuario del producto. Es importante recordar la teoría que especifica: toda enfermedad tiene un agente causal; por lo que para la microbiología de alimentos, es fundamental estudiar y conocer los grupos microbianos y sus efectos, tanto en el producto como en quien los ingiere.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos se presentan cuando se consumen de fuentes contaminadas con microorganismos patógenos o sus toxinas, generándose toxiinfecciones, con síntomas comunes como molestias estomacales, náuseas, vómitos, diarrea y fiebre. Es por ello que en este capítulo se abordan grupos de enfermedades e intoxicaciones causadas por la ingesta de alimentos contaminados, así como lo relativo a aspectos básicos de la inocuidad e idoneidad de su manejo para establecer un adecuado y seguro uso en su consumo.

5.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Los trastornos de salud por ingestión de alimentos pueden asociarse a la presencia de agentes microbianos y sus toxinas en el mismo, como también por cantidades excesivas de aditivos y de elementos físicos. Todos estos agentes causales se manifiestan en sintomatologías en el huésped, que son muy similares unas con otras, por lo que suelen confundirse. Significa que al hablar de ETA se está haciendo referencia a cualquier enfermedad causada por la ingestión de un alimento contaminado que ocasiona efectos nocivos en el consumidor (Huesca y otros, 2014).

En el siguiente esquema se presenta un sinóptico de las enfermedades alimentarias, en el que se establece un compendio de las mismas y de sus orígenes y sistemas de acción:

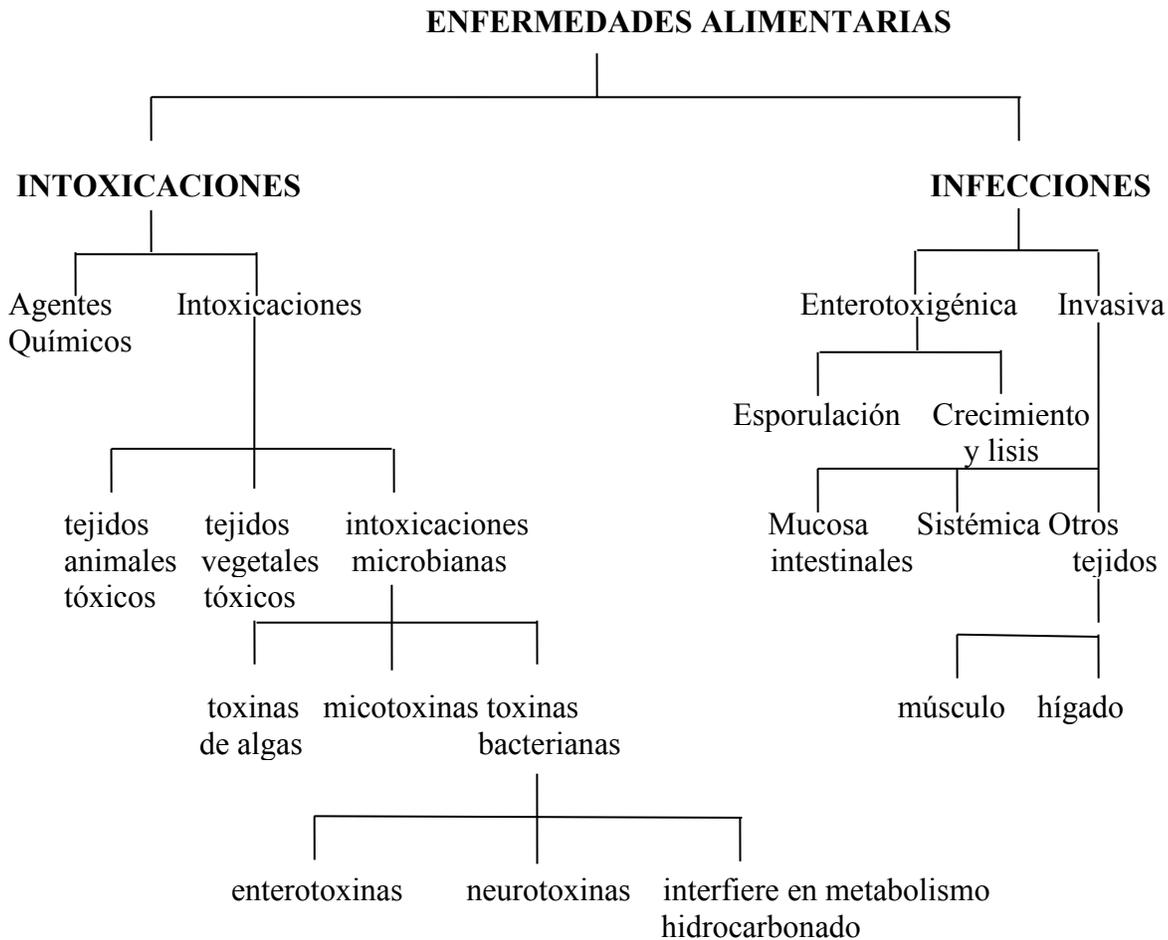


Figura 78. Enfermedades e intoxicaciones alimentarias.

Fuente: Adaptado de Frazier y Westhoff (2017)

El término intoxicación alimentaria establece que es el resultado de la ingesta de un producto en el que hay la presencia de uno o más agentes químicos o de la absorción de un tóxico de otra naturaleza, donde el actor causal se puede encontrar en ciertas plantas o animales de forma natural o ser un elemento metabólico excretado por microorganismos. Es así entonces como una intoxicación alimentaria microbiana es una enfermedad causada por la presencia de toxinas de este ser vivo, formándola en el alimento. Por otra parte, una infección alimentaria microbiana, es una enfermedad causada por la entrada del agente causal en el organismo, a través de la ingesta de alimentos contaminados, generando una consecuente reacción orgánica por presencia de estas células o de sus metabolitos.

De allí pues que las enfermedades microbianas de origen alimentario son las resultantes del consumo de cualquier alimento sólido o líquido, en el que la presencia de patógenos de naturaleza bacteriana o sus

toxinas, o de otra índole, repercuten en la inocuidad del producto. Si no es por incidencia bacteriana, se pueden suscitar por micotoxinas, virus, rickettsias, helmintos, protozoos y por el consumo de alimentos con sustancias tóxicas.

En efecto, ante esta perspectiva, la industria de alimentos y las autoridades sanitarias, deben mantenerse en constante vigilancia para asegurar los procesos de obtención y de esta manera reducir los niveles de riesgo que la sociedad considera razonable en el contexto de los que ocurren en la vida diaria y en comparación con ellos. La seguridad microbiológica de los alimentos se garantiza fundamentalmente por:

- . El control en su origen.
- . La supervisión del diseño del producto y de su procesado.
- . La aplicación de buenas prácticas de higiene durante la producción, procesado (incluido el etiquetado), manipulación, distribución, almacenamiento, venta, preparación y consumo.
- . Todo lo anterior debe ser aplicado conjuntamente con el sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (HACCP).

Es importante reseñar que la gran mayoría de los consumidores no son conscientes de que los alimentos constituyen un problema potencial de contaminación, si no se toman en cuenta los criterios de asepsia en su preparación o manufactura; por lo que con ellos se ingieren cantidades significativas de microorganismos y toxinas que pueden superar la dosis infectiva, estipuladas en la tabla 21. La intención es emplear estrategias que vayan en función al saneamiento de las industrias de alimentos, obligadas al trabajo aséptico durante la preparación, tratamiento y empaquetado de los productos, de la limpieza y aseo general de las fábricas e instalaciones, además de la salud de los empleados, dando así cumplimiento a las normas ISO 22.000 de inocuidad alimentaria.

5.2. Principales fuentes de peligros microbiológicos

Las fuentes corrientes de microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos son:

a. Ingredientes: En el que la disponibilidad de agua los convierte en idóneos para el crecimiento microbiano. Su nivel de contaminación microbiana va en función a las técnicas de conservación aplicadas; por lo que es primordial para la industria de alimentos, establecer controles de proveedores, en los que los certificados de calidad son una herramienta fundamental para generar confianza, pudiendo rechazarse cuando se comprueba que no cumplen con las normas de inocuidad establecidas.

Para cualquier industria de alimentos, adquirir materias primas de fuentes seguras, es una condición básica para obtener unidades de calidad, inócuas e idóneas para el mercado; todo ello basado en el principio de que para poder manufacturar un alimento con características organolépticas y nutritivas acordes a las exigencias y necesidades del consumidor, es relevante utilizar materias primas de fuente segura y de

estándares aceptables. Por el contrario, difícilmente se pueda obtener un producto de calidad con una materia prima que no está dentro de las exigencias normadas.

Tabla 21. Dosis infectiva de algunos patógenos entéricos

Microorganismo	Dosis infectiva mínima estimada (unidades formadoras de colonias)
Bacterias no esporuladas	
<i>C. jejuni</i>	1000
<i>Salmonella spp.</i>	$10^4 - 10^{10}$
<i>Sh. Flexneri</i>	$10^2 > 10^9$
<i>Sh. Dysenteriae</i>	$10 - 10^4$
<i>E. coli</i>	$10^6 - > 10^7$
<i>E. coli</i> O157:H7	10 – 100
<i>St. aureus</i>	$10^5 - > 10^6/g$
<i>V. cholera</i>	1000
<i>V. parahaemolyticus</i>	$10^6 - 10^9$
<i>Y. enterocolitica</i>	10^7
Bacreas esporuladas	
<i>B. cereus</i>	$10^4 - 10^8$
<i>Cl. Botulinum</i>	10^3
<i>Cl. perfringens</i>	$10^6 - 10^7$
Virus	
Hepatitis A	< 10 partículas
Norwalk afines	< 10 partículas

Fuente: Forsythe y Hayes (2007)

b. Personal: El ser humano, por ser de sangre caliente, alberga una serie de microorganismos, entre ellos se tienen:

b.1. Piel:

b.1.1. De forma común: *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus epidermidis*; *Sarcina lutea*; *Corynebacterium diphtheriae*; bacilos esporulados, *Candida albicans*, *Propionibacterium acnes*; entre otros.

b.1.2. Menos frecuentes: Enterobacterias y hongos.

b.1.3. Transitorios: *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pyogenes*, entre otros.

b.2. Aparato respiratorio:

b.2.1. Naríz: Estafilococos y difteroides (*St. epidermidis*, *St. aureus*, *C. diphtheriae*).

b.2.2. Faringe: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Branhamella catarrhalis*, *Corynebacterium diphtheriae*.

b.2.3. Tráquea, bronquios, pulmones: Se consideran estériles en condiciones normales; aún así pueden albergar de forma transitoria, a nivel de garganta, *St. aureus*.

b.3. Aparato digestivo:

b.3.1. Boca, encías, saliva, amígdalas y entre dientes: *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermidis*, *St. aureus*, *Lactobacillus spp*, *Candida albicans*, *Treponema denticola*, *Bacillus oralis*, entre otros.

b.3.2. Estómago: pH 1,2 (jugo gástrico). Obstrucción parcial con retención de alimentos. De forma transitoria pueden conseguirse levaduras, Sarcinas, Lactobacilos y Bacilos.

b.3.3. Intestino: Primeras porciones estériles. Predominan bacterias por síntesis de vitaminas del complejo B y vitamina K. Entre los predominantes están: *Lactobacillus (bifidus y acidophilus)*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium (perfringens y tetani)*, *Klebsiella spp*, *Proteus spp*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Candida albicans*.

b.4. Tracto genito – urinario: *St. epidermidis*, enterococos, difteroides, cocos Gram positivos, *Lactobacillus doderlein* (pH bajos).

c. El medio ambiente: En el que se contempla el ecosistema en el que se pudiesen desarrollar los microorganismos, dependiendo de las condiciones para su crecimiento; es decir, de los factores externos e internos donde se localicen en determinado momento. Estos ecosistemas pueden estar en el aire, agua, suelo, equipos de procesamiento, utensilios, fómites, personal, sistemas de almacenamiento, transporte, distribución y despacho; en el que se deben tomar en cuenta los criterios de asepsia para minimizar los efectos de contaminación cruzada.

d. Prácticas inadecuadas de procesamiento de alimentos y de almacenamiento: Involucra las fases de preparación de los productos, en las que deben llevarse a cabo bajo las condiciones operativas establecidas y de esta manera, aparte de lograrse las condiciones organolépticas y nutricionales adecuadas, se puedan inactivar enzimas y microorganismos causantes de alteraciones y perjuicios en el mismo. Dentro de este panorama de praxis, es importante tomar en cuenta los criterios de sistemas de calidad y de análisis de peligros y puntos de control críticos (HACCP).

En este mismo orden, el control de la temperatura de mantenimiento de los alimentos, después de procesado y antes de su consumo, es crucial para obtener fuentes nutritivas seguras, dado que se considera “zona microbiológica peligrosa”, la comprendida entre 8 a 63 °C, en la que los microorganismos mesófilos

sobrevivientes o los contaminantes del postproceso, se multiplican rápidamente, alcanzando niveles infectivos. Ante esta situación, las temperaturas de mantenimiento recomendadas son:

- . Alimentos que se sirven fríos: $< 8\text{ }^{\circ}\text{C}$
- . Alimentos que se sirven calientes: $> 63\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dentro de las operaciones inadecuadas de manipulación y conservación incorrecta de los alimentos están:

- . Preparación de platos con excesiva antelación a su consumo.
- . Mantenimiento de comidas en caliente a temperatura inferior a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- . Enfriamiento lento de platos cocinados.
- . Temperatura de refrigeración insuficiente.
- . Cocinado insuficiente.
- . Recalentamiento inapropiado.
- . Descongelación incorrecta.

Otra práctica muy inadecuada que se realiza con frecuencia es la contaminación cruzada, que no es más que trasladar gérmenes desde un área contaminada a otra limpia a través de los manipuladores, uso de utensilios para varias faenas, almacenamiento de matraias primas y/o productos terminados de diferentes características, además de uso de ropa deshidrogenada en las jornadas de trabajo en la manufactura de alimentos.

5.3. Toxinas microbianas

Los microorganismos son seres vivos que tienen la capacidad de adaptarse a múltiples condiciones ambientales, siempre y cuando las mismas lo permitan. Ante ello, llevan afecto su ciclo de crecimiento, permitiendo colonizarse en lugares u organismos donde cualquier otro ser vivo vería amenazada su existencia. De hecho, algunas de ellas son patógenas, es decir, poseen la información genética necesaria para colonizar tejidos vivos de otros organismos invadiéndolos y produciendo sustancias tóxicas que pueden dar lugar a enfermedades (Forsythe, 2003).

Uno de los componentes más importantes de supervivencia de los microorganismos en un ecosistema, es la generación de toxinas como mecanismo de defensa ante sus competidores, por la prevalencia del sustrato; siendo pequeñas moléculas de péptidos o proteínas, capaces de causar enfermedades cuando entran en contacto o son absorbidos por los tejidos del cuerpo, interactuando con macromoléculas biológicas como enzimas receptores celulares.

Son sustancias específicas venenosas producidas por determinados seres vivos que tienen la capacidad de provocar cierto grado de daño al individuo donde se alojan. Por lo común, son capaces de alterar las vías de señalización celular del individuo hospedador provocando la inhibición de la respuesta inmune en las

primeras etapas de la infección, además de ocasionar el colapso vascular en etapas más tardías (Serrano y Cardona, 2015).

Las intoxicaciones son enfermedades que se originan como consecuencia de la entrada en el huésped de una toxina específica y la toxemia hace referencia a la presencia de toxinas en la sangre (Bonifaz, 2012). Cuando éstas son transportadas por la sangre o por la linfa pueden dar lugar a multitud de intoxicaciones, muchas veces con efectos irreparables. Así, ciertas toxinas son capaces de provocar trastornos cardiovasculares, otras, casos de diarrea, otras, shock o fiebre. También las hay que pueden inhibir la síntesis proteica, destruir células y vasos sanguíneos, así como 4 causar espasmos al alterar el sistema nervioso. Existe alrededor de 220 toxinas bacterianas conocidas, siendo aproximadamente el 40% responsables de enfermedades que dañan las membranas de las células eucarióticas (Tortora y otros, ob. cit).

5.3.1. Tipos de toxinas microbianas:

5.3.1.1. Toxinas bacterianas: Son metabolitos secundarios, de carácter perjudicial para el huésped, de elevado peso molecular, producidas por este grupo microbiano en el final de la fase exponencial, cuando comienzan a escasear los sustratos, con la finalidad de eliminar flora competente y de esta manera aprovechar al máximo los nutrientes que quedan en el ambiente. Estas toxinas pueden ser excretadas al medio que los rodea (exotoxinas) o retenidas dentro de la célula (endotoxinas).

5.3.1.1.1. Características de las exotoxinas:

- . Son difusibles y eliminadas por la célula productora al medio que la rodea, o al sistema circulatorio y tejidos del huésped.
- . Al lisarse, la cantidad de toxina obtenida es mayor.
- . Son proteínas que pierden su toxicidad al calentárseles o tratar con ácidos y poco resistentes a la luz y el O₂.
- . Su toxicidad se debe a la configuración especial de los aminoácidos en sus moléculas. Cuando este arreglo se altera, se pierde la toxicidad, resultando sustancias conocidas como toxoides. Un toxoide es una toxina tratada para destruir sus propiedades patógenas, sin alterar sus propiedades antigénicas.
- . Toxina extremadamente potente que causa enfermedad grave o la muerte cuando es ingerida por el hombre u otros animales. Desarrolla selectividad en órganos y tejidos.
- . Se inactivan fácilmente a 61 – 80 °C/10 – 60 minutos; siendo entonces termolábiles, como la botulínica, a excepción de la toxina estafilocócica que es termoestable, soportando temperaturas de ebullición.
- . Excretadas predominantemente por bacterias Gram positivas.
- . En estado seco son más resistentes a temperaturas elevadas, la luz y el O₂. La adición de sacarosa a la toxina, aumenta su resistencia al calor.

. Hay exotoxinas que se destruyen por enzimas digestivas, como la diftérica y la tetánica, por ello es que son inócuas por vía oral; mientras que otras, como la botulínica y estafilocócica, no se destruyen en el estómago y el intestino, provocando la intoxicación por vía oral.

. Se dividen en cuatro grupos principales:

- **Tipo I: Toxinas que actúan sobre la membrana celular.** Son termoestables y pueden causar anomalías por su ligado interno a la guanilina (*E. coli*), por unirse a un receptor para estimular al nervio vago y producir vómito (*B. cereus*), estimulando a los linfocitos T a producir citoquinas, por acción de los superantígenos, induciendo así a una respuesta inmune inapropiada (*St. aureus* y *Strp. pyogenes*).

- **Tipo II: Toxinas alterantes de la membrana o citolíticas.** Constan de las subunidades A y B, que no se separan y actúan rompiendo las membranas de las células del hospedador, permitiendo la salida del contenido citoplasmático de la célula hospedadora y que se produzcan fugas. Otras se unen al colesterol de las células hospedadoras, formando poros de 30 a 40 nm, induciendo la salida de contenido citoplasmático (*L. monocytogenes*, *Cl. perfringens*).

- **Tipo III: Toxinas penetrantes de membranas.** Tienen una estructura llamada AB, siendo la A la subunidad catalítica y B la que se liga al receptor de la célula hospedadora. Su acción se debe a la unión de ambas estructuras que al romperse forman un puente disulfuro, bloqueando la acción de los nervios periféricos; otras penetran la célula y atraviesan el anillo central, pudiendo atacar el ARN ribosómico y así generar una modificación cromosómica.

- **Tipo IV: Toxinas transportadoras.** Carecen de actividad tóxica cuando se purifican a partir de las bacterias, siendo transportadas directamente desde el citoplasma bacteriano al citoplasma de las eucariotas por un complejo dispositivo de proteínas que establecen puentes entre las membranas de ambos tipos de células y de esta forma producen elementos cromosómicos que codifican genes de virulencia (Forsythe, ob. cit). Especies de *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* ejercen este efecto.

5.3.1.1.2. Características de las endotoxinas:

. Desprendidas de las paredes de las bacterias Gram negativas lisadas.

. Son sustancias complejas, localizadas en la pared celular, que contienen fosfolípidos, carbohidratos y proteínas.

. Son relativamente termoestables, pudiendo resistir temperaturas de autoclave inclusive.

. No forman toxoides, por lo que son más complicadas en neutralizar por las antitoxinas.

. Son menos tóxicas, requiriendo una dosis letal muy grande. Es de acción selectiva muy débil.

. Son altamente pirógenas; es decir, producen fiebre en el huésped.

. Todas las endotoxinas producen los mismos síntomas independientemente de la especie bacteriana de que se trate. Entre los síntomas o signos más comunes destacan fiebre, escalofríos, debilidad, dolor en general

y, en ocasiones, shock e incluso la muerte. También son capaces de activar las proteínas de coagulación sanguínea, formando pequeños coágulos que pueden obstruir los capilares y, en consecuencia, provocar una disminución de la irrigación que conduce a la muerte de los tejidos (Bonifaz, ob. cit).

. Algunas inhiben la fagocitosis y otras las estimulan. Su efecto tóxico se atenúa parcialmente bajo la acción del formaldehído y el calor, transformándose en anatoxina al cabo de 30 días. Una antoxina es una toxina microbiana atenuada que conserva la propiedad de desencadenar la formación de anticuerpos.

5.4. Enfermedades alimentarias de origen bacteriano, viral y fúngico

Puesto que muchos de los consumidores no están conscientes o desconocen que los alimentos representan un problema potencial de contaminación por agentes físicos, químicos y biológicos; es necesario establecer mecanismos de educación al respecto sobre las evaluaciones, por lo menos empíricas, que se le deben hacer a este grupo de productos. En la medida que el consumidor esté más formado en el manejo adecuado de los alimentos, tanto en buenas prácticas de manufactura, como en técnicas de conservación, menores peligros se presentarían por su ingesta.

Las intoxicaciones alimentarias se deben al consumo de alimentos que contienen sustancias tóxicas, como restos de pesticidas en vegetales o productos tóxicos formados por la descomposición del propio alimento. Algunos microorganismos también producen toxinas. Las infecciones alimentarias son derivadas de la ingestión de los alimentos contaminados. Su causa son los gérmenes presentes en el producto. Las toxoinfecciones alimentarias son originadas por la presencia en los alimentos de gérmenes patógenos que, además de reproducirse, producen toxinas. Estas toxii infecciones son producidas por una gran variedad de microorganismos, en el que tanto en el período de incubación como la duración de la enfermedad varían considerablemente.

Los microorganismos responsables de las toxii infecciones alimentarias se dividen en:

- a. Bacterias patógenas transmitidas por alimentos.
- b. Virus patógenos de los alimentos.
- c. Intoxicaciones producidas por pescados y mariscos.
- d. Eucariotes patógenos transmitidos por alimentos.
- e. Micotoxinas.

Tabla 22. Principales diferencias entre exo y endotoxinas

Característica	Exotoxina	Endotoxina
Fuente bacteriana	Predominante G (+)	Paredes celulares de G (-)
Naturaleza química	Proteínas, en muchos casos con dos subunidades [A-B]	Lipopolisacáridos
Resistencia al calor	61 – 80 °C se inactivan, excepto estafilocócica	Pueden resistir autoclave
Inmunología	Se transforman en toxoides y se neutralizan por antitoxinas	No forman toxoides, por lo que no es posible neutralizarlas
Efectos sobre el organismo	Específicas: Afectan funciones celulares, nervios o tracto gastrointestinal Función celular	Hipersensibilidad: Fiebre, debilidad, dolores y shock
Dosis letal	Pequeña	Grande
Una especie	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Escherichiacoli</i>
Enfermedades comunes	Gangrena gaseosa, tétanos, botulismo, difteria, escarlatina	Fiebre tifoidea, infecciones urinarias, meningitis meningocócica

Fuente: Adaptado de Tórtora y otros (ob. cit)

a. Bacterias patógenas transmitidas por alimentos:

Debido a que los patógenos microbianos forman parte del medio ambiente, pueden contaminar fácilmente a los alimentos si no se manipulan adecuadamente antes del consumo. A continuación se hace una breve descripción de los patógenos microbianos que han sido aislados a partir de los productos de origen vegetal y animal, y de los productos terminados.

a.1. Infección por *Salmonella*:

- . Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, donde se agrupan más de 2300 especies distintas (serotipos o serovares)
- . Son bacilos cortos (1 – 2 µm), Gram negativos, anaerobios facultativos y no esporulados.
- . La mayoría de las especies son móviles, con flagelos peritricos.
- . Fermentan la glucosa, produciendo ácido y gas, pero no metabolizan la lactosa ni la sacarosa.
- . La temperatura óptima de crecimiento se aproxima a 38 °C y la mínima a 5 °C; se destruyen a 60 °C en 15 a 20 minutos ($D_{62,8} = 0,06$ minutos), siendo termosensibles por no formar endoesporas.
- . Crece en un pH comprendido entre 4,1 y 9,0; desarrollándose mejor en alimentos poco ácidos, como ensaladas, por ejemplo.
- . La actividad de agua mínima de desarrollo es de 0,93 a 0,95.

. Pueden hallarse en números considerables (20×10^6), produciendo la enfermedad en un período de incubación de 16 a 72 horas. A estas poblaciones pueden no alterar apreciablemente el olor o el gusto de los alimentos, por lo que es un agente muy peligroso por no alertar al consumidor por variaciones organolépticas.

. Los síntomas principales persisten durante 2 a 3 días, siendo ellos: diarrea con heces líquidas, verdosas y hediondas; náuseas, vómitos, dolor abdominal, a veces cefaleas y escalofríos, fiebre moderada, contracciones nerviosas y somnolencia.

. La mortalidad oscila el 1% cuando es causada por *S. enteritidis*, pero al ser de las especies *S. typhi* y *S. paratyphi* A, B y C, pueden llegar al 10%, generando fiebre tifoidea y paratifoidea.

. Dentro de los alimentos implicados están los diferentes tipos de carnes, aves y productos derivados, especialmente si se han mantenido sin refrigeración. Igualmente con las carnes de aves, sus salsas y aderezos manipulados y cocinados inadecuadamente, así como pescados y mariscos y ciertos derivados. Por otro lado están los productos lácteos, como la leche fresca o fermentada, helados y quesos; pasteles rellenos de crema o nata, las tortas, entre otros.

. Para prevenir esta enfermedad se recomienda evitar su contaminación con el empleo de buenas prácticas de manufactura, la destrucción de los gérmenes por cocción adecuada, inhibir el agente causal por refrigeración de las comidas que sobraron y luego recalentarlas.

a.2. Infección por *Escherichia coli*:

. El microorganismo es una bacteria Gram negativa, de la familia *Enterobacteriaceae*, que forma parte de la microflora normal del tracto gastrointestinal de los humanos y otros animales de sangre caliente, ejerciendo funciones del proceso digestivo, además de la producción de vitaminas B y K (Croxen y otros, 2013).

. Se presenta en forma de cocobacilo, de tamaños entre 1 a 3 μm , anaerobia facultativa, oxidasa negativa, catalasa positiva, sensible a tratamientos térmicos como la pasteurización.

. Su presencia en los alimentos se utiliza generalmente como índice de manipulación o de contaminación del procesado en caliente, bien sea con heces fecales o no por efectos no fecales.

. En función a patrones genéticos y grado de patogenicidad, se han definido al menos ocho prototipos intestinales, siendo ellos:

a.2.1. Enteropatógena (EPEC): Coloniza las vellosidades del intestino, produciendo principalmente diarrea acuosa en los lactantes; además de ello les produce vómitos, fiebre, diarrea acuosa, con mucus pero sin sangre.

a.2.2. Enterotoxigénico (ETEC): Se produce una diarrea abrupta tras un corto período de incubación que va desde las 14 a 50 horas. Se adhiere a los eritrocitos y coloniza la mucosa del intestino delgado por fimbrias, para luego secretar las toxinas. En humanos genera la diarrea infantil o del viajero, con emisiones

muy líquidas, como agua de arroz y de poca fiebre. Si no se proporciona hidratación adecuada, se puede llegar a la muerte, sobretodo en niños.

a.2.3. Enteroinvasiva (EIEC): Invade el epitelio intestinal, por lo que es la de mayor daño, presentando un plásmido invasivo (120 – 140 mD), que lleva los genes necesarios para la virulencia. No fermenta la lactosa y libera calcio en gran magnitud, impidiendo solidificación ósea.

a.2.4. Enteroagregativa o enteroadherente (EAEC): Se unen a la mucosa intestinal causando diarrea acuosa sin fiebre por espacio de 14 días, aglutinando células en los cultivos de los tejidos, produciendo entero y citotoxinas, que se relacionan antigénicamente con la hemolisina. Sólo se encuentra en humanos.

a.2.5. Enterohemorrágico (EHEC): Origina diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica. En este grupo se incluyen: *E. coli* verotoxigénico (VTEC), serotipos O157, O26 y O111; quienes producen toxiinfecciones alimentarias muy graves que terminan fatalmente. La cepa O157:H7, se diferencia de la mayoría por no crecer o hacerlo muy pobremente a 44 °C.

. Entre las medidas de control para contrarrestar infecciones con *E. coli* están: Cocinar muy bien los alimentos; enfriarlos en pequeñas cantidades y rápidamente; además de higiene personal y en la preparación de los mismos.

a.3. Especies del género *Shigella*:

. Bacterias Gram negativas muy similares a la *E. coli*, pero diferenciadas por no producir gas a partir de la fermentación de carbohidratos (anaerógenas), además de ser lactosa negativo.

. Se han descubierto cuatro especies: *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri*, *Sh. boydii* y *Sh. sonnei*, quienes generan síntomas a las 12 a 96 horas de ser ingeridas, con síntomas como: diarrea ligera o grave, tanto acuosa como hemorrágica; fiebre y náuseas. A veces se suscitan vómitos y espasmos abdominales.

. Han sido encontradas en lechugas, chícharos, leche, productos lácteos, carne de ave y ensaladas de papas. El alimento se contamina por vectores biológicos e inadecuada higiene del personal.

a. 4. Toxiinfecciones por *Campylobacter jejuni*:

. Son bacilos delgados, curvados, espirilados o en forma de rosquilla, Gram negativos que miden entre 0,5 a 0,8 µm de largo por 0,2 a 0,5 µm de ancho, responsable de muchas diarreas agudas en países desarrollados, por delante de otros patógenos como *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichiacoli*. Los principales reservorios: pollos, ganado vacuno, cerdos, ovejas, roedores y aves (Forsithe, ob. cit).

. Es una bacteria microaerófila, necesitando 3 a 5% de oxígeno y 2 a 10% de CO₂, con una temperatura óptima de crecimiento de 42 a 43 °C. No crecen a temperaturas cercanas al ambiente (25 °C); por ello se les considera termófilas. Aún así es sensible al calor por destruirse al calentarse a 55 – 60 °C, con un D₅₀ = 0,88 a 1,63 min.

. Aunque esta bacteria no se multiplica a temperatura ambiente, su dosis infectiva es baja (500 a 1000 células), produciendo contaminación cruzada entre carnes crudas y procesadas.

. El período de incubación es de 2 a 10 días, y se manifiesta la enteritidis por una semana, con estos síntomas: enfermedad parecida a la gripe, dolor abdominal, fiebre y diarrea acuosa (que puede ser profusa) y frecuente y sanguinolenta.

. Produce tres tipos de toxinas: una enterotoxina termolábil, una segunda toxina alterante del citoesqueleto, que también puede causar diarrea y se destruye a 70 °C/15 minutos; y una citotoxina proteica termolábil, que no es neutralizada por las antitoxinas coléricas.

. La principal fuente de contaminación es por transmisión cruzada de microorganismos, principalmente en carnes crudas, tanto por el uso de utensilios en diversas actividades, como el empleo de equipos de procesamiento.

. La principal recomendación para impedir su acción es aplicar buenas prácticas de manufactura de los alimentos, con operaciones dirigidas a prevenir la contaminación cruzada en carnes de mamíferos y aves, además de buenos tratamientos térmicos, cocinando a temperaturas por encima de 70 °C, por ser termosensibles, tanto el microorganismo como la toxina.

a.5. Infección por *Yersinia enterocolitica*:

. Hay tres especies de este género, produciendo gastroenteritis *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*. La *Y. pestis* produce peste.

. La *Y. enterocolitica* es una bacteria Gram negativa, de forma bacilar, oval o cocoide, dependiendo de su tiempo de crecimiento; con tamaño entre 1 – 3,5 µm de largo por 0,5 – 1,3 µm de ancho.

. Despliega flagelos peritricos a 25 °C, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 30 a 37 °C, pudiendo desarrollarse a temperaturas de refrigeración (8 °C).

. Se aísla del medio ambiente y de los alimentos y no de animales como sucede en la *Y. pseudotuberculosis*. Se puede encontrar en la carne de varios animales de sangre caliente, ostras, pescado y leche cruda, pudiendo llegar a ellos por suelo y agua.

. La yersiniosis es una enfermedad poco corriente, que presenta síntomas típicos al ser transmitida por los alimentos, siendo ellos: dolor abdominal, fiebre, diarrea que persiste por varias semanas, dolor de garganta, heces hemorrágicas, sarpullidos, náuseas, cefalea, malestar general, dolor articular y vómitos.

. Por generarse debido a fallos típicos en las técnicas de procesado de alimentos, su principal recomendación es aplicar buenas prácticas de manufactura en su elaboración y la lucha contra roedores e insectos.

a.6. Toxiinfecciones por *Listeria monocytogenes*:

. Son bacterias Gram positivas, no esporuladas y móviles, que crecen entre 0 a 42 °C; mucho más resistentes al calor que la *Salomonella*, destruyéndose por pasteurización.

. Se compone de ocho especies, siendo *L. monocytogenes* la que más preocupa en las toxiinfecciones alimentarias por ser la más incidente.

. Se ha aislado de mamíferos y aves, siendo entre el 1 al 10% de las personas portadoras de esta bacteria en el intestino; además de ello, se ha conseguido en vegetales, suelo, agua, piensos de animales, efluentes urbanos y alimentos tanto crudos como procesados, en los que sobrevive y se multiplica durante el almacenamiento. Se ha conseguido este patógeno en alimentos almacenados, en leche pasteurizada, quesos, hortalizas crudas, alimentos marinos, embutidos y productos cárnicos.

. La listeriosis como enfermedad tiene un período de incubación de 1 a 90 días, invadiendo el epitelio gastrointestinal y luego es transportado a la sangre para su acceso al cerebro y feto, en caso de estar embarazada, siendo los síntomas los siguientes: meningitis, encefalitis y septicemia; posibles abortos en mujeres embarazadas o partos prematuros.

. La tasa de mortalidad es alta: en meningitidislisteriósica (70%), en los casos septicémicos (50%) y en infecciones perinatales (80%), sobreviviendo la madre en los períodos de gestación. El 1% de las muestras de heces son positivas a esta bacteria, pero en los efluentes urbanos aparece el 94% de ellas.

a.7. Intoxicación estafilocócica:

. El microorganismo responsable es el *Staphylococcus aureus*, que es una bacteria Gram positiva, de forma cocoidal y agrupada como racimo de uvas, coagulasa positivo y aeróbio facultativo, resistentes a la sal (10 – 20% NaCl), tolerando además nitritos, por lo que pueden crecer en carnes curadas o en soluciones de curado o productos salados como el queso llanero.

. La bacteria se desarrolla a pH entre 4,8 y 5,5, con actividad de agua de 0,86 a 0,99 y temperatura entre 7 y 48 °C, llegando a los alimentos por el hombre y los animales, generando finalmente una intoxicación después de un período de incubación entre 2 a 4 horas, con síntomas como salivación, náuseas y vómitos, espasmos abdominales, calambres musculares, respiración superficial, pulso débil, diarrea y en casos graves vómitos y heces con sangre. La enfermedad se cura sola entre 2 a 3 días.

. Es la que más frecuente se presenta en alimentos, sobre todos aquellos a base de leche cruda como quesos, siendo también posible conseguir en pasteles rellenos de crema, jamón y carne de aves, carnes y productos cárnicos, pescados y sus derivados, salsas, ensaladas, pudines, empanadas, y todos aquellos que de una u otra forma denotan manipulación, dado que es una de las bacterias presentes en la piel, fosas nasales, cabellos y sistema buco-faringe de las personas y animales. La mayor parte de los brotes se deben a la manipulación por parte del hombre.

. Son fermentativos y proteolíticos, anaerobio facultativo, no productor de olores desagradables en los alimentos ni empeorando su aspecto. De las seis enterotoxinas producidas (A, B, C₁, C₂, D y E), la mayoría de las intoxicaciones son producidas por el tipo A y D, sucediendo su producción en rangos de temperatura

entre 15 a 46 °C, con un óptimo de 40 °C, y una vez presentes en los alimentos se hacen termorresistentes, soportando temperaturas de autoclave (121 °C por 25 minutos), lo que la hace muy incidente en brotes de restaurantes, hogares y comedores de todo tipo en alimentos que tienen como materia prima el queso o algún derivado lácteo.

. Por ser la enterotoxina termorresistente, el principal mecanismo de control de este patógeno consiste en aplicar técnicas de inocuidad y salubridad alimentaria ya descritas.

a.8. Botulismo:

.Toxina del botulismo producida por *Clostridium botulinum*, siendo quizás una de las enfermedades microbianas transmitidas por alimentos más graves, con una mortalidad elevada. Esta bacteria se encuentra de manera ubicua en la naturaleza, conociéndose cuatro especies clínicamente importantes como: *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens*, *Cl. difficile* y *Cl. tetani*.

. Bacteria saprófita del suelo, de forma bacilar, anaeróbica, esporulado, de flagelos peritricos, Gram positiva y productora de gas. Mide cerca de 0,3 a 0,7 µm de ancho por 3,4 a 7,5 µm de largo. Hay siete tipos de esta especie botulínica (A, B, C, D, E, F y G), diferenciadas porque C y D causan la intoxicación en animales y el resto en humanos.

. Las esporas de esta bacteria se diseminan pero producen toxina únicamente en un entorno anaerobio (sin oxígeno) con poca acidez, diferenciándose siete tipos de toxinas proteolíticas y productoras de gas, dando lugar a la aparición de malos olores (por ácido sulfhídrico, mercaptanos, indol y otros componentes) en los alimentos proteicos, y que es absorbida en el intestino delgado.

. Se desarrolla en alimentos poco ácidos y en algunos medianamente ácidos como carnes, alimentos enlatados, leche y productos lácteos, además de algunas frutas y hortalizas; pudiendo provocar problemas en alimentos embalados con poca acidez si el procesado no es adecuado. Estos productos incluyen el maíz, los frijoles, las sopas, la remolacha, los espárragos, los champiñones, el atún y otros. También se han identificado problemas en los platos preparados, el jamón, las salchichas, las berenjenas rellenas, la langosta y el pescado ahumado y salado. Cuando las frutas y hortalizas son envasadas con poca permeabilidad para el oxígeno existen problemas potenciales.

. Se desarrolla a temperaturas entre 15 a 48 °C y una actividad de agua en el alimento de 0,94; es decir, un 65 – 70 % de humedad del producto.

. Los síntomas de la enfermedad aparecen entre 12 y 36 horas de incubación, con trastornos digestivos agudos, náuseas, vómitos y diarreas, fatiga muscular, cefaleas, doble visión y dificultad para hablar e ingerir alimentos. Es capaz de ocasionar parálisis muscular a los 6 – 7 días de aparición de la ingesta del alimento contaminado con la neurotoxina, generando muerte por fallo respiratorio. La tasa de mortalidad es de un 10% aproximadamente.

. Para prevenir esta intoxicación es recomendable el empleo de tratamientos térmicos adecuados, bien sea esterilización en enlatados (121,1, °C por 3 minutos), como cocción de los alimentos manufacturados en el hogar, comedores, restaurantes y otros; igualmente, se debe evitar el uso de materias primas sospechosas. Por otro lado, es importante preparar los alimentos lo más cercano a su consumo y no dejar que se enfríen a temperatura ambiente para proliferar crecimiento de este patógeno y sus esporas al cabo de cierto tiempo.

a.9. Gastroenteritis por *Clostridium perfringens*:

. Es una enfermedad cuyos síntomas aparecen entre las 8 y 24 horas de consumido el alimento, manifestándose bajo un dolor abdominal agudo, diarrea y gases, por incidencia de una enterotoxina que se forma en la esporulación de la bacteria, ocasionando una acumulación de líquidos en la luz intestinal del afectado.

. El microorganismo responsable es una bacteria Gram positiva, inmóvil, esporulada y anaeróbica, que se desarrolla a temperaturas cercanas a los 43 °C, a una máxima de 55 °C, por lo que es muy común conseguirla en productos de relleno que se mantienen a temperaturas de baño María o permanentemente recalentados, como es el caso en areperas, luncherías, comidas rápidas.

. Está ampliamente distribuido por el medio ambiente y con frecuencia se encuentra en el intestino de la especie humana y de los animales, por lo que sus esporas persisten en el suelo, sedimentos y zonas sometidas a la contaminación fecal.

. Existen cinco tipos de *Cl. perfringens* (A – E), que se dividen de acuerdo a las exotoxinas generadas, siendo patógenos humanos los tipos A, C y D; mientras B, C, D y E, atacan a los animales.

. Por ser la enterotoxina una proteína termosensible (se inactiva a 60 °C/10minutos; D₉₀ = 4 min), es recomendable una cocción adecuada de los alimentos, así como recalentarlos suficientemente si se han dejado enfriar para consumir luego. En carnes, que es un alimento muy común en establecimientos, se requiere un correcto y rápido enfriamiento de las mismas para evitar proliferación de endoesporas, las cuales por ser termorresistentes (soportan temperaturas superiores a 100 °C/3 – 5 minutos inclusive), hacen viable la germinación de las mismas para posteriormente generar una célula vegetativa activa, que por fisión binaria se reproduce a una cinética exponencial, alcanzando en horas niveles poblacionales capaces de generar la toxina en el producto y de esta forma poder llegar al consumidor. De esta misma forma germinan también las endoesporas botulínicas.

. No crece a pH inferiores a 5 o superiores a 9, se inhiben a 5% NaCl; por otro lado es recomendable un enfriamiento rápido del producto preparado, de no enlatarse, para disminuir las posibilidades de germinación de cualquier spora superviviente. Importante luego recalentar a 70 °C, antes de su consumo, para destruir toxinas y células vegetativas.

a.10. Gastroenteritis por *Bacillus cereus*:

. El microorganismo es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, pero de mayor acción metabólica en presencia de oxígeno; esporulada, con temperatura óptima de crecimiento de 30 °C, creciendo a pH entre 4,9 a 9,3, generando esporas termorresistentes a temperaturas de 100 °C.

. Es de naturaleza ubicua, habiéndose aislado del suelo, de la vegetación, del agua corriente y del pelo de los animales. Generalmente se encuentran en los alimentos en un número pequeño ($<10^2$ ufc/g), considerado aceptable. Producen intoxicación a niveles por encima de 10^6 ufc/g.

. Se conocen dos tipos de toxiinfecciones alimentarias por *B. cereus*: una diarreica y otra emética. La primera es por una toxina que se ubica en el intestino delgado humano, que se inactiva a 56 °C en 30 minutos. La emética es termoestable, resistente al calor (126 °C/90 min) y al pH entre 2 a 11. Se produce en la fase de crecimiento estacionario.

. Los síntomas aparecen en 8 y 16 horas en la diarreica y entre 0,5 a 6 horas en la emética; después de ingerido el alimento, produciendo dolor abdominal, diarrea acuosa y a veces vómito por un día. Entre los alimentos responsables están los postres de pastelería, productos a base de cereales, salsas, arroz frito, sobre todo en comidas chinas y pasteles de carne.

. Para evitar su proliferación se recomienda enfriar los alimentos en pequeñas cantidades y rápidamente por debajo de 10 °C; los que son de consumo mantenerlos a temperaturas por encima de 65 °C, higiene del personal, recalentar alimentos sobrantes por encima de 65 – 70 °C, y mantener las áreas limpias por ser una bacteria típica vehiculada por el aire, con remociones en el polvo.

a.11. Infección por *Vibrio*: *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*

. Incidente en aguas contaminadas, bien sea de las costas o aguas de servicio urbano, por lo que se presenta mucho en alimentos como pescado fresco o productos derivados, alcanzando a las frutas y hortalizas crudas mediante la contaminación cruzada por la manipulación.

a.11.1. *Vibrio parahaemolyticus*:

. Es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo, halofílico, cuyo reservorio son las aguas con alta concentración de sal. Es responsable de brotes de gastroenteritis aguda por ingestión de mariscos y otros alimentos marinos crudos o mal cocidos.

. Inicia síntomas entre las 4 a 96 horas, con diarrea líquida, espasmo abdominal, náuseas y vómitos, cefaleas, fiebre y escalofrío, en una media de 15 horas. Dura como 2 a 3 días.

. El microorganismo se adhiere al intestino delgado y segrega la enterotoxina, con una dosis infectiva por encima de 10^6 ufc/g o ml; asociándose su infección al consumo de pescado o marisco crudo, poco hecho o recontaminado después de cocido. Otra causa es debido a refrigeración deficiente de los alimentos de origen marino, por lo que se recomienda mantenerlos a temperaturas bajas (<5 °C).

a.11.2. *Vibrio vulnificus*:

. Es una bacteria bacilar, Gram negativa, oxidasa positiva, lactosa positiva y anaerobia facultativa, no esporulado, soportando pH de hasta 9 y concentraciones salinas elevadas; por ello se desarrolla bien en pescados marinos.

. Se ha aislado de mariscos y de aguas costeras, aumentando la carga bacteriana cuando el agua alcanza una temperatura mayor de 21 °C.

. Inicia síntomas entre el primer y el séptimo día, con síntomas como escalofríos, fiebre o postración, náuseas y lesiones dérmicas. Las principales vías de infección son las heridas y las vías digestivas (formas septicémicas). Al desarrollar septicemia hay una probabilidad de muerte del 40 al 60%. Las personas que corren mayor riesgo son las afectadas por enfermedades hepáticas, con baja acidez de estómago y las inmunocomprometidas.

. El aislamiento de cualquier especie de *Vibrio*, a partir de alimentos cocidos, indica falta de higiene, ya que se destruye rápidamente por el calor y no se ha señalado en los alimentos procesados.

a.11.3. *Vibrio cholerae*:

. Bacteria Gram negativa de forma bacilar, responsable del cólera en los humanos.

. Es una bacteria anaerobia facultativa, y su metabolismo es fermentativo; pueden fermentar, entre otros sustratos, la glucosa. Poseen flagelación polar, que les otorga una movilidad máxima.

. Inicia síntomas a las 24 y 72 horas de ingesta del alimento contaminado, con síntomas como diarrea líquida profusa y vómitos que pueden llegar a deshidratación grave y fallecimiento a las pocas horas.

. Tiene un periodo de incubación corto, entre menos de un día y cinco días, y la bacteria produce una enterotoxina que causa una diarrea copiosa, inolora y acuosa que puede conducir con rapidez a una deshidratación grave y a la muerte si no se trata prontamente. La mayor parte de los pacientes sufren también vómitos.

a.12. Infecciones por género *Brucella*:

. Este género comprende cocobacilos Gram positivos, aerobios obligados que originan brucelosis, siendo su principal fuente los animales, que causan infecciones en el ser humano por las siguientes especies: *Br. abortus* (ganado vacuno), *Br. suis* (cerdos), *Br. melitensis* (cabras) y *Br. canis* (perros).

. Las principales fuentes de infección se deben a la leche y la industria láctea, llegando al huésped por la piel, el sistema respiratorio y el tracto digestivo. Llegan a la sangre y a los órganos linfáticos para multiplicarse en ellos y generar bacteriemia (infección de la sangre), cuya patogenicidad se debe a la producción de lipopolisacáridos que inhiben funciones fagocitarias.

. La prevención de esta enfermedad se lleva a efecto en la erradicación y control de animales hospedadores, además de precauciones higiénicas para limitar la exposición a la infección con ciertas enfermedades ocupacionales y en el tratamiento térmico de la leche y productos lácteos y de otros alimentos potencialmente contaminados.

a.13. Infecciones por género *Streptococcus*:

. Este género incluye cocos Gram positivos, microaerófilos, inmóviles que se disponen en pares o en cadenas.

. Se dividen en los grupos A, B, C, D, F y G; atendiendo a un conjunto de características antigénicas, hemolíticas y fisiológicas. Los grupos A y D pueden transmitirse a las personas por los alimentos. En el grupo A se tiene una especie de *Strep. Pyogenes* y en el D cinco especies de *Enterococcus (Streptococcus) faecalis; faecium; durans; avium y bovis*.

. Los síntomas por los estreptococos del grupo A son: faringe adolorida y roja, amigdalitis, fiebre alta y cefalea, náuseas y vómitos, dolor al degluir, malestar general, enrojecimiento y rinorrea. Estos estreptococos causan faringitis séptica y escarlatina, así como el síndrome del choque tóxico. La enfermedad se manifiesta en 1 a 3 días, con dosis infectiva menor a 1000 bacterias. Entre los alimentos implicados se tienen: fuentes que incluyen leche, helados, huevos, ensaladas, pudines, jamones, entre otros. Su contaminación puede deberse a un manipulador infectado.

. Los síntomas del grupo D son: diarrea, espasmos abdominales, náuseas y vómitos, fiebre y escalofríos, pérdida de conciencia. Estos síntomas se presentan a las 2 a 36 horas de ingerido el alimento, con una dosis infectiva mayor a 10^7 bacterias. Los alimentos responsables son: embutidos, leche evaporada, leche cruda y leche pasteurizada, queso, croquetas y pasteles de carne; todo ello por higiene deficiente durante la preparación de los alimentos, incluyendo manipulación de personas con faringitis en la zona de producción.

b. Virus patógenos de los alimentos

A pesar de que no pueden multiplicarse ni producir toxinas en los alimentos, los virus son responsables de diversas epidemias de origen alimentario. Esto se debe a su capacidad para permanecer viables en alimentos mantenidos a distintas temperaturas de refrigeración y en el medio ambiente marino. Los virus van a poder llegar al medio ambiente y contaminar las aguas y alimentos por diversas vías: bien a través del agua usada para consumo humano, o bien por medio del agua usada en cultivos vegetales, cultivos de moluscos bivalvos o en la preparación de los alimentos (Koopmas, 2012).

Para Shors (2009), el origen de todos los virus transmitidos por los alimentos se concentra en los intestinos de humanos y animales. Como tales, los virus a menudo se liberan a través de las heces y otros fluidos corporales, que por no replicarse en estos productos, la transmisión a través de los mismos ocurre de las siguientes maneras:

- . Contaminación de alimentos por personas infectadas que manipulan alimentos, como consecuencia de prácticas poco higiénicas,
- . Contacto de alimentos con desechos animales, aguas residuales humanas o agua contaminada con aguas residuales,
- . Consumo de productos de origen animal contaminados con virus (por ejemplo, carne, pescado, entre otros).

No se han determinado las contribuciones relativas de las distintas vías por las cuales los virus pueden causar enfermedades transmitidas por los alimentos; aún así se ha determinado que los principales productos asociados a enfermedades virales son:

- . El marisco (por ejemplo, las ostras o los mejillones), los crustáceos y sus productos que se recolectan y/o se crían en aguas cercanas a salidas de aguas residuales humanas (por ejemplo, plantas de tratamiento de aguas residuales).
- . Frutas u hortalizas que han crecido en tierras fertilizadas con abono animal o regado con agua contaminada.
- . Carnes poco cocinadas como el cerdo.

Asimismo, otra fuente importante de contagio son los manipuladores de alimentos infectados, sintomáticos o asintomáticos, que pueden contaminar los productos en cualquier punto de la cadena alimenticia, aconsejándose la exclusión de dichos individuos durante un periodo de 48 horas tras el cese de los síntomas, ya que se ha demostrado la transmisión viral tanto en el periodo pre- como postsintomático (Shors, ob. cit).

Entre los principales virus contaminantes de alimentos están:

b.1. Virus de la fiebre aftosa y virus de la enfermedad vesicular de los suidos:

La fiebre aftosa, descrita originalmente en Italia en 1514, es causada por un picornavirus que afecta a bovinos, búfalos, caprinos, ovinos, porcinos y roedores y que se caracteriza por la aparición de vesículas y erosiones en la mucosa nasal y la piel, entre las uñas de los pies y en las mamas (Martínez y otros, 2011). En los humanos, aunque su curso es leve, se contaminan al ingerir productos de origen animal, pudiendo generar lesiones vesiculares benignas, caracterizadas por la aparición de estomatitis vesicular y afecciones exantemáticas.

La enfermedad vesicular porcina (EVP) es una enfermedad viral, producida por un enterovirus, que se caracteriza por la formación de exantema vesicular y erosiones, que sólo afecta a los cerdos. A pesar de que puede causar una enfermedad de leve a grave, esta infección es transitoria y no compromete la vida del animal. Su gran importancia, es el parecido con otras enfermedades vesiculares, en particular la fiebre aftosa. Aunque ambos virus permanecen viables en las carnes, no se han registrado casos en humanos, pero no deja de ser preocupante para la salud del consumidor.

b.2. Virus del complejo de las encefalitis transmitidas por garrapatas (fiebre difásica de la leche o encefalitis rusa de primavera-verano) y otros virus:

Estas encefalitis son causadas por arbovirus B y flavivirus y transmitidas por diversos tipos de garrapatas. Sus principales manifestaciones son cefalea, anorexia, náusea, vómitos, alteraciones sensoriales, convulsiones y parálisis. La transmisión alimentaria se produce por la ingestión de leche cruda de ganado caprino y ovino infestada por ácaros (Riccardi, 2019); asimismo se tiene la fiebre de Lassa (por arnavirus ARN), que es una infección que afecta al aparato respiratorio, músculos, hígado, encéfalo y riñones y ocasiona alteraciones hemodinámicas graves, aunque en la actualidad es poco frecuente. Se transmite por los alimentos y el agua, contaminados por excretas de roedores; así como por contacto con la osamenta de roedores o por vía directa.

b.3. Antropozoonosis víricas de importancia médica: Virus de las hepatitis A y E:

b.3.1. Hepatitis A: Desde 1940, la hepatitis A se conoce como una enfermedad producida por un enterovirus de ARN (picornavirus) que se propaga por vía fecal y oral, por el consumo de alimentos y aguas contaminadas, por manipuladores; en la que en su profanación primaria participan los moluscos bivalvos (ostras, berberechos, mejillones, entre otros) consumidos sin cocción, que representan los principales vehículos de las enfermedades víricas de origen alimentario (Forsythe, ob. cit). Igualmente, las carnes, los productos lácteos, el pan, las frutas y los vegetales también están asociados a esta enfermedad.

La enfermedad puede aparecer entre los 10 a 50 días, dependiendo del número de partículas infectivas ingeridas, estando ellas entre 10 a 100. Es contagiosa desde el período de incubación (cuya duración promedio es de 30 días) hasta 7 días después del inicio de la infección; produciendo fiebre, anorexia, escalofrío, náuseas, orina oscura, heces de color pálido, dolores abdominales en la zona hepática e ictericia. Puede durar 1 ó 2 semanas o prolongarse durante meses y causar lesiones hepáticas crónicas. Generalmente, una infección por este virus confiere inmunidad duradera al paciente (Grande y Romero, 2017).

Como los virus no se multiplican in vitro y el análisis de los alimentos es poco sensible, es difícil demostrar la existencia de una relación causal entre la enfermedad y los alimentos en sí; sin embargo, por seguimientos de brotes se ha llegado a la relación causal entre ellos.

b.3.2. Hepatitis E: Es el principal agente etiológico de la hepatitis no A y no B, de transmisión entérica. Es esférico, sin cubierta, con ARN de una sola hebra y se ha calificado provisionalmente entre los calicivirus, el cual penetra en el organismo con el agua y alimentos, especialmente marisco crudo contaminado con efluentes. Se considera una zoonosis emergente.

b.3.3. Rotavirus: Generan gastroenteritis, de menos graves a graves, caracterizadas por diarreas acuosas, vómitos y poca fiebre. La dosis infectiva va desde 10 a 100 partículas víricas, de la cual un paciente excreta entre 10^8 a 10^{10} partículas infectivas/ml de heces; pudiendo adquirirse dicha dosis infectiva a partir de las

manos, objetos y utensilios contaminados. Es por ello que su principal fuente de infección es fecal, con excreción asintomática del rotavirus, principalmente el A; encontrándose niveles de 0,2 a 1 partícula infecciosa/litro, en muestras de agua. Su período de incubación varía de 1 a 3 días, iniciándose con vómitos, seguidos a los 4 – 8 días de diarrea.

Aunque es muy poco frecuente en alimentos, el control se basa en higiene de los manipuladores de alimentos infectados, por ser la principal fuente de contaminación, además de evitar usar aguas contaminadas en la preparación de productos.

b.3.4. Virus de Norwalk y Norwalk afines: Son conocidos como virus estructurados, incluidos en los *Caliviviridae*, siendo patógenos del hombre, en dosis infectiva que se presume debe ser baja por ser desconocida. Generan gastroenteritis en unas 24 a 48 horas, que se curan solas en 24 a 60 horas; siendo los síntomas: náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, cefalea, fiebre, escalofríos y a veces lesiones en la mucosa del intestino delgado, dolor y debilidad muscular.

Se transmite por la ruta fecal, oral, vía el agua y los alimentos contaminados; siendo el agua la fuente más corriente de los brotes, bien sea de aporte municipal o por piscinas, y almacenada. Dentro de los alimentos responsables están los ingredientes de ensaladas, almejas y ostras crudas o insuficientemente tratadas con vapor. Por otro lado, los virus no se multiplican ni en los alimentos ni en el agua; por lo que su principal mecanismo de control es evitar el uso de agua contaminada, al igual que la higiene del personal.

b.3.5. Virus redondos, astrovirus, calcivirus, adenovirus y parvovirus: En términos generales, la gastroenteritis vírica, es una enfermedad leve caracterizada por vómitos, diarreas, malestar general, dolor abdominal, cefalea y fiebre. Se transmiten por vía fecal – oral, por contacto de persona a persona o por la ingestión de agua o alimentos contaminados. Igualmente, los manipuladores de alimentos que estén enfermos pueden contaminarlos y representan un peligro si no se someten a tratamientos térmicos antes de su consumo.

Los astrovirus producen gastroenteritis esporádicas en niños menores de 4 años y son responsables de cerca del 5% de las hospitalizaciones con diarrea. Los calcivirus infectan a niños entre 6 a 24 meses y son responsables del 3% aproximadamente de las admisiones hospitalarias por diarrea. Los adenovirus entéricos causan del 5 al 20% de las gastroenteritis en los niños menores de 4 años, siendo la segunda causa más común de esta enfermedad. Los parvovirus pertenecen a la familia *Parvoviridae*, muy incidente en mariscos, desarrollando la enfermedad entre 10 a 70 horas, después de ingerir agua y alimentos contaminados, curándose sola a los 2 a 9 días.

c. Intoxicaciones producidas por pescados y mariscos

De las intoxicaciones por pescado, se ha creído que se debe fundamentalmente a las concentraciones de histaminas presentes, además de otras aminos biógenas. Por su lado, la intoxicación por consumo de marisco

se debe a un grupo de toxinas producidas por ciertas algas plantónicas (dinoflagelados en la mayoría de los casos) de las que se alimentan ellos. De este grupo se tienen:

c.1. Intoxicación por ciguatera: De baja mortalidad, recuperándose el huésped entre días a semanas. Genera afección en la termorregulación y en las actividades nerviosas: sensorial, motora, autonómica y muscular. Se caracteriza por picazón (hormigueo) de labios, lengua y garganta; cefalea, dolor fuerte en brazos, piernas y ojos; visión alterada; alteraciones dérmicas.

c.2. Intoxicación escombroides: De agente responsable desconocido, en la que se creía inicialmente que era una intoxicación histamínica. Los síntomas de esta intoxicación son: Sabor metálico y picante, cefalea profunda, pérdida de conciencia, náuseas y vómitos, inflamación y enrojecimiento facial, dolor epigástrico, pulso rápido y débil, picor dérmico, dolor de garganta y dificultad de deglución. Su recuperación es de 12 horas.

c.3. Intoxicación paralítica por mariscos: Con 20 toxinas derivadas por la santitoxina producida por dinoflagelados. Los síntomas son fundamentalmente neurológicos: temblores, quemazón, somnolencia, parálisis respiratoria, pérdida breve del sentido y conversaciones incoherentes.

c.4. Intoxicación diarreica por mariscos: Se trata de una leve alteración gastrointestinal que puede aparecer entre 30 minutos a 3 horas, dependiendo de la cantidad de toxina ingerida, produciendo síntomas de 2 a 3 días como: náuseas, vómitos, diarreas y dolor abdominal, acompañados de escalofríos, cefalea y fiebre. La recuperación es total, sin efectos secundarios y sin gravedad, en la que hay toxinas de dinofisiáceas, pectinotoxinas y yesotoxinas producidas por dinoflagelados.

c.5. Intoxicación neurotóxica por mariscos: La aparición de los síntomas ocurre entre unos pocos minutos y algunas horas después de ingerido el marisco, consecuencia de brevetoxinas, producidas por flagelados. Produce síntomas gastrointestinales y neurológicos, entre ellos, temblores y picores de labios, lengua y garganta, dolor muscular, desvanecimiento, inversión de la sensación de calor y frío, diarrea y vómitos.

c.6. Intoxicación amnésica por mariscos: Se caracteriza por desórdenes gastroentéricos (vómitos, diarrea, dolor abdominal) y problemas neurológicos, como pérdida de memoria, confusión, desorientación, entre otros; con síntomas que aparecen a las 24 horas (gastrointestinales) y 48 horas (neurológicos). Genera intoxicación por ácido domoico, que va siendo acumulado por el marisco al alimentarse de diatomeas. Ocurren muertes ocasionales, principalmente en personas de avanzada edad.

d. Eucariotes patógenos transmitidos por alimentos. Entre ellos están:

d.1. *Cyclospora cayetanensis*:

. Es un coccidio parásito que se encuentra en todas las aguas tropicales del mundo, además de personas que ingirieron agua o alimentos contaminados.

. Tiene un período de incubación de 1 semana desde la ingestión del alimento contaminado, eliminándose el parásito con las heces durante más de 3 semanas, y durando la enfermedad en un promedio de un mes.

. Los síntomas de la enfermedad son: diarrea acuosa, pérdida de apetito, timpanismo, náuseas, vómitos, dolores musculares, fatiga, fiebre ligera, pérdida de apetito y de peso, con movimientos intestinales frecuentes.

d.2. *Cryptosporidium parvum*:

. Protozoococcidiano que se transmite por vía fecal, incluida la transmisión con el agua y con los alimentos; siendo sus reservorios la especie humana y los animales domésticos.

. La enfermedad se cura corrientemente en menos de 30 días, pero puede prolongarse en las personas inmunodeficientes y continuar hasta producir la muerte.

. La sintomatología de la criptosporidiasis humana incluye diarrea, dolor abdominal y anorexia.

d.3. *Anisakis simplex*:

. Es una parasitación del intestino humano debida a la ingestión de pescado crudo o poco cocinado, que contiene fases larvianas de este nemátodo.

. Los hospedaderos son los mamíferos de sangre caliente como ballenas, morsas y delfines, pasando las larvas a peces como bacalao, abadejo, salmón y otros similares.

. Genera infestaciones graves por penetrar el parásito en los tejidos gastrointestinales.

d.4. *Taenia saginata* y *Taenia solium*:

. Ocasionan infestaciones por solitarias del ganado vacuno (*T. saginata*) y del cerdo (*T. solium*), siendo parásitos obligados del intestino humano, en la que las formas larvianas, al ser ingeridas por las personas con estas carnes, se fijan a la pared intestinal y se desarrollan hasta formas adultas (de varios métodos de longitud), produciendo cientos de proglótidos que se expulsan con las heces.

. Los proglótidos liberan huevos fértiles por el medio ambiente, donde constituyen los agentes infestantes de vacunos y porcinos.

. La principal medida de control es romper el ciclo biológico, además de inspección veterinaria de la carne y un adecuado tratamiento térmico.

d.5. *Toxoplasma gondii*:

. Agente etiológico de la toxoplasmosis, que puede encontrarse en carnes poco hechas o crudas de cerdos, corderos, vacunos y aves.

. Los principales hospedaderos son los gatos y las personas que se han contagiado por heces de este felino.

. Otra forma de contaminación es por la ingestión de carne cruda o poco hecha; a partir de hospedadores intermediarios, como roedores, cerdos, vacunos, cabras, pollos y otras aves.

. Si la infestación transplacentaria acaece al principio de la gestación, puede terminar con la muerte del feto.

. Este parásito ocasiona hidrocefalia y ceguera en los niños; en los adultos los síntomas son menos graves, pero en individuos inmunodeprimidos produce neumonitis, miocarditis, meningoencefalitis, hepatitis y coriorretinitis, o una combinación de ambas.

. Un buen tratamiento culinario con calor destruye al parásito.

d.6. *Trichinella spiralis*:

. Agente productor de triquinosis (triquiniasis/triquinelosis), generada al ingerir carne de cerdo parasitada.

. Es un nemátodo que vive en los dos primeros tercios del intestino delgado, donde la hembra expulsa unas 1500 larvas, para por torrente sanguíneo, distribuirse por todo el organismo.

. Las larvas que penetran en el tejido muscular estriado (excepto el cardíaco) continúan su desarrollo, y las que invaden la mucosa duodenal se convierten en adultas en 3 – 4 días, repitiéndose el ciclo.

. Entre los síntomas están: enteritidis en la primera semana, fiebre irregular (39 a 41 °C), dolor muscular, dificultad respiratoria y también para hablar o moverse en la segunda semana. En la tercera semana se produce fiebre elevada, inflamación palpebral y dolores musculares. En la cuarta semana, fiebre y mialgias persistentes.

. Las larvas se destruyen de distintas formas: por calentamiento a 65,5 °C y por congelación a -15 °C durante 3 semanas o a -30 °C durante 1 día.

e. Micotoxinas

. Son sustancias metabólicas producidas por ciertos hongos microscópicos, siendo algunas de ellas fuertemente tóxicas para muchos animales y potencialmente para el hombre, con propiedades carcinogénicas en muchos casos. Se han identificado estas sustancias en más de 200 especies de estos mohos, desarrollándose en alimentos de origen vegetal y animal.

. Son producidas por mohos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, que son ubicuos como microflora normal de las plantas. Pueden generar micotoxicosis primaria y secundaria, de acuerdo a la siguiente figura:

. En términos generales, son resistentes a inactivaciones físicas, químicas y biológicas.

. Son de bajo peso molecular (<700 g/mol), aunque han surgido micotoxinas emergentes de mayor peso molecular como la beauvericina, aislada de *Fusarium proliferatum* y *F. verticillioides* (783 g/mol).

. Las micotoxinas pueden causar tanto en el hombre como en los animales, intoxicaciones agudas o crónicas con efectos teratogénicos, carcinogénicos y mutagénicos, que no influyen en la exposición de pesticidas o

residuos de metales pesados, esto puede ser causado por la ingesta directamente de alimentos contaminados por micotoxinas o bien por comer productos derivados de animales infectados por micotoxinas como puede ser leche o la carne.

. Una de las consecuencias por las que se produce un crecimiento de micotoxinas son las condiciones climáticas, que pueden favorecer al desarrollo de hongos y por consiguiente la producción de micotoxinas. Con estas condiciones se pueden formar micotoxinas en cualquier momento y lugar de la cadena de producción de alimentos (transporte, cosecha o manejo de alimentos). Es por ello que se desarrollan, en caso de aflatoxinas, por ejemplo, a condiciones óptimas de actividad de agua de 0,85 (con humedad relativa superior al 70%) y una temperatura entre 25 a 40 °C.

. Dentro de las conocidas están las aflatoxinas, patulinas, ocratoxinas, fumonisinas, zearalenona y tricotecenos.

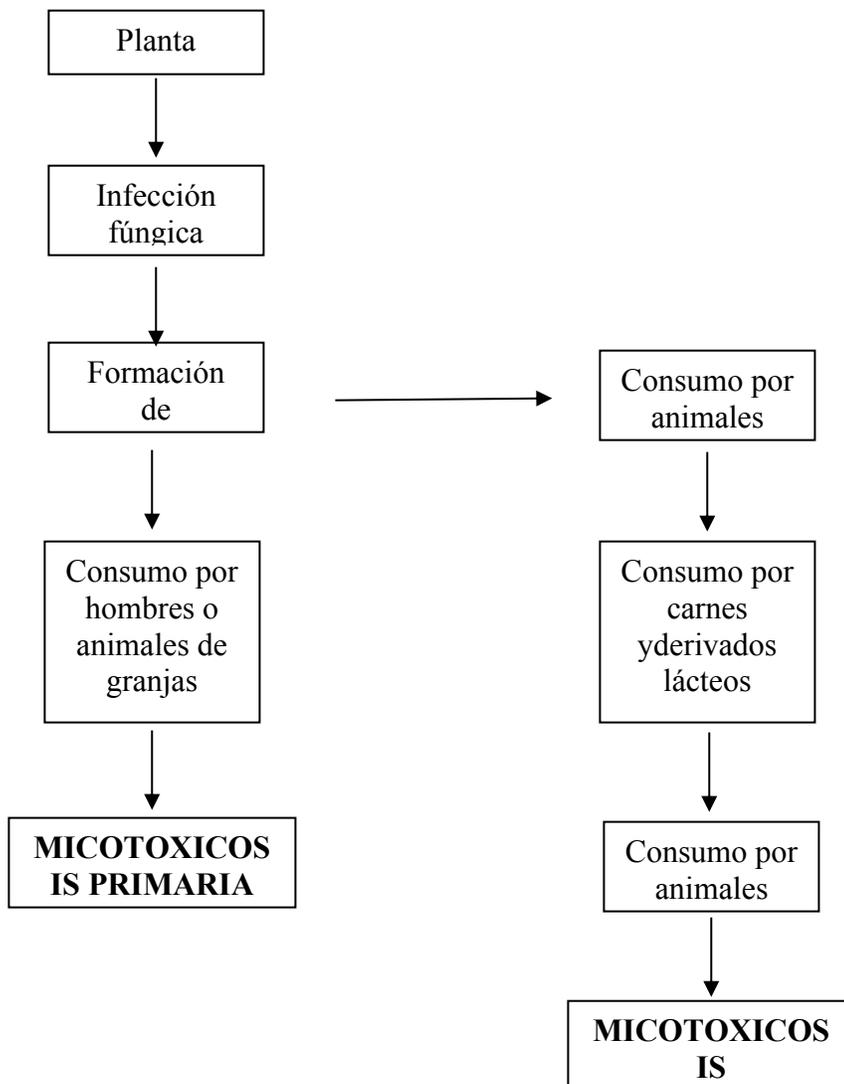


Figura 79. Micotoxicosis primaria y secundaria.
Fuente: Ramos (2016).

En la tabla siguiente se tiene una recopilación de cada una de ellas y los alimentos en los que pueden encontrarse:

Tabla 23. Mohos y micotoxinas encontradas en diversos alimentos

Mohos	Toxinas	Alimentos
Aspergillus	Aflatoxinas, Esterigmatocistina Ocratoxina A	Maíz, cacahuete, semillas Algodón, arroz, alubias Pasas, vinos, tejidos de animales
Fusarium	Tricotecenos (DON, NIV, toxina T-2, DAS) Zearalenona, Fumonisinas Fusarina, moniliformina	Trigo, maíz, arroz, cebada, centeno, avena
Penicillium	Patulina, citrinina Penitrem A Ocratoxina A Ácido ciclopiazónico	Frutas y zumos, arroz, queso, trigo
Alternaria	Altemariol Ácido tenenazónico	Frutas, legumbres y productos derivados de manzanas y tomates
Claviceps	Alcaloides del ergot	Trigo y derivados, centeno

Fuente: Sanchis, Marti y Ramos (2004).

Tabla 24. Principales micotoxinas y sus signos clínicos en animales infectados

Micotoxina	Hongo productor	Cereales	Signos clínicos
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Penicillium</i> spp	Maíz, trigo, sorgo, avena, soya	Daño hepático
Fumonisina	<i>Fusarium spp</i>	Maíz, trigo, cebada	Edema pulmonar, daño hepático
Ocratoxina	<i>Penicillium</i> spp <i>Aspergillus spp</i>	Maíz, cebada, trigo, avena, sorgo	Nefropatía, neurotoxicidad
Tricotecenos	<i>Fusarium spp</i> <i>Stachybotris</i> <i>Trichoderma</i> <i>Trichothecium</i>	Maíz, trigo, cebada, avena, arroz	Vómitos, hemorragias en el tracto digestivo, letargo, ataxia, trastornos reproductivos
Zearalenona	<i>Fusarium spp</i>	Maíz, cebada, trigo, avena, soya	Síndrome estrogénico

Fuente: Ramos (ob. cit).

Tabla 25. Principales efectos tóxicos de las micotoxinas en humanos y animales

Micotoxina	Efecto tóxico
Aflatoxinas	Daño hepático agudo, cirrosis, carcinogénesis, inmunodepresión, teratogénesis, bioacumulación
Fumonisinias	Neurotoxicidad, nefrotoxicidad, edemas pulmonar y cerebral, hepatotoxicidad, lesión cardíaca
Tricotecenos	Vómitos, taquicardia, diarrea, pérdida de atención, hemorragias, edemas, necrosis cutánea, desórdenes sanguíneos, alteración del sistema nervioso, rechazo del alimento, lesiones necróticas bucales.
Zearalenona	Síndrome estrogénico, problemas reproductivos
Ocratoxinas	Nefropatía, vómitos, teratogénesis, mutagénesis, embriotoxicidad
Patulina	Trastornos gastrointestinales y neurológicos, temblores corporales, mutagenicidad

Fuente: Ramos (ob. cit).

. En animales comunes de crianza genera los siguientes efectos:

Tabla 26. Impacto de las micotoxinas en ganado lechero, cerdos y aves

Impacto/Animal	Ganado lechero	Cerdos	Aves
Inmunosupresión	X	X	X
Lesiones hepáticas		X	X
Problemas renales		X	X
Edema pulmonar		X	
Diarreas	X		X
Úlceras gástricas		X	
Úlceras en mollejas			X
Abortos	X	X	
Gastroenteritis	X		
Disminución de producción láctea	X		
Aumento en el conteo de células somáticas	X		
Hígado graso	X		
Lesiones orales			X
Disminución de posturas y la calidad de los huevos			X

Fuente: Ramos (ob. cit).

. Los principales factores que tienen influencia sobre la toxicidad de las micotoxinas tanto en humanos como en animales, según Pommerville (2017) son:

- .. La biodisponibilidad y toxicidad de la micotoxina.
- .. Los sinergismos entre ellas.
- .. La cantidad de micotoxina ingerida diariamente en función de la concentración de micotoxina y de la cantidad de alimento ingerido.
- ..La continuidad o intermitencia de ingestión del alimento contaminado.
- .. El peso del individuo y el estado fisiológico y de salud de éste.
- .. La edad del individuo.

. Para minimizar el riesgo de las micotoxinas para la salud, se recomienda:

.. Inspeccionar los cereales enteros (especialmente el maíz, sorgo, trigo y arroz), higos secos y nueces (cacahuete, pistacho, almendra, nuez, coco, nueces de Brasil y avellanas), que están frecuentemente contaminados con aflatoxinas, para detectar la presencia de mohos, y descartar los que tengan un aspecto mohoso, descolorado o marchito.

.. Evitar el daño del grano antes y durante el secado, y durante el almacenamiento, ya que el grano dañado es más propenso a la invasión por mohos y, por lo tanto, a la contaminación por micotoxinas.

.. Cereales y frutos secos lo más frescos posible.

.. Almacenar los alimentos correctamente, libres de insectos, secos y no demasiado calientes.

.. No dejen pasar mucho tiempo antes de consumirlos.

.. Diversificar la dieta, con lo que no solo se reducirá la exposición a las micotoxinas, sino que también se mejorará la nutrición.

e.1. Aflatoxinas:

. Son un grupo de compuestos tóxicos muy parecidos estructuralmente, producidos por ciertas cepas de los mohos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* en condiciones favorables de temperatura y humedad. *Asp. flavus* genera aflatoxinas B y *Asp. parasiticus*, aflatoxinas G, diferenciadas por su fluorescencia a la luz (B₁, B₂: Azul y G₁, G₂: Verde); adicionalmente están las aflatoxinas M₁ y M₂, que son los metabolitos hidrolizados de las aflatoxinas B₁ y B₂ .

. Las aflatoxinas en general causan necrosis aguda, cirrosis y carcinomas hepáticos en un gran número de especies animales, donde ninguna especie de ellas es resistente a los efectos tóxicos agudos de estas sustancias; por lo tanto, en humanos pueden producir efectos similares (En las tablas 26 y 27 hay mayor información).

. La aflatoxina B₁ es la más tóxica de todas, con cepas que pueden crecer en productos lácteos o de panadería, zumos de frutas, cereales y forrajes; teniendo lugar el desarrollo de la cepa y la elaboración de aflatoxinas después que el producto ha sido cosechado y preparado. Se encuentran con frecuencia en artículos provenientes de áreas tropicales y subtropicales como el algodón, cacahuetes, especies de pistachos y maíz.

. Es la aflatoxina B₁ la más incidente y potente de todas, ejerciendo un efecto cancerígeno en muchas especies y eventos hemorrágicos por dilatación de capilares y vasos sanguíneos.

. Las aflatoxinas son las más incidentes, ocasionando en animales, disminución del nivel de rendimiento en cuanto a los efectos de ganancia de peso, tanto en vacunos como en porcinos y aves. En las aves de postura representa una disminución de los huevos generados, significando una pérdida significativa. Además de ello,

la FAO (2018) manifiesta que se genera una pérdida postcosecha de más de un millón de toneladas de maíz en el mundo por presencia de esta micotoxina.

. Los límites permisibles de micotoxinas varían dependiendo de cada país, por lo que se presentan en el ámbito mundial estas frecuencias por algunos países consultados:

Tabla 27. Número de países con límites permisibles de aflatoxinas totales (AFT) y aflatoxina B₁(AFB₁) en alimentos

Dosis (µg/kg)	AFT	AFB₁
35	2	
30	3	
20	17	3
15	8	2
10	8	5
5	3	21
4	29	
3	1	
2		29
1	3	1
0	2	

Fuente: Adaptado de Martínez y otros (2013).

. La mayoría de estos países pertenecen a la UE, en el que el valor límite importante es el de 5 µg/kg. En América Latina, más de la mitad de los países aceptan niveles 20 µg/kg; Estados Unidos y Canadá, por su parte no tienen un valor límite único para la aflatoxina B₁, aún así han adoptado los límites establecidos por la Unión Europea.

.En Venezuela (según la FAO 2004), solamente se encuentran reglamentados los niveles máximos de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ para el maíz, harina de maíz, maníes y manteca de maní (20 µg/kg) y de la aflatoxina M₁ para la leche de consumo (0,5 µg/kg) y leche en polvo (5,0 µg/kg).

. Respecto a las micotoxinas en alimentos para animales, la Unión Europea (UE) solo tiene, de momento, legislación en lo que se refiere a la aflatoxina B₁ (FAO, 2018). Los límites máximos en microgramos/Kg (ppb) se refieren a alimentos con una humedad de 12%; por lo que se tiene:

Tabla 28. Límites máximos en ppbde aflatoxinas para alimentos de 12% de humedad

Producto	Límite máximo permisible (µg/kg)
Todas las materias primas para alimentación animal	20
Alimentos completos para cerdos, aves de corral, bovinos, ovinos y caprinos (excepto animales de producción lechera y animales jóvenes)	20
Alimentos completos para ganado lechero	5
Alimentos completos para terneros y borregos	10
Otros alimentos completos	10
Alimentos complementares para cerdos, aves de corral, bovinos, ovinos e caprinos (excepto alimentos complementares para ganado lechero, terneros, borregos y otros animales jóvenes)	20
Otros alimentos complementarios	5

Fuente: Adaptado de Martínez y otros (ob. cit).

e.2. Ocratoxinas:

- . Producidas por *Asp. ochraceus*, *Penicillium verrucosum* y *P. viridicatum*.
- . La A es la más potente de ellas, pudiendo desarrollarse en cereales, en el mosto y en el vino tinto, cervezas, café, cacao, nueces y similares, especias y frutos secos.
- . La contaminación también puede llegar a la carne y a los productos de sangre de cerdo.
- . Es potencialmente nefrotóxica y carcinogénica, también es tetratogénica e inmunotóxica.

e.3. Fumonisinias:

- . Grupo de micotoxinas del género *Fusarium*, que se producen en todo el mundo, principalmente en el maíz y en los productos a base de este cereal. Son muy estables durante el procesado de los alimentos.
- . Las pruebas epidemiológicas sugieren un nexo con el cáncer esofágico.

e.4. Zearalenona:

- . Metabolito fúngico producido principalmente por *Fusarium graminearum* y *F. cumorum*; quienes colonizan el maíz, la cebada, avena y sorgo.
- . Puede ocasionar hiperestrogenismo y graves problemas reproductivos y de infertilidad en los animales, especialmente en los cerdos.

e.5. Tricotecenos:

. Los producen muchas especies del género *Fusarium*, infectando muchas plantas, entre ellas las de cereales como trigo, cebada y maíz.

. De los tricotecenos conocidos, el de mayor impacto es el desoxinivalenol y el nivalenol.

. En los animales causan vómitos y rechazo del pienso, además de trastornos en el sistema nervioso. En los humanos producen vómitos, cefaleas, fiebre y náuseas.

Para el control adecuado de micotoxinas en alimentos, principalmente cereales, es recomendable un secado adecuado de ellos, una higiene permanente de la planta y una ventilación acorde a las influencias ambientales. Ya que los mohos causales son muy incidentes en estos productos agrícolas, el objetivo sería evitar el desarrollo de los mismos, con una condición de secado cercano al 12%, un almacenamiento en un ambiente de humedad relativa inferior al 70% y una actividad de agua baja, inferior a 0,8.

REFERENCIAS CONSULTADAS

Bonifaz, A. 2012. *Micología clínica básica*. (4ta. Ed). España: McGrawHill. 726p.

Croxen, M.A; Law, R.J; Scholz, R; Keeney, K.M; Wlodarska, M y Finlay, B.B. *Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. (26) 4:822-80.

Frazier, W.C y Westhoff, D.C. 2017. *Microbiología de alimentos*. (5ta. Ed). España: Ed. Acribia, S.A. 682p.

Forsythe, S.J y Hayes, P.R. 2007. *Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP*. (2da. Ed). España: Acribia, S.A. 489p.

Forsythe, S. J. 2003. *Alimentos seguros: Microbiología*. España: Editorial Acribia, S.A. 410p.

Frazier, W.C y Westhoff, D.C. 2017. *Microbiología de los alimentos*. (4ta. Ed). España: Editorial Acribia, S.A. 681p.

Grande, A y Romero, A. 2017. Actualización en el diagnóstico, abordaje y prevención de la hepatitis A. [Documento en línea] <http://www.aepap.org/grupos/grupo-de-patologiainfecciosa/contenido/documentos>. [Consulta: Mayo 11, 2019]

Huesca, L; Sánchez, J y Bandala, E. 2014. *Métodos para la inactivación de esporas en alimentos*. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. (8)1: 48 – 67.

Koopmans, M. 2012. *Virus alimenticios desde una perspectiva global*. [Documento en línea] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114484/>. [Consulta: Mayo 9, 2019]

Madigan, M; Bender, K; Buckley, D; Matthew, W; Stahl, D; Dale, T y Martinko, J. 2015. *Biología de los microorganismos*. (14ª. Ed). EEUU: Pearson. 2830p.

- Martínez, H; Hernández, S; Reyes, C y Vásquez, G. 2013. *El género Aspergillus y sus micotoxinas en maíz en México: Problemática y perspectivas*. Rev. Mexicana de Fitopatología. (31)2: 126 – 146.
- FAO. 2018. *Aflatoxinas*. Departamento de Inocuidad de los Alimentos y Zoonosis. Resumen sobre inocuidad de alimentos. [Documento en línea] https://www.who.int/foodsafety/FSDigest_Aflatoxins_SP.pdf. [Consulta: Mayo 12, 2019]
- FAO. 2004. *Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003*. Estudio FAO Alimentación y Nutrición. N° 81. Roma, Italia.
- Pommerville, J. 2017. *Fundamentos de microbiología*. EEUU: Jones & Bartlett Learning; Edición. 944p.
- Ramos, A. 2016. *Micotoxinas: Situación actual y retos futuros*. Universidad de Leida, España. Unidad de Micología Aplicada. 84p.
- Riccardi, N; Antonello, R; Luzati, R; Zajkowska, J; Di Bella, S y Giacobbe, D. 2019. *Encefalitis transmitida por garrapatas en Europa: una breve actualización sobre epidemiología, diagnóstico, prevención y tratamiento*. European Journal of Internal Medicine. 62: 1 - 6.
- Sanchís, V; Martí, S y Ramos, A.J. 2004. *Micotoxinas y seguridad alimentaria*. Rev. Alimentación, Nutrición y Salud. 2004 (1):17-23.
- Serrano, H y Cardona, N. 2015. *Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos*. Rev. CES Med. (29)1: 143 – 151.
- Shors, T. 2009. *Virus: Estudio molecular con orientación clínica*. España: Editorial Médica Panamericana, S.A. 622p.
- Tortora, G; Funke, B y Case, C. 2007. *Introducción a la microbiología*. Argentina: Ed. Médica Panamericana. 959p.



MIGUEL ÁNGEL TORREALBA PIÑA

Ingeniero Agroindustrial (UNELLEZ); MSc. Ingeniería Industrial (UNEXPO); MSc. Ingeniería Agroindustrial (UNELLEZ); Doctor en Gerencia (UNY). Profesor Dedicación Exclusiva UNELLEZ – VIPI, subproyectos: Microbiología General, Microbiología Aplicada. Miembro del Comité de Arbitraje Revistas AGROLLANÍA, MEMORALIA y MANGUÍFERA (UNELLEZ). Investigador activo UNELLEZ e investigador PEII.