

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación
Desarrollo de material didáctico para el aprendizaje de microbiología de
alimentos a través de estudios de caso

Estudiante

Óscar Felipe Castellón Blandón

Asesores

Mayra Márquez González, Ph.D.

Ana Margarita Maier, Ph.D.

Honduras, agosto 2021

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ADELA M. ACOSTA MARCHETTI

Directora Departamento Agroindustria Alimentaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Contenido.....	3
Índice de Cuadros.....	5
Índice de Anexos.....	6
Resumen	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Metodología.....	12
Ubicación del Estudio.....	12
Estudios de Casos Relevantes para la Formación en Microbiología de los Alimentos	12
Diseño de Actividades Para que Complementen el Aprendizaje de la Materia Mientras se Prepara a los Estudiantes Para su Estudio de Caso	14
Revisión y Traducción de Material Didáctico.....	14
Elaboración de un Proyecto Final de la Clase	15
Redacción de Nota Sobre el Mejoramiento de la Enseñanza con el Uso de Estudios de Caso con el Propósito de Someterlo a Publicación en Revista Indexada.....	16
Resultados y Discusión.....	18
Estudios de Casos Relevantes Para la Formación en Microbiología de los Alimentos	18
Diseño de Actividades Para Complementar la Enseñanza de la Materia Mientras se Prepara a los Estudiantes Para su Estudio de Caso	19
Revisión y Traducción de Material Didáctico.....	19
Revisión de Proyectos de la Clase.....	22
Redacción de Nota Sobre el Mejoramiento de la Enseñanza con el Uso de Estudios de Caso con el Propósito de Someterlo a Publicación en Revista Indexada.....	24

Conclusiones	26
Recomendaciones.....	27
Referencias.....	28
Anexos.....	30

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Resultados de la diferencia en calificación del examen 1 y examen 2 de la clase 2022.....	19
Cuadro 2 Resultados de comparación del promedio de la calificación del examen 2 de la clase 2021 y la clase 2022.....	22
Cuadro 3 Resultados promedio de la calificación de los objetivos en el proyecto final de la clase 2021 y clase 2022.....	24

Índice de Anexos

Anexo A ¿Qué factores se requieren para que los microorganismos crezcan, sobrevivan y mueran..	30
Anexo B <i>Capítulo 3: Resolviendo Problemas de Deterioro Microbiano en Alimentos Procesados</i>	45
Anexo C <i>Factores intrínsecos y extrínsecos de los alimentos que afectan el crecimiento microbiano</i> .	62
Anexo D <i>Fuentes de microorganismos en alimentos</i>	87
Anexo E <i>Bosquejo de artículo para revista indexada</i>	100

Resumen

Los estudiantes con educación superior desarrollan mejor sus habilidades al aprender por medio de estudios de casos. En este proyecto se apoyó en la selección y desarrollo de material didáctico para la clase de microbiología de los alimentos en Zamorano. Esta modalidad tuvo que ser adoptada por el caso de la pandemia que se comenzó a vivir a finales del año 2019, haciendo que la manera en la que se enseña a los estudiantes de microbiología de los alimentos en este año variara. A los estudiantes de la clase 2022 se les brindaron 16 estudios de casos seleccionados meticulosamente, se tradujeron cuatro lecturas al español y se les presentó un ejemplo de proyecto final para que estos se guiaran. Al finalizar la clase y recibir los trabajos, se evaluó la calidad de los proyectos finales, enfocándose en hacer una comparación de la nota entre los trabajos recibidos este año y el pasado. Con esta información se redactó una nota para la comunidad educativa de ciencia y tecnología de los alimentos demostrando los hallazgos obtenidos. La implementación de esta nueva modalidad resultó en notas superiores a los estudiantes del año anterior con una diferencia estadísticamente significativa. Se pudo observar cómo benefició el material didáctico en la enseñanza de microbiología de los alimentos a través de estudios de caso. Se concluye que las adaptaciones en la metodología de este año tuvieron un efecto positivo en los estudiantes.

Palabras clave: Educación, enseñanza, lectura, pedagogía, rendimiento académico.

Abstract

Students in higher education develop their skills best by learning through case studies. This project supported the selection and development of teaching materials for the Food Microbiology course at Zamorano. This modality had to be adopted due to the case of pandemic that began to be experienced at the beginning of 2020, causing the way in which food microbiology students are taught this year varied. This year students were provided with 16 meticulously selected case studies, four readings were translated into Spanish, and a final project example was presented to guide them. At the end of the class and receiving the works, the grades of the final projects were evaluated, focusing on making a comparison of the quality of the works received this year to the past. With this information, a note was written for the food science and technology educational community demonstrating the results obtained. The implementation of this new modality resulted in higher grades than the students of the previous year with a statistically significant difference. It was possible to observe how the didactic material was beneficial to the teaching of food microbiology through case studies. It is concluded that the adaptations in this year's methodology had a positive effect on the students.

Keywords: Academic performance, education, pedagogy, reading, teaching.

Introducción

El aula de clases es un ambiente donde el estudiante es capaz de abrir un camino hacia el mundo del conocimiento con la ayuda de sus mentores. En muchas ocasiones para el estudiante se vuelve una tarea complicada aprender temas que por primera vez se escuchan complejos, como microbiología de los alimentos, volviéndose un desafío para el maestro el educar con una metodología que permita al estudiante absorber el contenido de una manera completa. Complementando la aclamación anterior, la situación que se está viviendo debido a la pandemia iniciada a finales del año 2019 llama a que el aula de clase se adapte a los nuevos retos de la enseñanza en línea. Por esta razón, la enseñanza de microbiología de los alimentos para los estudiantes de este año tuvo que pasar una transformación para lograr completar con las competencias que se esperan de los estudiantes. Para cumplir esto se presentan a los estudios de casos como una manera íntegra de lograr el aprendizaje de microbiología de los alimentos en los estudiantes de tercer año de la carrera de agroindustria alimentaria. Se sabe que los estudios de casos son una metodología poderosa para manejar grupos de clases. Los estudios de casos hacen posible el establecer una relación entre el aula de aprendizaje y el mundo real de las organizaciones, favoreciendo las habilidades cognitivas por medio de análisis, síntesis y juzgamiento (Minniti et al. 2017). Por estas razones los estudiantes sienten que al integrar estudios de caso se vuelven protagonistas de su proceso de formación al hacer investigaciones y toma de decisiones basados en que lo que opinan es correcto. Los estudios de casos gustan mucho y preparan para la toma de decisiones en cualquier área de la industria donde ejercerán futuramente. Sin embargo, es una tarea de importancia el medir el cambio en el desempeño del estudiante dado por la integración de material didáctico y trabajos de estudio de caso, para así demostrar la eficacia de esta herramienta pedagógica.

Los estudiantes de educación superior usualmente piden más entrenamiento basado en estudios de casos (Dubois-Brissonnet et al. 2015). Esta tendencia es causada ya que se prefiere tener menos lecturas teóricas y más estudios de casos que van a ser relevantes para la formación

profesional, sin embargo, siempre es necesario complementar el conocimiento haciendo una combinación de ambas. Los estudios de casos permiten tratar de resolver un problema donde no hay una sola solución establecida, pudiendo así discutir con compañeros y comparar la manera de razonar entre los colegas. Así se comparten los conocimientos adquiridos al haber leído diferentes documentos y revisado fuentes donde se encuentra información confiable y relevante. Esto ayuda a establecer asunciones propias y conclusiones referentes al estudio de caso. Al no haber una sola respuesta correcta, los estudiantes se aventuran en defender sus puntos de vista, basándose en los conocimientos que han ido estableciendo, sin mayor temor a estar equivocados. Se vuelve un trabajo donde se desarrolla el pensamiento crítico y la razón, y se elimina la creencia de que solo se puede seguir un camino para llegar a la fuente del problema. Esto crea muchas habilidades y ventajas en el estudiante. "Los estudios de casos se correlacionan con un incremento en ganancias de aprendizaje en habilidades de comunicación oral y escrita, más la habilidad de hacer conexiones entre conceptos biológicos y otros aspectos de la vida" (Bonney 2015). Por esta razón se cree que el enseñar con estudios de casos en la clase de microbiología de los alimentos formaría a los estudiantes de una manera más completa para el futuro.

Enseñar al alumno acerca de microbiología de los alimentos es un pilar fundamental en su preparación como tecnólogo de los alimentos. Desde un punto de vista sanitario, los alimentos pueden ser vehículos de infecciones o de intoxicaciones graves" (Andino Rgama y Castillo 2010). Es decir que los alimentos pueden ser una fuente de infecciones al llegar a ser ingeridos por decenas de consumidores, causando en sus organismos serios problemas. Por esta razón, es importante hacer una recopilación de información pertinente para la enseñanza de microbiología de los alimentos en este curso y así lograr que el estudiante tenga un conocimiento íntegro de esta área de la industria. Se deben de cubrir temas sobre microorganismos de mucha importancia en la industria como lo son: *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *Salmonella*, *S aureus*, *Vibrio*, *C. botulinum*, *Cyclospora*, *Campylobacter* y *Listeria monocytogenes*. Estos microorganismos son capaces de provocar enfermedades en los

consumidores, siendo una responsabilidad de los tecnólogos de alimentos el saber cómo controlarlos. Algunos casos que han ocurrido son *Salmonella hadar* en pavo en 2021, *Listeria monocytogenes* en carnes estilo italianas en 2020, *Salmonella enteritidis* en pollo crudo en 2018, *Salmonella newport* en carne molida en 2018 (Food Safety and Inspection Service 2021). El conocimiento sobre qué factores intrínsecos y extrínsecos afectan al alimento, los microorganismos que pueden estar presentes en las diferentes etapas de la producción, las acciones que se pueden realizar para inactivar los microorganismos, y los patógenos que son de mayor peligro son algunos de los temas que cubre la microbiología en los alimentos. El medir la mejora de los estudiantes en este curso al haber implementado esta metodología tendrá un gran valor para futuras referencias, pudiendo ser presentado como una metodología efectiva para la enseñanza de cursos de nivel superior.

Este proyecto se basa en el desarrollo de material didáctico para el aprendizaje de microbiología de los alimentos. Se espera lograr identificar los estudios de casos relevantes para la formación en microbiología de los alimentos. También, se quiere diseñar actividades para complementar la enseñanza de la materia mientras se prepara a los estudiantes para su estudio de caso. Por último, se planea redactar una nota sobre el mejoramiento de la enseñanza con el uso de estudios de caso con el propósito de someterlo a una revista científica.

Metodología

Ubicación del Estudio

El proyecto se llevó a cabo desde el mes de diciembre hasta el mes de mayo, con apoyo desde la Escuela Agrícola Panamericana el Zamorano, ubicado en km 30 de la carretera a Danlí-Tegucigalpa en el valle del Yeguaré, Honduras. Dentro de la institución se trabajó con el departamento de Agroindustria Alimentaria, junto a la clase de Microbiología de Alimentos del plan de estudio de Agroindustria Alimentaria.

Estudios de Casos Relevantes para la Formación en Microbiología de los Alimentos

“El estudio de caso se puede definir como un estudio intensivo sobre una persona, un grupo de personas o una unidad, que tiene como objetivo generalizar sobre varias unidades” (Heale y Twycross 2018). En este proyecto los estudios de casos están relacionados con brotes de enfermedades de transmisión alimentaria. Para poder enseñar a los estudiantes acerca de cómo funcionan los estudios de casos se les presentaron 16 situaciones reales de donde se le asignó una a cada grupo para poder realizar su proyecto final. La enseñanza con estudios de casos puede mejorar las competencias y comportamiento sobre la inocuidad alimentaria (Yiannas 2009). Estos estudios de casos fueron seleccionados meticulosamente al utilizar bases de datos como la Cambridge Core de la universidad de Cambridge en Inglaterra y en el Diario de Protección de Alimentos el cual tiene publicaciones que datan de 1937. Cuatro de los casos que se les dieron a los estudiantes vienen de la base de datos de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos y cinco del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos. Otras bases de datos fueron ELSEVIER, Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria para la unión europea y Central Biomédica que es parte de Springer Nature, parte de la editora Springer. Cada uno de estos estudios de caso presentan un brote de enfermedad en diferentes alimentos que causan intoxicaciones en diferentes continentes. Todos estos estudios de caso son de eventos reales recientes, con fechas de 2017 a 2020. En estos se presentan alimentos como mantequilla de soya, carne de res, curry en polvo,

queso, carne de cangrejo, germinados, fórmulas infantiles entre otros. Con esto se logró tener una buena variedad de alimentos perecederos, los cuales son aquellos que tienen una duración corta y se descomponen rápidamente influenciados por factores como temperatura y humedad, al igual que alimentos no perecederos, los cuales tienen una vida anaquel más larga. Entre los microorganismos que afectaron a estos alimentos están: *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Cyclospora*, *Clostridium botulinum* y otros. El tener diversidad de microorganismos hace que los estudiantes tengan que realizar investigaciones muy propias, también les permite enriquecerse de los trabajos de sus compañeros al ser proyectos tan únicos. Otro beneficio de tener estudios de casos variados es que pueden aprender de diferentes microorganismos, como bacterias y parásitos. Algunos estudiantes van a lograr encontrar diferentes especies de microorganismos, distintas temperaturas de crecimiento y diferentes tiempos de incubación. Hay un caso en donde se encuentran 12 personas afectadas, otros con 71 personas, otros con 13 y otros sin ninguna persona afectada. Se buscaron casos que tuvieran diferentes magnitudes de contagio u ocurrencias para que los estudiantes dimensionen la importancia que tiene esta temática. Hay casos que, aunque no se tuvieran afectados, el brote causó un retiro masivo del producto en el mercado por resultados positivos a *Salmonella* al hacer las pruebas de rutina en planta. Algunos casos fueron por malas prácticas en restaurantes, otros por malas prácticas de una planta industrial y otros por malas prácticas en una explotación casera. Unos casos tuvieron como víctimas a infantes, otros a grupos de deportistas, otros a estudiantes de un internado y otro a mascotas. De esta manera se tuvo un listado de estudios de casos muy variado, perfecto para que los estudiantes pusieran en práctica lo aprendido a lo largo del curso.

Diseño de Actividades Para que Complementen el Aprendizaje de la Materia Mientras se Prepara a los Estudiantes Para su Estudio de Caso

Revisión y Traducción de Material Didáctico

Se consideró necesario complementar las horas de clases que los estudiantes reciben con lecturas y tareas. Esto les permitiría a los estudiantes lograr tener mayores destrezas al momento de comenzar a realizar sus documentos y presentaciones del proyecto final. Para esto, se buscaron cuatro lecturas de libros que tuvieran relevancia y congruencia con lo que se está queriendo enseñar en la clase de microbiología de los alimentos. Los documentos que se presentaron cubren los temas de: actividad microbiana en alimentos, los alimentos como ambiente selectivo, control de microorganismos, el sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP), factores intrínsecos y extrínsecos de los alimentos que afectan el crecimiento microbiano, problemas de deterioro microbiano en alimentos procesados, factores que se requieren para que los microorganismos crezcan, sobrevivan y mueran. Todos estos temas fueron meticulosamente seleccionados de los mejores textos que se lograron adquirir para presentarle a los estudiantes.

Toda la información recopilada se encontraba en el idioma inglés. Debido a que algunos de nuestros estudiantes no poseen las capacidades suficientes para lograr comprender una lectura en inglés, se decidió hacer traducción de los documentos. Esta traducción se fue realizando en cada documento a la vez, desde los títulos hasta las referencias, manteniendo los cuadros y el formato. Esta información era revisada y se hacían los cambios necesarios. Una vez que el documento se encontraba libre de errores de traducción se pasó a realizar los cambios en el formato para que ambos documentos estuvieran idénticos. A cada uno de estos documentos se les escribió una leyenda en el margen izquierdo que indica que es una traducción utilizada para la clase de microbiología de los alimentos en el departamento de agroindustria alimentaria en la universidad Zamorano.

A los estudiantes se les brindó los documentos que debían leer. Una vez realizada la lectura procedían a realizar la tarea asignada a cada documento. Estas tareas constaban de resúmenes,

cuestionarios y controles de la lectura. Materiales que les serviría más adelante cuando afrontan la tarea de realizar el proyecto final de la clase. Las tareas de los estudiantes fueron de buena calidad, viéndose que habían logrado asimilar la información brindada en los documentos de una manera satisfactoria. Posteriormente, se procedió a dar la charla de la clase. Esto hacía que la clase fuera más dinámica al momento de realizar discusiones.

Cabe agregar, que existe una limitante con este tipo de material didáctico, y es que a los estudiantes de la generación Z les disgusta leer. Es un hábito que se ha perdido a medida del tiempo gracias a los medios audiovisuales, ya que vivimos en un mundo que llena de información a la persona lo más rápido posible. Sin embargo, existe una diferencia notable al momento de evaluar la comprensión entre una lectura y un video. Esto porque la persona debe dedicar más tiempo, atención y análisis a las lecturas. Esto hace que la persona se detenga, razone y continúe. El hábito de la lectura es importante que sea retomado para lograr una comprensión de temas que requieren de bastante cuidado al detalle, como la microbiología de los alimentos.

Elaboración de un Proyecto Final de la Clase

Con el objetivo de brindar a los estudiantes una guía sobre lo que se esperaba que ellos realizaran en su proyecto final, se elaboró un proyecto modelo con dos estudios de casos relacionados al mismo microorganismo y alimento. Estos estudios de casos fueron obtenidos del Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos, con el fin de utilizar una de la base de datos que igualmente se utilizó para la búsqueda de los estudios de casos presentados a los estudiantes. La finalidad de la realización de un proyecto modelo de la clase utilizando dos estudios de casos era demostrar cómo este alimento en dos casos diferentes presentó un problema a la sociedad dado por el mismo microorganismo. Para poder darle a los estudiantes un modelo adecuado de proyecto final para la clase, este documento modelo fue elaborado paso a paso siguiendo las instrucciones que se tenían para los estudiantes de microbiología de este año. Se describieron los parámetros intrínsecos, extrínsecos, el diagrama de flujo, la inocuidad del producto al enlistar los patógenos de interés, se

describió el brote alimentario que ocurrió, se determinaron las fuentes y mecanismos de contaminación, se dieron mecanismos de control y se brindaron regulaciones para este alimento en diferentes países. Este trabajo se esperaba que los estudiantes lo pudieran redactar en aproximadamente 20 páginas y se esperaba que cubrieran los objetivos de aprendizaje en un nivel satisfactorio, las cuales fueron presentadas en el trabajo modelo. Cabe recalcar que el trabajo modelo sirve para que se guíen los estudiantes, ya que cada grupo trabajará con su propio alimento y microorganismo de su estudio de caso. El proyecto incluye la preparación de un video, del cual también se les presentó un ejemplo junto a una presentación con diapositivas. Este proyecto grupal tuvo bastante discusión entre los estudiantes, quienes dieron sus puntos de vista de acuerdo con lo aprendido en la clase, lo leído y lo investigado. Se esperaba que cada grupo lograra las competencias de encontrar los parámetros intrínsecos y extrínsecos del producto, describir un diagrama de flujo del producto alimenticio asociado a su caso, describir la inocuidad del producto y enlistar los patógenos de interés. Además, deberían buscar una razón por la cual ocurrió la contaminación, identificando de esta manera las fuentes y los mecanismos de contaminación, discutirían cómo los factores intrínsecos y extrínsecos pueden proporcionar o controlar el crecimiento de microorganismos deterioradores y sugerir mecanismos de control. Para completar su formación deberían investigar sobre las regulaciones de acuerdo con las normas de elaboración y de criterios microbiológicos para los alimentos asignados en sus países o zonas de origen.

Redacción de Nota Sobre el Mejoramiento de la Enseñanza con el Uso de Estudios de Caso con el Propósito de Someterlo a Publicación en Revista Indexada

En esta parte del proyecto se inició con la lectura de trabajos con un enfoque similar. Para esto, se revisaron publicaciones en la base de datos académica Diario de Educación en Ciencia de los Alimentos (JFSE), dentro de esta base de datos se realizó una búsqueda utilizando palabras claves para lograr encontrar artículos que fueran de relevancia para este trabajo. Algunas de las palabras claves que se utilizaron fueron: Estudios de caso, técnicas de aula, métodos tecnológicos, metodología y

brotos alimentarios. Para lograr aprender cómo publicar en esta editorial se ingresó a la página del Instituto de Tecnólogos de Alimentos (IFT por sus siglas en inglés). Dentro de la página hay un área que se llama directrices de los autores que explica cuál es la misión, el alcance y los objetivos de la editorial, los temas que se cubren, las políticas y un modelo para realizar el artículo científico. De igual manera, hay un video de 45 minutos que se estudió para aprender paso a paso, cómo es que se debe realizar el proceso de someter a revisión un artículo para ser publicado en la editorial. Es importante recalcar que dentro de esta editorial hay diversas revistas (journals) que cubren diferentes temas, por esa razón se debe de escoger la revista que cubre el tema de la investigación. En este caso cae dentro del área de Seguridad y Microbiología Alimentaria y la encargada de esta área actualmente es Shelly Schmidt. Dentro de la editorial del Instituto de Tecnólogos de los Alimentos (IFT) nos interesa publicar en la revista científica "Diario de Educación en Ciencias de los Alimentos" ya que este proyecto cae bajo los temas que son cubiertos por esta revista. El objetivo de la revista es facilitar a educadores en el área de ciencia de los alimentos. El documento fue realizado paulatinamente, haciendo ajustes y modificaciones. Este será sometido a la editorial una vez se logren concretar las modificaciones finales.

Resultados y Discusión

Estudios de Casos Relevantes Para la Formación en Microbiología de los Alimentos

Con estos estudios de caso los estudiantes lograron relacionar diferentes microorganismos con diferentes alimentos, además lograron ver ciertas patologías que se relacionan con estos microorganismos al realizar el proyecto final para la clase. Los estudiantes lograron aprender a asociar los brotes de enfermedades alimenticias con causas específicas. Muchos brotes son el resultado de una contaminación post proceso o pobre higiene personal, lo cual se puede prevenir si se asegura que la fuerza laboral tenga comportamiento y actitud adecuada (Chapman et al. 2010). Son diferentes las causas en cada uno de estos casos, sin embargo, se esperó que los estudiantes lograran hacer trabajos donde los identificaran y así fue. Las presentaciones que realizaron fueron de calidad, teniendo errores muy mínimos y habiendo sobrepasado los estándares esperados.

El sistema de aprendizaje por medio de proyectos da la oportunidad de tomar en cuenta que cada estudiante aprende, piensa y procesa la información de formas diferentes (Gross Davis 2009). Por esta razón, al discutir los estudiantes entre sí lograron adquirir un pensamiento crítico más desarrollado al razonar sobre de los puntos que se destacaron en el proyecto. De igual manera, los estudiantes lograron ampliar sus conocimientos de los temas cubiertos y realizaron trabajos de calidad. Este proyecto logró simular cómo los estudiantes siendo futuros tecnólogos de los alimentos pueden rastrear la razón de brotes alimentarios, brindando una solución como grupo, de la manera que reaccionarían dentro de una empresa del sector laboral. La enseñanza con proyectos asiste al estudiante a aplicar habilidades aprendidas en la clase a situaciones fuera de la clase, al haber puesto al estudiante en una situación similar a la que se encontraría en la vida real (Fruger 2002).

Para evaluar el cambio que tuvieron los estudiantes de esta clase antes y después de haber pasado por toda la metodología de los estudios de caso como forma de aprendizaje se decidió medir las notas de los exámenes uno y dos. Las notas del primer examen representan las calificaciones que estaban obteniendo los estudiantes antes de haber sido capacitados con la metodología. Las notas del

segundo examen muestran las notas de los estudiantes después de haber logrado completar la lectura del material didáctico más los estudios de caso. Para medir estos datos se utilizó el programa de SAS realizándose una prueba t para muestras pareadas. Se utilizaron muestras pareadas porque se están comparando las notas de los mismos estudiantes, pero en diferentes momentos, evaluándose así la misma población. En esta medición se evaluó el cambio significativo entre la nota del examen uno y el examen dos de los estudiantes. Debido a que se usó una probabilidad del 95%, se puede decir que existió un cambio significativo en la nota de los estudiantes. Vale la pena recalcar que la nota promedio del primer examen fue de 66 puntos, mientras que la nota promedio del segundo examen fue de 78 puntos, por lo que, el promedio de la diferencia fue de un 15.38% de aumento entre el examen 1 y el examen 2 de los estudiantes de la clase 2022. Esto se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1

Resultados de la diferencia en calificación del examen 1 y examen 2 de la clase 2022.

Clase 2022	Promedio \pm D.E
Examen 1 * Examen 2	12.16 \pm 10.79
Pr> t	< 0.0001

Diseño de Actividades Para Complementar la Enseñanza de la Materia Mientras se Prepara a los Estudiantes Para su Estudio de Caso

Revisión y Traducción de Material Didáctico

Para poder hacer una medición y verificación de una existencia de cambio en el aprendizaje de la materia por parte de los estudiantes, se decidió hacer una comparación del examen dos presentado por los estudiantes de este curso con el examen dos presentado por los estudiantes del año anterior. Ambas clases recibieron charlas de calidad, teniendo como diferencia la integración de más material didáctico en los estudiantes de este año. Fueron cuatro las lecturas que se tradujeron del inglés al español para brindarles a los estudiantes el complemento de su formación. En la primera lectura (Anexo A) se cubrían temas acerca de los factores que se requieren para que los

microorganismos crezcan, sobrevivan y mueran. Esta lectura fue de importancia para la formación de los estudiantes ya que les brindó conocimientos acerca grupos de microorganismos que son importantes en la industria alimentaria. Pudieron aprender acerca de la manera característica de crecer de las bacterias al leer acerca de las fases de adaptación, fase de latencia, fase log, estacionaria y muerte. Conocieron los factores intrínsecos como la cantidad de agua biológicamente disponible, la potencial oxidación/reducción del alimento, su pH y el tipo de ácido presente. Con esta lectura también lograron leer acerca de los factores extrínsecos como la temperatura y conocer sobre tratamientos de alta presión, campos eléctricos pulsados, rayos x, luz ultravioleta y secado. Aquí mismo se presentaron conceptos, como concepto de obstáculos: "La capacidad de los factores intrínsecos y extrínsecos para afectar la capacidad de los microorganismos para sobrevivir o crecer se ha utilizado para promover la inocuidad y retrasar el deterioro" (Kornacki y Doyle 2009).

La segunda lectura (Anexo B) analiza procesos de deterioro microbiano en alimentos comunes. Así mismo, aborda el aislamiento y la identificación de organismos de descomposición, cerrando con estudios de casos como ejemplos. Explica en parte como se deben de juntar los métodos de conservación de los alimentos: "En la fabricación de alimentos procesados se han empleado varios métodos de conservación que involucran una o una combinación de tecnologías de proceso, tales como deshidratación, fermentación, salazón, desinfección química, enlatado, refrigeración, congelación e irradiación" (Clavero 2009). Los alimentos y sus microorganismos deterioradores abordados en esta lectura son: deterioro de carne, aves y pescado procesados, deterioro de productos lácteos, deterioro de bebidas, deterioro de productos de panadería, deterioro de alimentos enlatados y deterioro de frutas y productos de confitería. Esta lectura les resulta útil a los estudiantes al tener un lugar donde consultar o guiarse rápidamente al momento de comenzar a trabajar en los estudios de caso que les fueron asignados. El tercer documento (Anexo C) traducido trata acerca de factores intrínsecos y extrínsecos que afectan el crecimiento microbiano, profundizando más que en la primera lectura, pero siempre cubriendo temas relacionados. En este se discuten los efectos de los parámetros

intrínsecos y extrínsecos. En los parámetros intrínsecos se habla del pH, contenido de humedad, potencial de oxidación-reducción, contenido de nutrientes, constituyentes antimicrobianos y estructuras biológicas (Jay 2005). Se cubre el efecto que tiene cada uno de estos parámetros en los microorganismos y cómo afecta la combinación de uno o más de estos parámetros en el crecimiento de los microorganismos. En los parámetros extrínsecos se habla acerca de la temperatura de almacenamiento, la humedad relativa del medio ambiente, la presencia y contracción de gases y la presencia y actividad de otros microorganismos. Esta lectura les funciona mucho a los estudiantes ya que una de las competencias específicas en el proyecto de estudios de casos mide la capacidad que ellos tienen para relacionar los factores intrínsecos y extrínsecos de su alimento con la bacteria que está relacionada con el brote alimentario. Además, es de vital importancia que los estudiantes puedan lograr relacionar alimentos con los microorganismos capaces de atacarlos.

La última lectura (Anexo D) fue escrita por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, por sus siglas en inglés). Esta lectura cubre temas de aspectos históricos sobre los microorganismos en los alimentos, los alimentos como ambientes selectivos, la microflora de alimentos procesados, el control de microorganismos en alimentos, los programas de educación y formación y el sistema de control HACCP. Esta lectura enriquece al estudiante al brindar un conocimiento más amplio del enfoque que debe de darle un ingeniero a una industria que está procesando alimentos mientras les da especificaciones que se deben de seguir. Ejemplo: "la pasteurización de la leche para destruir *Coxiella burnetii* y *Mycobacterium tuberculosis*" (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, Inc 2011) . Cubre temas importantes, haciendo que el estudiante pueda llevarse una idea de los aspectos que deben de tomar en cuenta al momento de iniciar una producción de alimentos procesados. Los temas cubiertos en esta lectura son de gran importancia para este curso ya que todos son revisados en el proyecto de estudios de casos. Para analizar las notas se utilizó el programa SAS, donde se realizó una prueba t, con tipo de muestra

independientes. La razón por la cual se utilizó el tipo de muestra independiente es porque ningún estudiante estuvo en ambos grupos.

En este análisis se evaluó si existió un cambio significativo entre las notas del examen dos presentado por los estudiantes del año anterior con las notas del examen dos de los estudiantes del año en curso. La probabilidad usada fue de 95%, por lo que, se concluye que existe un cambio significativo en las notas de los estudiantes. Se puede inferir que el diseño de actividades para complementar la enseñanza de la materia si tuvo un efecto positivo en las notas de los estudiantes. Estos valores son mostrados en el Cuadro 2.

Cuadro 2

Resultados de comparación del promedio de la calificación del examen 2 de la clase 2021 y la clase 2022.

Examen 2	Promedio \pm D. E.
Clase 2021	63.59 \pm 9.43
Clase 2022	78.40 \pm 9.99
Pr > t	< 0.0001

Revisión de Proyectos de la Clase

Al revisar los trabajos se logró constatar que los estudiantes pudieron hacer sin mayor problema lo esperado, trabajaron en equipo y pudieron determinar las causas de los brotes en los casos. Los estudiantes realizaron trabajos de gran calidad, solo algunos cometieron el error de no aplicar formato de itálica en los nombres científicos. Los nombres científicos están en latín, y no en español o inglés que son los lenguajes de escritura usados universalmente (Cruz 2014). El utilizar el latín para los nombres científicos nos ayuda en la sociedad científica para asegurarnos de hablar un lenguaje universal al referirnos a los microorganismos y que no existan variaciones al querer traducir de un idioma a otro. Al revisar los trabajos se fueron evaluando objetivo por objetivo, cada uno de estos cubría una competencia específica, estos son presentados en el Cuadro 3.

La competencia uno pretende revisar si los estudiantes fueron capaces de discutir el rol y la importancia de la adaptación y factores ambientales en el crecimiento y la inactivación de microorganismos en varios ambientes. En ambas clases se lograron obtener buenos promedios, al compararlos no se encontró un cambio significativo entre las notas.

La segunda competencia evalúa si los estudiantes hubieran sido capaces de identificar las condiciones y prácticas sanitarias en las cuales se puede controlar la contaminación de los alimentos. En este objetivo ambas clases obtuvieron un buen promedio, sin tener un cambio significativo entre las notas obtenidas.

La tercera competencia mide la capacidad de identificar los principales microorganismos benéficos, patógenos y deterioradores de interés en el alimento asignado a cada estudio de caso. Ambas clases obtuvieron promedios muy buenos, sin tener un cambio significativo entre las notas obtenidas. La competencia cuatro es la capacidad de identificar los principales patógenos relacionados en el alimento asignado más la descripción de las condiciones bajo las cuales los patógenos de interés son destruidos o controlados en este alimento. Ambos grupos lograron obtener un buen promedio, sin embargo, no existió cambio significativo entre las notas. La competencia cinco mide qué tal lograron describir el brote de enfermedad de transmisión por los alimentos asignado, incluyendo especificaciones como el número de casos, el periodo de incubación, las fuentes y mecanismos de contaminación, los factores que influyeron, las medidas de control del patógeno y el historial de decomisos entre otros temas. Ambas clases lograron obtener una puntuación perfecta en esta área. Finalmente, la competencia seis mide la capacidad que tenían los grupos de conocer las regulaciones gubernamentales requeridas para la manufactura y venta del producto, así como métodos oficiales para el análisis microbiológico del producto. En este caso se logró ver que los estudiantes de la clase del curso actual lograron tener un mejor promedio que los estudiantes del año anterior. Al realizar el análisis estadístico se obtuvo una probabilidad por debajo del 5%. Esto quiere decir que la implementación de un proyecto modelo para la clase de microbiología de los alimentos logró tener

mejoras estadísticamente significativas en una de las competencias medidas en el proyecto final. Los estudiantes de la Clase 2022 lograron mejorar significativamente sus destrezas y habilidad en esta competencia.

Cuadro 3

Resultados promedio de la calificación de los objetivos en el proyecto final de la clase 2021 y clase 2022.

Objetivos	Clase 2021 Promedio \pm D.E	Clase 2022 Promedio \pm D.E	Pr> t
Competencia 1: Discutir el rol y la importancia de la adaptación y factores ambientales en el crecimiento y la inactivación de microorganismos en varios ambientes.	5.00 \pm 0.00	4.93 \pm 0.25	0.3332
Competencia 2: Identificar las condiciones y prácticas sanitarias en las cuales se puede controlar la contaminación de los alimentos.	5.00 \pm 0.00	4.93 \pm 0.25	0.3332
Competencia 3: Identificar los principales microorganismos benéficos, patógenos y deterioradores de interés en los alimentos y las condiciones bajo las que crecen.	4.62 \pm 0.80	4.50 \pm 0.81	0.6661
Competencia 4: Identificar los principales patógenos relacionados en el alimento y describe las condiciones bajo las cuales los patógenos de interés en los alimentos son destruidos o controlados.	4.87 \pm 0.50	4.93 \pm 0.25	0.6591
Competencia 5: Descripción del brote de ETA. Incluye números de casos, periodo de incubación, fuentes y mecanismos de contaminación, factores que influyeron a la propagación, medidas de control del patógeno, historia de decomisos, costo del brote y consecuencias del brote.	5.00 \pm 0.00	5.00 \pm 0.00	-
Competencia 6: Conoce las regulaciones gubernamentales requeridas para la manufactura y venta del producto, así como métodos oficiales para el análisis microbiológico de los productos.	4.31 \pm 0.87	5.00 \pm 0.00	0.0066

Redacción de Nota Sobre el Mejoramiento de la Enseñanza con el Uso de Estudios de Caso con el

Propósito de Someterlo a Publicación en Revista Indexada

Con la revisión de trabajos similares se logró reforzar la importancia de aprender acerca de microbiología de los alimentos ya que se encontraron artículos relacionados al tema, especialmente dentro del área de microbiología de los alimentos que forma parte de la editora de la revista de

Educación en Ciencia de los Alimentos. Se pudo ver como estudiantes en otras instituciones han logrado aprender acerca de microbiología predictiva para determinar la vida anaquel de algunos productos, se leyó acerca de metodologías que han sido utilizadas para enseñar a los estudiantes, se aprendió acerca de diseño de clases para enseñar acerca de microbiología de los alimentos y se pudo leer acerca de microorganismos importantes. Algunos de los artículos que se leyeron utilizaban enseñanza por medio de proyectos y competencias, uso de sitios web con multimedia para ayudar a la enseñanza, los efectos de implementar modelos de aula invertida. Mientras se leyó acerca de estos temas se pudo revisar un poco acerca del tipo de estructura que llevan los artículos científicos en este editorial, la forma en la que redactan las personas que han publicado y el tipo de contenido que es publicado usualmente. El revisar trabajos similares dio a entender la importancia que tiene este tipo de proyectos, ya que la finalidad que tenía la mayoría de las lecturas era el desarrollo de técnicas que fueran útiles en los salones de clase para poder compartir el conocimiento con los estudiantes. Además, se ve que el implementar estudios para la elaboración de un proyecto en la clase puede beneficiar la vida laboral de los estudiantes. En la vida real, los profesionales en el área laboral tienen que ser efectivos y eficaces en resolver problemas, trabajar con clientes y manejar el tiempo (Willard y Duffrin 2003). Por esta razón, se considera que el proyecto final ayudó a que los estudiantes aprendieran a encontrar la solución de problemas que se les presentan mientras manejan su tiempo con el resto de las clases y exámenes finales, colaborando como equipo. El aprender por medio de proyectos es un método de enseñanza especialmente efectivo al compararlo con métodos más tradicionales de aprendizaje, particularmente para resolver situaciones de la vida real (Hargreaves 1997). Se espera que los estudiantes que recibieron la enseñanza con la metodología de los estudios de casos hayan logrado integrar el conocimiento y lo mantengan durante toda la vida. Con esto se espera que los ayude más adelante a poder ofrecer asesoría y evitar brotes de enfermedades transmitidas por alimentos a lo largo de su vida laboral. Esta misma razón es la que impulsó a que se realizará la nota (Anexo E) sobre el mejoramiento y se espera sea publicada en la revista indexada.

Conclusiones

Se consolidaron estudios de casos que tuvieron un impacto en la formación de los estudiantes de microbiología al tener mejoras en las competencias evaluadas en la clase.

Se realizó la traducción de material didáctico con el cual los estudiantes completaron tareas antes de las clases dictadas, dando como resultado un aumento del diez por ciento en las notas de sus exámenes. Esto fue por una mejora en la enseñanza en microbiología de los alimentos al prepararlos mejor para sus estudios de caso.

Se logró la redacción de un artículo científico el cual presenta los hallazgos obtenidos en la mejora de la enseñanza al haber implementado la metodología de este año en línea por la pandemia del COVID-19.

Recomendaciones

Realizar más proyectos de este tipo para tratar de evaluar otras estrategias pedagógicas que pudieran beneficiar a los estudiantes durante la pandemia.

Evaluar los efectos de la pandemia en relación con la actitud de los estudiantes sobre el estudiar desde casa.

Referencias

- Andino Rgama F, Castillo Y. 2010. Microbiología de los alimentos: Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria. Esteli- Nicaragua: [sin editorial] ; [consultado el 30 de dic. de 2020]. <https://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/documento-microbiologia.pdf>.
- Bonney KM. 2015. Case study teaching method improves student performance and perceptions of learning gains. *Journal of Microbiology & Biology Education*; [consultado el 20 de ene. de 2021]. 16(1):21–28. eng. doi:10.1128/jmbe.v16i1.846.
- Chapman B, Eversley T, Fillion K, Maclaurin T, Powell D. 2010. Assessment of food safety practices of food service food handlers (risk assessment data): testing a communication intervention (evaluation of tools). *J Food Prot.* 73(6):1101–1107. eng. doi:10.4315/0362-028x-73.6.1101.
- Clavero R. 2009. Solving Microbial Spoilage Problems in Processed Foods. En: Kornacki JL, Doyle MP, editores. *Microbiological Troubleshooting in the Industrial Food Processing Environment*. New York: Springer. p. 63–78 (Food Microbiology and Food Safety Ser).
- Cruz F. 2014. Why are scientific names italicised? Philippines: University of the Philippines Los Baños; [actualizado el 16 de ene. de 2014; consultado el 4 de feb. de 2021]. <https://mnh.uplb.edu.ph/14-content/news/133-why-are-scientific-names-italicised>.
- Dubois-Brissonnet F, Guillier L, Naitali M. 2015. Teaching microbiological food safety through case studies. *International Journal of Food Studies*; [consultado el 27 de dic. de 2020]. 4(2):134–140. doi:10.7455/ijfs/4.2.2015.a2.
- Fruger R. 2002. Testing is Anything but Standard at the Urban Academy: At this small New York Ciurty high school, teaching to the individual student creates an innovative and effective way to learn. *Edutopia*; [consultado el 2 de feb. de 2021]. <https://www.edutopia.org/urban-academy-testing-anything-standard>.
- Gross Davis B. 2009. *Tools for teaching*. 2ª ed. United States: Jossey Bass Inc. ISBN: 978-0787965679.

- Hargreaves D. 1997. Student Learning and Assessment Are Inextricably Linked. *European Journal of Engineering Education*; [consultado el 3 de mar. de 2021]. 22(4):401–409. doi:10.1080/03043799708923471.
- Heale R, Twycross A. 2018. What is a case study? *Evid Based Nurs*. 21(1):7–8. eng. doi:10.1136/eb-2017-102845.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods, Inc. 2011. *Microorganisms in foods 8: Use of data for assessing process control and product acceptance*. New York [etc.]: Springer. 400 p. (Microorganisms in foods; vol. 8). ISBN: 9781441993731. eng. <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10476639>.
- Jay JM. 2005. Intrinsic and Extrinsic Parameters of Foods That Affect Microbial Growth. En: Heldman DR, Jay JM, editores. *Modern Food Microbiology*. Boston, MA: Springer-Verlag. p. 38–66 (Food Science Texts Series); [consultado el 20 de feb. de 2020]. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-7476-7_3.
- Kornacki JL, Doyle MP, editores. 2009. *Microbiological Troubleshooting in the Industrial Food Processing Environment*. New York: Springer. 140 p. (Food Microbiology and Food Safety Ser). ISBN: 978-1-4419-5517-3.
- Minniti LFS, Melo JSM, Oliveira RD, Salles JAA. 2017. The Use of Case Studies as a Teaching Method in Brazil. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*. 237:373–377. doi:10.1016/j.sbspro.2017.02.024.
- Willard K, Duffrin MW. 2003. Utilizing Project-Based Learning and Competition to Develop Student Skills and Interest in Producing Quality Food Items. *Journal of Food Science Education*; [consultado el 20 de mar. de 2021]. 2:1. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1541-4329.2003.tb00031.x>.
- Yiannas F. 2009. *Food Safety Culture: Creating a Behavior-Based Food Safety Management System*. New York, NY: Springer Science+Business Media, LLC. 1 online resource. ISBN: 978-0-387-72866-7.

Anexos

Anexo A

¿Qué factores se requieren para que los microorganismos crezcan, sobrevivan y mueran?

Este documento fue traducido de J.L. Konarcki (ed.), Capítulo 5: ¿Qué factores se requieren para que los microorganismos crezcan, sobrevivan y mueran? En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

Capítulo 5

¿Qué factores se requieren para que los microorganismos crezcan, sobrevivan y mueran?

Jeffrey L. Konarcki

Nuestras vidas están inextricablemente tejidas con las vidas de estas criaturas que ignoramos hasta que nos causan problemas.

- Lynn Margulis y Don Sagin, *Microcosmos*, 1986.

Resumen Este capítulo se centra en el impacto de los factores extrínsecos e intrínsecos que afectan el crecimiento de bacterias y hongos en los alimentos. Una bacteria con un tiempo de generación de 20 min puede crecer de 1 célula a más de un millón en 7 h. Los factores intrínsecos que impactan el crecimiento o la supervivencia microbiana son aquellas propiedades dentro del alimento mismo. Ejemplos de tales factores son la cantidad de agua disponible (no unida químicamente) (es decir, la actividad del agua), el potencial de oxidación / reducción (ORP) del alimento, su pH y el tipo de ácido presente. Los factores extrínsecos son los que se aplican a los alimentos como los procesos térmicos y la refrigeración. A veces, los factores extrínsecos, como el calentamiento, dan lugar a la creación de factores intrínsecos que tendrán un efecto profundo en el tipo de microbiota en el ingrediente, los alimentos y el entorno de la planta de procesamiento. Los factores extrínsecos e intrínsecos que afectan la supervivencia y el crecimiento microbiano en los alimentos o en los nichos de las fábricas son múltiples y pueden ser bastante dinámicos. Esto destaca la necesidad de realizar investigaciones para comprender mejor la relación de los microorganismos con sus entornos. Los procesadores de alimentos deben tener la precaución adecuada (por ejemplo, mediante estudios de reto microbiano, pruebas adecuadas, selección y seguimiento de los PCC (puntos críticos de control) al formular nuevos productos. Las suposiciones sobre el comportamiento microbiano en un producto pueden no necesariamente aplicarse a otro.

J.L. Konarcki (∞)
Konarcki Microbiology Solutions, Inc., McFarland, WI, USA
e-mail: JLKORN731@gmail.com

J.L. Konarcki (ed.), *Principios de resolución de Problemas Microbiológicos en la Industria Entorno de Procesamiento de Alimentos*, Microbiología Alimentaria y Seguridad Alimentaria, DOI 10.1007/978-1-4419-5518-0_5, ©Springer Science+ Business Media, LLC 2010

5.1 Introducción

Hay cinco grupos principales de microorganismos que son importantes en los alimentos; estos incluyen bacterias, hongos, Rickettsia, parásitos y virus. Sin embargo, el lector no sabrá que el libro se centra solo en bacterias y hongos (por ejemplo, levaduras y mohos). Esto se debe a que estos microorganismos tienen el mayor potencial de crecimiento en el entorno de procesamiento de alimentos, ya que por lo general no requieren un huésped para su crecimiento y los métodos para su detección son bastante conocidos y están disponibles para la industria alimentaria. Por lo tanto, este capítulo, como los demás, se centrará en el impacto de los factores extrínsecos e intrínsecos que impactan el crecimiento de bacterias y hongos en los alimentos.

Es importante señalar que las bacterias, aunque muy pequeñas (Fig. 5.1) en relación con el hombre (medidas en millonésimas de metro (micrones o " μ ")) son mucho más grandes que los virus, pero más pequeñas que las levaduras o los mohos.

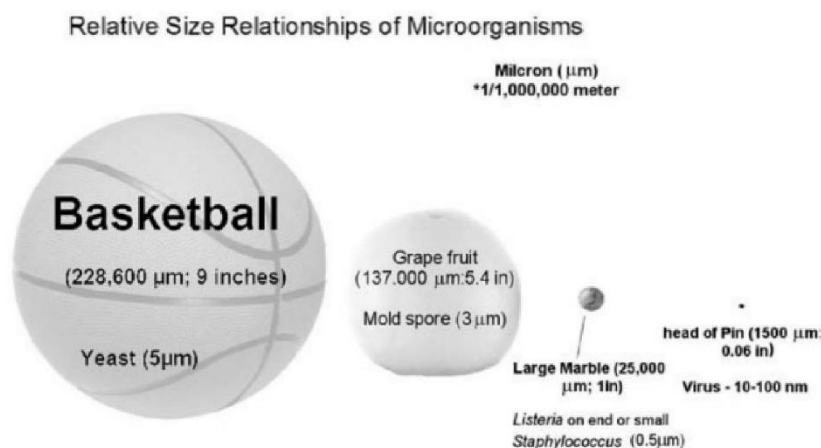


Fig. 5.1 Microbial size relationships

Las bacterias son capaces de crecer de una manera característica caracterizada por una fase de "lag" (latencia), donde no se multiplican sino que se adaptan a un nuevo ambiente seguido de una transición a una fase de "log" (logarítmica), donde crecen exponencialmente (Fig. 5.2). Una bacteria con un tiempo de generación de 20 min puede crecer de 1 célula a más de un millón en 7 h. Este factor ilustra la importancia de los esfuerzos rigurosos de control microbiológico en el entorno de la fábrica, especialmente porque estos entornos no son estériles. Posteriormente a la fase logarítmica, pasan a una fase estacionaria donde la población permanece constante durante un tiempo a un nivel máximo. Esto si sigue una fase de declive o muerte. Varios factores influyen en todas estas fases de crecimiento o muerte. Las poblaciones en varias fases de crecimiento han alterado la resistencia al estrés en comparación con aquellas en otras fases de crecimiento (Fig. 5.3).

Este documento fue traducido de J.L. Kornacki (ed.), Capítulo 5: ¿Qué factores se requieren para que los microorganismos crezcan, sobrevivan y mueran? En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

La industria puede emplear otros factores para alargar la fase de adaptación (lag), reducir la tasa de crecimiento o acelerar la destrucción de microorganismos. Este capítulo está dedicado a proporcionar una descripción general de estos factores.

Cuando se evalúa el potencial de riesgo microbiano de contaminación del producto terminado por los ingredientes, el medio ambiente y el potencial del producto terminado para apoyar el crecimiento o la supervivencia, es útil comprender los conceptos básicos que afectan el crecimiento y la supervivencia microbianos. Estos factores pueden descomponerse en factores intrínsecos y extrínsecos asociados con los alimentos o el medio ambiente.

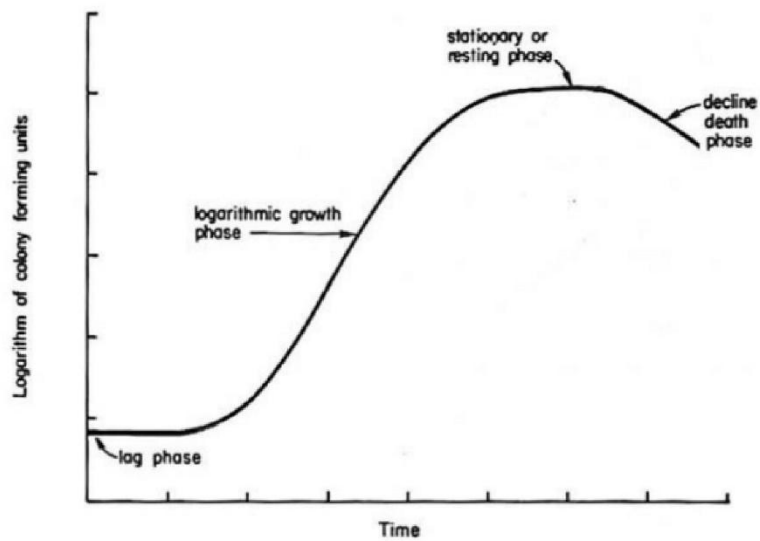


Figura 5.2 Crecimiento de la población microbiana generalizada (Banwart, 1979)

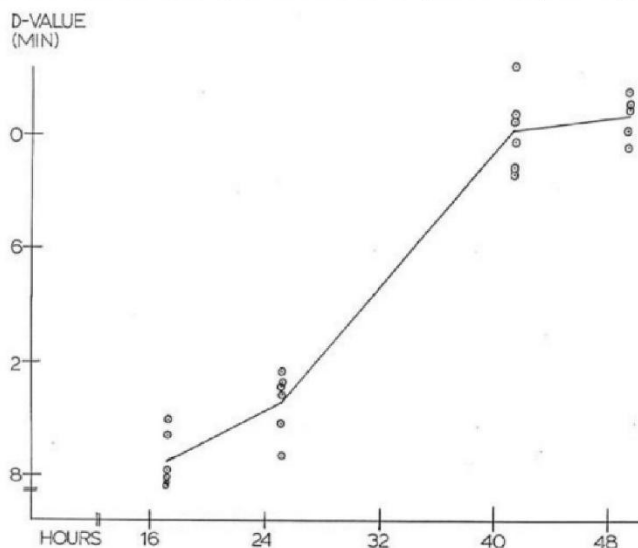


Figura 5.3. Influencia de la edad de cultivo de *Staphylococcus aureus* en su resistencia al calor (valor D) en leche descremada esterilizada en autoclave a 58° C (Adaptado de Kornacki, 1986).

Los factores intrínsecos que afectan el crecimiento o la supervivencia microbiana son aquellas propiedades dentro del alimento mismo. Ejemplos de dichos factores son la cantidad de agua biológicamente disponible (no unida químicamente) (es decir, actividad del agua), el potencial de oxidación / reducción (ORP) del alimento, su pH y el tipo de ácido presente.

Los factores extrínsecos son los que se aplican a los alimentos como los procesos térmicos y la refrigeración. A veces, factores extrínsecos como el calentamiento dan como resultado la creación de factores intrínsecos como un ORP reducido. La interacción dinámica entre factores intrínsecos y extrínsecos tendrá un efecto profundo en el tipo de microbiota en el ingrediente, los alimentos y el entorno de la fábrica.

5.2 Factores intrínsecos que afectan el crecimiento y la supervivencia de los microbios

5.2.1 Actividad de agua (a_w)

Las bacterias y los hongos tienen un requisito absoluto de humedad, por debajo del cual no pueden crecer. La humedad disponible para el microorganismo se conoce como actividad del agua y se abrevia " a_w ". Es mejor confiar en este parámetro al considerar la interacción de un microorganismo y la humedad dentro de un producto alimenticio que simplemente el porcentaje de contenido de

humedad de ese producto. Esto se debe a que algunos alimentos con alto contenido de humedad pueden tener una a_w relativamente baja. Ejemplos de estos incluyen jarabes, mermeladas, jaleas y rellenos para pasteles (ver Tabla 5.1). Gran parte de la humedad está unida químicamente por los carbohidratos del alimento en este ejemplo y, por lo tanto, no está disponible para el metabolismo celular. La Tabla 5.1 muestra los valores de a_w mínimos reportados para microorganismos seleccionados, así como algunos valores de a_w típicos para algunos alimentos. El crecimiento microbiano se retarda cuando la a_w disminuye, sin embargo, con respecto al procesamiento térmico, las bacterias son más resistentes al calor "seco" que al calor "húmedo". El o los solutos específicos utilizados para reducir la actividad del agua también juegan un papel en la protección térmica (Kornacki y Marath, 1986, 1989, 1992, 1993). Es un error común pensar que los microbios morirán en alimentos cuya actividad mínima de agua esté por debajo del mínimo informado o de su crecimiento. De hecho, puede ocurrir algo de muerte en estas condiciones, pero debe recordarse que la liofilización es un medio importante para preservar una población microbiana.

5.2.2 Acidez

El pH de un alimento también puede ejercer un efecto profundo sobre la capacidad de un microbio para sobrevivir o crecer. En términos generales, los valores de pH casi neutros (por ejemplo, 6.5-7.5) son óptimos para el crecimiento de microbios de interés contemporáneo transmitidos por los alimentos.

Las disminuciones del pH por adición de ácidos o fermentación tienen el impacto de retardar e incluso matar ciertos microorganismos. Los diferentes microorganismos tienen diferentes tolerancias al pH. El yogur, que es producido por la fermentación de la leche por bacterias del ácido láctico seleccionadas, produce un ambiente muy hostil para el crecimiento y supervivencia de muchos patógenos alimentarios (Fran y Marth, 1977). La Tabla 5.2 describe alimentos seleccionados y el pH límite informado para el crecimiento de microorganismos seleccionados.

En consecuencia, el pH de un alimento o un nicho en el entorno de una planta de procesamientos de alimentos y la humedad disponible y el potencial de oxidación-reducción tendrán un efecto profundo en el tipo de microorganismos que pueden sobrevivir y crecer en dichos entornos.

Tabla 5.1 Limitación de a_w de microbios seleccionados en comparación con a_w de alimentos típicos

Este documento fue traducido de J.L Kornacki (ed.), Capítulo 5: ¿Qué factores se requieren para que los microorganismos crezcan, sobrevivan y mueran? En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

a_w	Selected foods	Microbe
0.98–1.00	Fresh poultry or fish	
0.97		<i>Clostridium botulinum</i> type E
0.96	Some ripened cheeses	<i>Escherichia coli</i>
0.95–1.00	Fresh meats	
0.93–0.96		<i>Salmonella</i>
0.92–0.95		<i>Bacillus cereus</i>
0.90–0.98		<i>C. botulinum</i>
0.92		<i>Listeria</i>
0.90–0.94		<i>Lactobacillus</i>
0.9	Maple syrup	Most spoilage bacteria
0.88		Most spoilage yeasts
0.84–0.92		<i>Staphylococcus aureus</i>
0.83–0.87	Fermented sausages	
0.82–0.94	Jelly	
0.80–0.90		<i>Aspergillus flavus</i>
0.79–0.84	Fruit juice concentrates	
0.8		Most spoilage molds
0.75–0.91	Jams	
0.69	Chocolate candy	
0.65–0.75	Some cereals	
0.61		Xerophilic molds/osmophilic yeasts
0.60–0.75	Sugars, syrups	
0.54–0.75	Honey	
0.2	Dried whole milk	
0.10–0.20	Some cereals	

Adapted from Jay (2002), Banwart (1979), Ryser (1999)

5.2.2.1 Sustancias inhibidoras

A veces, las sustancias inhibidoras (p. ej., Conservantes a base ácidos orgánicos) se agregan directamente a un alimento para retardar el crecimiento microbiano. Ajustar el pH de un alimento a un nivel determinado con un conservador a base de ácido orgánico no proporcionará el mismo poder germicida que otro. Es importante reconocer que el germicida de la mayoría de los ácidos orgánicos es el ácido no disociado. Esto tiene sentido cuando uno se da cuenta de que las membranas celulares bacterianas están cargadas y, por lo tanto, el paso de iones cargados al interior de la célula no se produciría aparte del transporte activo. Sin embargo, la porción ácida no disociada debería pasar más fácilmente a través de la membrana celular, disolverse en el citoplasma de la bacteria, disociarse y causar daño dentro de la célula.

Tabla 5.2 Límites de pH de microorganismos seleccionados en comparación con algunos pH típicos de alimentos

pH	Selected food	Microbe
7	Crabs	
6.6–6.8	Very fresh fish (most species)	
6.5	Cream	
6.3–6.5	Milk	
6.1–6.4	Butter	
6.2–6.4	Chicken	
5.9–6.1	Ham	
	Vegetables	
5.7–6.1	Aspergillus	
5.4–6.0	Cabbage (green)	
5.3–5.8	Onion (red)	
5.3–5.6	Potatoes (tubers and sweet)	
4.8–5.2	Pumpkin	
4.8–5.0		<i>Clostridium botulinum</i>
4.8		<i>Vibrio parahemolyticus</i>
4.5	Eggplant	
4.4–4.7		<i>Staphylococcus aureus</i>
4.3–4.4		<i>Escherichia coli</i>
4.2–4.3	Tomatoes (whole)	
4.0–5.0		<i>Salmonella</i>
	Fruits	
3.6–4.3	Orange (juice)	
3.0–4.4		<i>Lactobacillus</i> spp. (most)
3	Grapefruit (juice)	
2.9–3.3	Apples	
2.8–4.6	Plumbs	
1.5–3.5		Yeasts/molds

Adapted from Jay (2000), Banwart (1979)

Este autor recuerda bien a un procesador que cambió el contenido de ácido de un producto, pero mantuvo el pH igual que el del producto original. Las botellas infladas debido a la producción excesiva de gas por lactobacilos heterofermentativos ilustraron dramáticamente el peligro de depender simplemente del pH independientemente del tipo de ácido utilizado.

5.2.3 Potencial de oxígeno y oxidación / reducción

Así como todos los alimentos tienen un pH y una actividad de agua mínimos, máximos y óptimos, también tienen requisitos en relación con el oxígeno y el potencial de oxidación / reducción (ORP) de su alimento o entorno.

ORP es la capacidad de una sustancia para donar o recibir electrones. El ORP de un alimento en particular depende de su ORP natural, la capacidad de equilibrio de un alimento (resistencia al cambio de ORP), la tensión de oxígeno en la atmósfera y el acceso de la atmósfera al alimento.

Algunos microorganismos, como *Pseudomonas spp.* y los organismos relacionados son aerobios obligados y, por lo tanto, tienen un requisito absoluto de oxígeno y un alto ORP en los alimentos o el medio ambiente para su crecimiento. En general, las bacterias aeróbicas requieren un ORP de +200 a +800 mV (Jay, 2000).

El oxígeno es tóxico para otros microorganismos, como *Clostridium botulinum*, considerado un anaerobio estricto y, por lo tanto, son intolerantes a los altos potenciales de oxidación-reducción (ORP) también conocidos como Eh. Las condiciones reducidas para el crecimiento de anaerobios tienen valores de Eh alrededor de -200mV. Los anaerobios obligados pueden carecer de ciertas enzimas (p. ej., catalasa) involucradas en la respiración aeróbica que desintoxican metabolitos que de otro modo serían tóxicos. La catalasa convierte el H_2O_2 tóxico producido durante el metabolismo oxidativo en O_2 y H_2O no tóxicos. Por lo tanto, la presencia de oxígeno dará como resultado que la célula bacteriana anaeróbica estricta se envenene con peróxido de hidrógeno.

Otros microorganismos a los que nos referimos como anaerobios facultativos, como *Salmonella*, crecerán mejor con oxígeno, pero también pueden crecer en condiciones anaeróbicas. Aún juntos, los microorganismos como los lactobacilos o los estreptococos son microaeróbicos y, por lo tanto, crecen en condiciones ligeramente reducidas con algo de oxígeno, pero limitado.

Microbial Relationships to Air

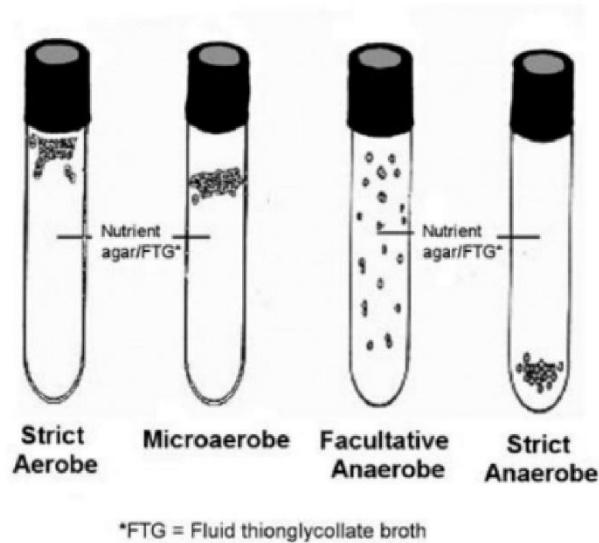


Fig 5.4. La relación del crecimiento microbiano con el oxígeno

En la figura 5.4 se muestra una ilustración de la relación entre el crecimiento microbiano y el ORP en un medio, donde se puede esperar que crezcan aerobios estrictos en la parte superior de un tubo de ensayo de medio fluido de tioglicolato (FTG) recién preparado. El medio FTG tiene una pequeña cantidad de agar y, cuando está fresco, tendrá oxígeno disuelto y un continuo Eh de bajo a alto, a medida que uno se mueve desde la parte inferior del tubo hacia la parte superior, donde el aire puede interactuar con la parte superior del medio. Por lo tanto, se puede esperar que crezcan anaerobios en la parte inferior, que crezcan anaerobios facultativos en todas partes y que crezcan microaerobios en una zona restringida intermedia entre la parte superior e inferior. También es importante señalar que, en general, la Eh de un medio de crecimiento se reduce cuando las bacterias se multiplican (Banwart, 1979).

5.2.4 Competencia

La competencia por los nutrientes y la producción de metabolitos tóxicos puede resultar en el retraso de un tipo microbiano por otro. Las bacterias a menudo producen una serie de sustancias que inhiben a otros microorganismos. Estos pueden incluir bacteriocinas, ácidos orgánicos, metabolitos tóxicos, antibióticos. También pueden causar cambios en los alimentos que a su vez inhiben otros tipos de bacterias. Por ejemplo, las bacterias lipolíticas descomponen la grasa en ácidos grasos libres que pueden inhibir otros microorganismos.

5.3 Factores extrínsecos que afectan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos

5.3.1 Temperatura

El crecimiento microbiano puede ocurrir entre -10 y 90° C. las temperaturas dentro de este rango afectan la fase de adaptación, la tasa de crecimiento, la densidad celular máxima, la nutrición y la fisiología de una población microbiana (Kornacki y Gabis, 1990). Los microorganismos tienen diferencias en las temperaturas óptimas, mínimas y máximas a las que pueden crecer. Los microorganismos de interés en los alimentos son psicrótrofos (capaces de crecer a 7° C o menos pero con un crecimiento óptimo entre 25 y 30° C) o mesófilos (tienen temperaturas de crecimiento óptimas moderadas entre 30 y 45° C) o termófilos con crecimiento óptimo a temperaturas entre 55 y 80° C. Dadas estas definiciones, es posible tener organismos mesófilos como *C. botulinum* no proteolítico, *Yersinia enterocolitica* y *Listeria monocytogenes*, que comúnmente se cree que son mesófilos pero también se consideran psicrótrofos (Kornacki y Gabis, 1990). También hay bacterias termodúricas que pueden soportar temperaturas elevadas pero tienen temperaturas de crecimiento óptimas mesofílicas, como los enterococos, que pueden crecer a 50° C.

5.3.2 Impacto de la temperatura en la muerte microbiana

Es bien sabido que el calentamiento destruirá los microorganismos. Sin embargo, los microorganismos tienen diversos grados de resistencia al calor que depende del microorganismo y de la matriz en la que se calienta. En general, la resistencia al calor es mayor en esporas

grampositivas \geq células vegetativas grampositivas \geq células gramnegativas.

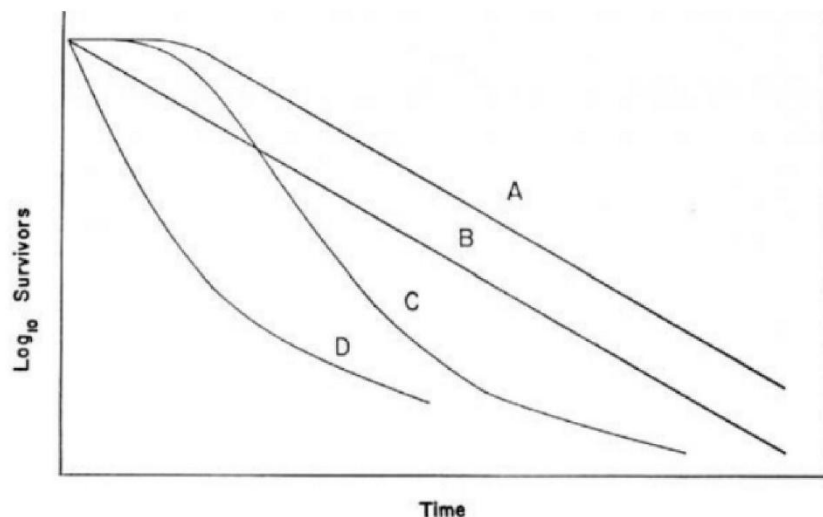


Fig 5.5 Ejemplos de supervivencia bacteriana a temperaturas letales (Adaptado de Konarcki, 1986)

En teoría, las bacterias mueren de forma log-lineal cuando se someten a temperaturas letales; sin embargo, en la práctica este no es siempre el caso (ver fig. 5.5).

El tiempo a una temperatura dada para reducir una población bacteriana 10 veces o 90% se llama valor D, y corresponde al recíproco negativo de la pendiente de la curva de superviviente. Dado que estos gráficos no siempre son reducciones log-lineales, esto crea algunas dificultades en el cálculo adecuado del valor D. El tiempo para destruir una población completa de bacterias se conoce como tiempo de muerte térmica (TDT). Al trazar el log₁₀ TDT frente a la temperatura, se puede ver cómo cambia la resistencia de una bacteria a varias temperaturas. El parámetro utilizado para determinar la resistencia al calor de una bacteria en tal rango de temperaturas se llama valor z y corresponde a la inversa negativa de la pendiente de esta gráfica. En teoría, la misma pendiente y, por lo tanto, el mismo valor z se obtendría cuando el log₁₀ del valor D también se grafica contra la temperatura. Esta gráfica se llama "curva TDT fantasma" y generalmente se genera en lugar de la curva TDT. Si se conoce la penetración del calor en la parte más fría del producto, la bacteria en cuestión, su valor z y un valor D a cualquier temperatura, entonces, en principio, se puede determinar la letalidad de un proceso térmico para destruir el microorganismo objetivo. Se puede ver que este proceso tiene algunas fallas debido a la porción microbiológica del "hombro" (por ejemplo, la curva "A") y la "cola" (por ejemplo, la curva "C") de las curvas de arriba. Frank y Chmielewski (2004) proporcionaron un enfoque alternativo basado en una determinación probabilística de la destrucción total de las biopelículas de *L. monocytogenes*. Este enfoque elimina la confusión asociada con el cálculo de la muerte térmica resultante de las curvas de supervivencia que tienen "hombros", "colas" resistentes o que son cóncavas o convexas.

Los procesos de enlatado se basan en un concepto 12D para destruir las poblaciones máximas de *C. botulinum*. El tiempo hasta la destrucción total de una población microbiana a una temperatura determinada se denomina valor F (en el caso F = 12D para *C. botulinum*). La industria generalmente utiliza muchas veces "F" para asegurar la destrucción de este microorganismo en productos enlatados (Lund, 1975).

5.3.3 Otros Factores Extrínsecos

Se han aplicado otros procesos a los alimentos para desactivar microorganismos, incluidos tratamientos de alta presión, campos eléctricos pulsados, luz pulsada, rayos X, luz ultravioleta y secado.

5.4 Interacciones entre factores intrínsecos y extrínsecos

Las propiedades intrínsecas de los alimentos también tendrán un efecto sobre la resistencia al calor de una bacteria. Los alimentos con poca actividad hídrica (por ejemplo, chocolate o leche en polvo) protegerán térmicamente a los microbios en mayor grado que los alimentos con mayor actividad hídrica. Por lo tanto, se podría confiar en un tratamiento de pasteurización de 71.7° C durante 15 min para destruir muchos ciclos logarítmicos de *Salmonella* en la leche líquida (con una a_w cercana a 100), pero sería ineficaz para destruir la *Salmonella* en el chocolate con leche ($D_{70^\circ\text{C}} = 12-17.5$ h; $D_{80^\circ\text{C}} = 1.6-2.4$ h; Mitscherlich y Marth, 1984), que tiene una a_w mucho más cercana a "0". Los solutos de menor peso molecular tendrán un mayor impacto sobre la a_w de un producto que las macromoléculas más grandes y, por lo tanto, desempeñan un papel clave en la resistencia microbiana al calor de un producto. Sería conveniente si se pudiera predecir con precisión la resistencia microbiana al calor basándose únicamente en a_w (siendo iguales todos los demás factores extrínsecos e intrínsecos); sin embargo, los solutos individuales dentro de una matriz alimentaria también pueden tener diferentes efectos sobre la resistencia al calor bacteriano al mismo tiempo. Por lo tanto, cada matriz de alimentos y entorno de procesamiento de alimentos proporciona un entorno microbiano único que prohíbe la extrapolación a otras matrices bastante diferentes, como en nuestro ejemplo de leche líquida y chocolate con leche, arriba..

Los propios microorganismos cambiarán las propiedades intrínsecas de los alimentos a través de aumentos (reacciones de proteólisis y desaminación) o disminuciones del pH (por ejemplo, por fermentación o deterioro), o Eh (por reacciones de oxidación o reducción). Esto, a su vez, creará entornos inhibidores para algunos microorganismos pero propicios para el crecimiento de otros. Un ejemplo muestra los cambios en el crecimiento y la supervivencia de *Escherichia coli* enteropatógena durante el proceso dinámico de elaboración del queso Colby (Fig. 5.6). Los cambios inducidos por microorganismos en un alimento pueden resultar en una sucesión de varias poblaciones microbianas dependiendo del estado del proceso o maduración y el tipo de microbiota presente.

Los tratamientos extrínsecos también pueden influir en las propiedades intrínsecas de un alimento, como cuando se calienta la leche. Las reacciones ocurren a diferentes temperaturas que pueden potenciar o retrasar el crecimiento microbiano. *L. monocytogenes* no creció cuando se

Este documento fue traducido de J.L. Kornacki (ed.), Capítulo 5: ¿Qué factores se requieren para que los microorganismos crezcan, sobrevivan y mueran? En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

inoculó en leche cruda y se incubó a 4° C, en un estudio (Ryser, 1999). Sin embargo, su población aumentó unas 10 veces en la leche pasteurizada durante 7 días de incubación a la misma temperatura.

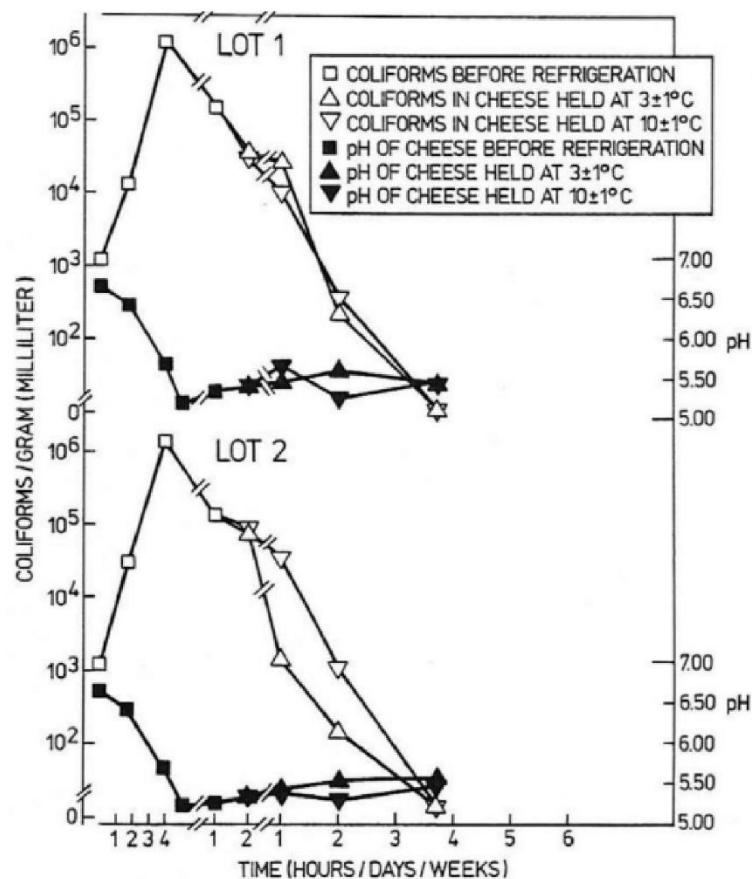


Fig. 5.6. Comportamiento de *E. coli* enterotoxigénica H10407 y cambios de pH durante la fabricación y almacenamiento de queso tipo Colby (Konarcki y Marth, 1982). Reimpreso con permiso del Journal of Food Protection. Los derechos de autor pertenecen a la Asociación Internacional para la Protección de Alimentos, Des Moines, IA, EE.UU .. J. L. Konarcki es presidente y director técnico senior de Konarcki Microbiology Solutions, Inc., Madison, WI. El difunto E.H. Marth era profesor emérito. Departamentos de Ciencia de los Alimentos y Bacteriología, 1204 Linden Dr., Madison, WI. 53704.

Este documento fue traducido de J.L Kornacki (ed.), Capítulo 5: ¿Qué factores se requieren para que los microorganismos crezcan, sobrevivan y mueran? En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

5.4.1 Concepto Obstáculos

La capacidad de los factores intrínsecos y extrínsecos para afectar la capacidad de los microorganismos para sobrevivir o crecer se ha utilizado para promover la inocuidad alimentaria y retrasar el deterioro. Un modelo de "obstáculos" no se basa en un único tratamiento para asegurar la calidad microbiológica, sino en una combinación de tratamientos (modificaciones intrínsecas y / o tratamientos extrínsecos). En este enfoque, ninguno de los parámetros (por ejemplo, aw, pH, temperatura, OPR) tomados de forma aislada son necesariamente adecuados para lograr el efecto deseado. Tanak y col. (1986) modelaron la capacidad de *C. botulinum* para formar toxinas en el queso procesado con una combinación de tales "obstáculos" que incluyen humedad, pH, sal y fosfatos (Fig. 5.7).

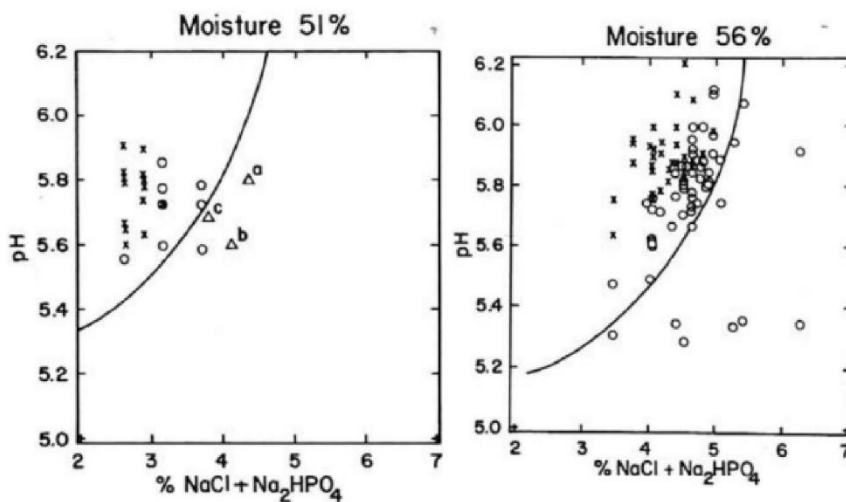


Fig.5.7 Queso procesado pasteurizado para untar inoculado con un cóctel de cinco cepas de *C. botulinum* tipos A y B de cada uno y mantenido 42 semanas a 30° C. Los círculos abiertos representan lotes de toxinas negativas. Las X representan lotes con al menos una muestra tóxica (Adaptado de Tanaka et al., 1986). Reimpreso con permiso del Journal of Food Protection. Los derechos de autor pertenecen a la Asociación Internacional de Porteccción de Alimentos, Des Moines, IA, EE. UU. El autor Tanaka fue profesor de la Universidad de Ciencias de los Alimentos de la Universidad de Niigata, Niigata, Edificio de Investigación del Campus de Niitsu 3f 303, Japón.

El autor estaba relacionado con una instalación de procesamiento de alimentos en la que se bombeaba una mezcla de productos sólidos y líquidos a través de varias líneas y se distribuía en un paquete durante un periodo de 18 h. Se expresó preocupación porque, dado el largo tiempo de

Este documento fue traducido de J.L. Kornacki (ed.), Capítulo 5: ¿Qué factores se requieren para que los microorganismos crezcan, sobrevivan y mueran? En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

operación, los nutrientes en el producto, los pH subletales y la temperatura subóptima, el crecimiento microbiano puede ocurrir en las líneas y el producto, resultando en un mayor riesgo microbiano. Sin embargo, en base a un extenso estudio de validación, el concepto de "obstáculos" demostró ser efectivo y la empresa se tranquilizó con respecto a la seguridad del proceso.

En resumen, los factores extrínsecos e intrínsecos que afectan la supervivencia y el crecimiento microbianos en los alimentos o en los nichos de los establecimientos donde se procesan los alimentos son múltiples y pueden ser bastante dinámicos. Esto destaca la necesidad de realizar investigaciones para comprender mejor la relación de los microorganismos con sus entornos. También significa que los procesadores de alimentos deben tener la precaución adecuada (por ejemplo, mediante estudios de reto microbiano, pruebas adecuadas, selección y seguimiento de los PCC válidos) al formular nuevos productos. Las suposiciones sobre el comportamiento microbiano en un producto pueden no necesariamente aplicarse a otro.

Referencia de este documento:

J.L. Kornacki (ed.), *Principios de resolución de Problemas Microbiológicos en la Industria Entorno de Procesamiento de Alimentos*, Microbiología Alimentaria y Seguridad Alimentaria, DOI 10.1007/978-1-4419-5518-0_5, ©Springer Science+ Business Media, LLC 2010

References

- Banwart GJ (1979) *Basic Food Microbiology*. AVI Publishing Company, Westport, CT
- Chmielewski R, Frank JF (2004) A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on stainless steel. *J Food Prot* 67(12):2712–2718
- Frank JF, Marth EH (1977) Inhibition of Enteropathogenic *Escherichia coli* by homofermentative lactic acid bacteria in skim milk. *J Food Prot* 40(11):754–759
- Jay J (2000) *Modern Food Microbiology*, 6th edn. Springer, New York
- Kornacki JL, Marth EH (1982) Fate of non-pathogenic and enteropathogenic *Escherichia coli* during the manufacture of Colby-like cheese. *J Food Prot* 45:310–316
- Kornacki JL (1986) Thermal inactivation of bacteria in ultrafiltered milk retentates. Dissertation, University of Wisconsin
- Kornacki JL, Gabis DA (1990) Microorganisms and refrigeration temperatures. *Dairy, Food Environ Sanit* 10(4):192–195
- Kornacki JL, Marth EH (1986) Heat-inactivation of *Streptococcus faecium* var. *casseliflavus* in skim milk cultures with *Pseudomonas fluorescens*. *J Food Prot* 49:541–543
- Kornacki JL, Marth EH (1989) Thermal inactivation of *Staphylococcus aureus* in retentates from ultrafiltered milk. *J Food Prot* 52:631–637
- Kornacki JL, Marth EH (1992) Thermal inactivation of *Enterococcus faecium* in retentates from ultrafiltered milk. *Milchwissenschaft* 47(12):764–769
- Kornacki JL, Marth EH (1993) Thermal inactivation of *Salmonella senftenberg* and *Micrococcus freudenreichii* in retentates from ultrafiltered milks. *Lebensm Wiss U-Technol* 26:21–27
- Lund D (1975) Heat processing. Chapter 3. In: Fennema O (ed) *Principles of Food Science Part II: Physical Principles of Food Preservation*. Marcel Dekker, New York
- Mitscherlich E, Marth EH (1984) *Microbial Survival in the Environment*. Springer-Verlag, New York, Table 26, p. 584
- Ryser ET (1999) Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in unfermented dairy products, Chapter 11. In: Ryser ET, Marth EH (eds) *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, FL citing Northolt MD, Beckers HJ, Vecht U, Toepel L, Soentoro PSS, Wisselink HJ (1988) *Listeria monocytogenes*: Heat resistance and behavior during storage of milk and whey and making of Dutch types of cheese. *Neth Milk Dairy J* 42:207–219
- Tanaka N, Traisman E, Plantong P, Finn L, Flom W, Meskey L, Guggisberg J (1986) Evaluation of factors involved in antibotulinal properties of pasteurized process cheese spreads. *J Food Prot* 49(7):526–531

Anexo A

Capítulo 3: Resolviendo Problemas de Deterioro Microbiano en Alimentos Procesados

Este trabajo fue traducido del texto de Konarckí Chapter 3 Solving Microbial Spoilage Problems in Processed Foods. 2010. Para su utilización en la clase de microbiología de los alimentos en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Dentro del departamento de Agroindustria Alimentaria.

Capítulo 3 Resolviendo Problemas de Deterioro Microbiano en Alimentos Procesados

Rocelle Clavero

Resumen Este capítulo analiza los procesos de deterioro de alimentos microbianos comunes. El capítulo está organizado por productos alimenticios e incluye secciones que abordan el deterioro en carne, aves, pescado; productos lácteos (leche, mantequilla, queso); productos de bebidas; productos de panadería; comidas enlatadas; frutas y productos de confitería; y emulsiones. Aborda el aislamiento y la identificación de organismos de descomposición y proporciona varios estudios de casos como ejemplos. Introduce varios organismos responsables del deterioro, incluidas las bacterias gram-positivas del ácido láctico. Bacterias aerobias gramnegativas, levaduras, mohos y contaminantes fúngicos. A lo largo del capítulo, se presta atención a cuándo, dónde y cómo los organismos de descomposición ingresan a la cadena de procesamiento de alimentos. Se sugieren técnicas de resolución de problemas. El efecto (o la falta de efecto) del calentamiento, la deshidratación, el cambio de pH, el enfriamiento y el sellado en varios organismos se explica a lo largo de todo. El capítulo contiene cuatro tablas que conectan organismos específicos con diversas manifestaciones de deterioro en una variedad de productos alimenticios.

3.1 Introducción

En la fabricación de alimentos procesados se han empleado varios métodos de conservación que involucran una o una combinación de tecnologías de proceso, tales como deshidratación, fermentación, salazón, desinfección química, tratamientos, enlatado, refrigeración, congelación e irradiación. Sin embargo, estos métodos generalmente no están diseñados para eliminar por completo todos los microorganismos. La mayoría de los procesos solo se aplican para destruir microorganismos patógenos y / o inhibir el crecimiento de organismos de descomposición comunes. La pérdida de control en cualquiera de estos procesos puede hacer que un producto sea susceptible al deterioro microbiano y la descomposición resultando en una pérdida de calidad.

R. Clavero (°°)
Sara Lee Corporation, Downers Grove, IL, USA
e-mail: rocelle.clavero@saralee.com

Este trabajo fue traducido del texto de Konarcki Chapter 3 Solving Microbial Spoilage Problems in Processed Foods. 2010. Para su utilización en la clase de microbiología de los alimentos en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Dentro del departamento de Agroindustria Alimentaria.

A pesar de los avances tecnológicos modernos, sigue produciéndose el deterioro de los productos alimenticios procesados. El deterioro de los alimentos es un proceso complejo y los alimentos se consideran en mal estado si los cambios organolépticos los hacen inaceptables para el consumidor. Se reconoce ampliamente que el deterioro de los alimentos a menudo se produce debido al crecimiento de microorganismos y la actividad de las enzimas que secretan. Otros procesos de deterioro no microbianos, por ejemplo, la oxidación de colores por la luz, están fuera del alcance de este capítulo. Los subproductos de la descomposición y los metabolitos liberados durante el crecimiento pueden resultar en la pérdida de los atributos organolépticos de un producto: cambio de apariencia (decoloración), desarrollo de malos olores, formación de limo (mucosidad) o cualquier otra característica que haga que el alimento no sea deseable para el consumo.

La resolución eficaz y eficiente de los problemas de deterioro en la industria de alimentos procesados requiere una secuencia lógica que comienza con la identificación del problema. Las manifestaciones de deterioro deben definirse con precisión y la investigación debe incluir la recopilación de información relevante. Por lo general, estos problemas no pueden resolverse simplemente realizando entrevistas y conferencias telefónicas fuera del sitio. Una investigación exhaustiva debe incluir observaciones de las prácticas en la planta y una revisión de los registros de producción, saneamiento y mantenimiento. Es a través del análisis de la información fáctica y la (s) secuencia (s) de eventos que conducen a la ocurrencia del deterioro que finalmente proporcionará una clara evidencia de causalidad. La microflora que se desarrolla durante el almacenamiento y que causa el deterioro se puede predecir en función del conocimiento del origen del alimento, la naturaleza del sustrato y el tipo de factor de conservación, como la temperatura, la atmósfera, la a_w y el pH utilizado en la fabricación del producto (consulte el Capítulo 5 para obtener información detallada sobre los factores que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbianos). Las temperaturas ambientales de almacenamiento (60-80 ° F) apoyarán el crecimiento de microorganismos mesófilos. El almacenamiento refrigerado, por otro lado, restringirá la proliferación de mesófilos pero permitirá que predominen los psicrótrofos. Sin embargo, las actividades metabólicas se inhiben sustancialmente en condiciones de congelación. De manera similar, las condiciones aeróbicas promoverán el crecimiento de microorganismos que requieren oxígeno para sus funciones metabólicas. Sin embargo, cantidades limitadas o ausencia total de oxígeno, como en el envasado al vacío y en el envasado en atmósfera modificada (MAP), ralentizarán o inhibirán el crecimiento de aerobios, pero pueden permitir el crecimiento de microorganismos anaeróbicos. Los productos secos con $a_w \leq 0.60$ no favorecerán el crecimiento microbiano. Sin embargo, la disponibilidad de agua en un producto determinará si predominarán mohos, levaduras o bacterias. Las bacterias son a menudo la causa del deterioro en productos con alto contenido de humedad, mientras que las levaduras tienden a causar pérdida de calidad en productos que contienen altos niveles de azúcar o carbohidratos. El crecimiento de la mayoría de los microorganismos es óptimo a valores de pH entre 5 y 7. Sin embargo, los acidófilos pueden tolerar un pH tan bajo como 1.0 y, por lo tanto, son una de las principales causas de deterioro en alimentos con alto contenido de ácido. El uso de factores y técnicas de conservación, por lo tanto, permitirá la selección de los tipos de microorganismos que pueden tolerar las condiciones ambientales en un producto alimenticio dado.

J.L. Kornacki (ed.) Principios de Resolución de Problemas Microbiológicos en la Industria Entorno de Procesamiento de Alimentos, Microbiología Alimentaria y Seguridad Alimentaria, DOI 10.1007/978-1-4419-5518-0.3, ©Springer Science + Business Media, LLC 2010

Este trabajo fue traducido del texto de Konarcki Chapter 3 Solving Microbial Spoilage Problems in Processed Foods. 2010. Para su utilización en la clase de microbiología de los alimentos en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Dentro del departamento de Agroindustria Alimentaria.

Algunos microorganismos exhiben productos de degradación únicos que pueden dirigir a un investigador hacia un organismo o tipo de microorganismos que producen el patrón de deterioro característico. Por ejemplo, un aroma de sabor amargo se produce generalmente como resultado del crecimiento de acidófilos como las bacterias del ácido láctico y la evidencia de gas en dicho producto puede dirigir la investigación más a los heterofermentadores. Una descripción precisa de las manifestaciones de deterioro de un producto intacto, por lo tanto, puede proporcionar información crucial que podría conducir a la identificación del agente causante del deterioro y la fuente de contaminación. Los principales culpables involucrados en la producción de gas microbiano y bacterias del ácido láctico heterofermentativas, coliformes, levaduras, *Clostridium* spp. y *Bacillus* spp. Sin embargo, la comprensión de los tipos de interacción esperada del organismo con el alimento será fundamental para reducir la lista de posibles sospechosos (consulte el Capítulo 5).

3.2 Deterioro de Carne, Aves y Pescado Procesados

En general, se reconoce que los bacilos aerobios gramnegativos, móviles e inmóviles y los cocobacilos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Psychrobacter* y *Acinetobacter* pueden provocar el deterioro de la carne cruda almacenada aeróbicamente en condiciones de refrigeración (Stanbridge y Davies, 1998). Las bajas temperaturas no restringirán el crecimiento de estos microorganismos psicrotróficos, pero la aplicación de un tratamiento térmico adecuado para destruir las células vegetativas de las bacterias patógenas suele ser suficiente para matar una amplia variedad de estas bacterias Gram negativas. Su aislamiento de un producto de carne o aves de corral procesado térmicamente en mal estado indicaría, por lo tanto, que la contaminación posterior al tratamiento térmico se produjo como resultado de prácticas higiénicas deficientes durante una o más de las etapas posteriores del procesamiento, como rebanar, cortar en porciones, desollar y envasar. El deterioro se caracteriza a menudo por la generación de productos que contienen azufre, como H₂S, dimetilsulfuro y metilmercaptano. La formación de babosidad, el enverdecimiento y la producción de un metabolito de descomposición característico, dimetilsulfuro, se pueden atribuir al crecimiento de *Pseudomonas* spp. La producción de H₂S, por otro lado, generalmente resulta del crecimiento de miembros de la familia de las *Enterobacteriaceae* Gram-negativas (García-López et al., 1998).

Las bacterias aerobias Gram-negativas no pueden competir con las bacterias del ácido láctico Gram-positivas (BAL) en productos cárnicos y avícolas envasados al vacío o en atmósfera modificada mantenidos en condiciones de almacenamiento refrigerado. Las cepas mesófilas y psicrotróficas de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (incluida *Weissella*) son las bacterias de deterioro más prominentes de tales productos (Stiles y Holzapfel, 1997). Los cambios organolépticos típicos incluyen el amargor y la formación de gas, limo (babosidad) y / o líquido blanco. La Tabla 3.1 enumera los principales agentes causantes del deterioro en los productos cárnicos y de aves de corral listos para el consumo (LPC).

Algunas bacterias del ácido láctico que pueden estar presentes en la carne cruda, p. ej., *Weissella viridescens* (también llamada, *Lactobacillus viridescens*), pueden sobrevivir al procesamiento térmico, mientras que otras pueden introducirse como resultado de la

recontaminación posterior al proceso durante el corte y envasado de equipos que ha sido limpiado y desinfectado inadecuadamente. Su capacidad para crecer bajo ciertas condiciones de pH, temperatura y a_w determinará qué cepas eventualmente predominarán para causar el deterioro del producto (Hamasaki et al., 2003). La viscosidad / gases y amargura observadas en dos lomos de cerdo descompuestos y envasados al vacío se debieron al crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus lactis*, respectivamente, mientras que *Leuconostoc citreum* provocó la aparición de líquido blanco en las salchichas de viena (Metaxopoulos et al., 2002). El crecimiento de BAL que producen peróxido de hidrógeno, por ejemplo, *W. viridescens*, provocó una decoloración verde en las salchichas y otros productos cárnicos curados, envasados al vacío y procesados térmicamente. Otras cepas que han causado enverdecimiento incluyen *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus fructivorans*, *L. mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* así como algunas cepas de *Pediococcus* (Anifantaki et al., 2002).

Cuadro 3.1 Agentes causantes de deterioro y manifestaciones del deterioro microbiano en productos cárnicos y de aves de corral listos para el consumo (LPC)

Dry, shelf-stable	Whiskers and spots	Molds
	Off-odor, green discoloration	<i>Alteromonas putrefaciens</i> <i>Enterobacter liquefaciens</i> <i>Shewanella putrefaciens</i>
Fermented, shelf-stable	Yeast growth	<i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Cryptococcus laurentii</i> <i>Debaryomyces vanriji</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
	Sliminess	LAB
	Greening	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Lactobacillus</i> (<i>Weissella</i>) <i>viridescens</i>
Cured, shelf-stable	Sliminess	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	Blackening/discoloration	H ₂ S producing LAB, clostridia
	Souring	LAB
Chilled, vacuum-packaged	Ropiness	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	Souring	Homo- and heterofermentative
	Loss of vacuum, gassing	LAB
	Sliminess	Heterofermentative LAB
		Enterococci, homofermentative LAB, <i>Leuconostoc</i> spp.
		<i>Weissella viridescens</i>
		<i>Carnobacterium divergens</i> <i>Carnobacterium piscicola</i> <i>Pseudomonas</i> spp.
	<i>Clostridium laramie</i> <i>Clostridium ctm</i> <i>Clostridium estertheticum</i>	
Canned, acidified	Souring/H ₂ swell	<i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium pasteurianum</i>
		<i>Bacillus coagulans</i>
	Medicinal/phenolic	

Las bacterias del ácido láctico utilizan carbohidratos fermentables para el crecimiento y, dependiendo de la cepa, producirán principalmente ácido láctico (denominados

Este trabajo fue traducido del texto de Komarcki Chapter 3 Solving Microbial Spoilage Problems in Processed Foods. 2010. Para su utilización en la clase de microbiología de los alimentos en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Dentro del departamento de Agroindustria Alimentaria.

homofermentadores) o liberarán CO₂ concomitante con la producción de ácido láctico (denominados heterofermentadores). Por lo tanto, la evidencia de hinchazón, abultamiento o envasado inflado de productos cárnicos y avícolas cocidos refrigerados sugiere el crecimiento de una bacteria del ácido láctico heterofermentativa productora de gas. El crecimiento de homofermentadores, por otro lado, puede alterar el sabor del producto debido a la producción de ácido láctico, que puede manifestarse por un sabor u olor amargo. El bajo pH resultante, sin embargo, puede tener un efecto beneficioso en la fabricación de productos cárnicos fermentados como pepperoni y salami.

Se ha encontrado que la reducción del pH por debajo de 5.5 es eficaz para inhibir la multiplicación de bacterias deterioradoras. Este bajo pH, sin embargo, favorece el crecimiento de levaduras tolerantes a los ácidos y también promueve el crecimiento de mohos (Dillon, 1998). Las levaduras y los mohos se consideran organismos oportunistas de deterioro en productos cárnicos y avícolas procesados. Tienden a prosperar cuando las condiciones de procesamiento, conservación y almacenamiento provocan la supresión de las principales bacterias dañinas. El deterioro debido al crecimiento de levaduras a menudo se manifiesta por liberación de CO₂ y pérdida en el vacío. *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Trichosporon* spp. son las levaduras más frecuentemente aisladas en productos cárnicos procesados (Wolter et al., 2000). Las levaduras deterioradoras podrían originarse a partir de la propia carne cruda y sobrevivir al proceso térmico aplicado, o se introducen en el producto como resultado de la contaminación posterior al proceso de las superficies del equipo y la mala higiene personal. Los sabores extraños y la formación de limo también pueden desarrollarse a partir de actividades proteolíticas y lipolíticas que resultan de la liberación de enzimas durante el crecimiento de ciertas levaduras y mohos.

Debido a su baja actividad de agua, el deterioro de los productos cárnicos secos y estables en almacenamiento, como la cecina, se produce como resultado del crecimiento de contaminantes fúngicos como *Cladosporium* spp. que producen manchas negras en la carne y *Sporotrichum carnis* que provoca manchas blancas. *Aspergillus* y *Penicillium* spp son los mohos más comunes aislados de embutidos fermentados y embutidos con baja a_w. Los mohos a menudo se consideran contaminantes ambientales en la industria de carne procesada y avícola. La investigación sobre la fuente de contaminación por moho, por lo tanto, probablemente se enfocaría en sistemas de ventilación y manejo de aire mal mantenidos, falsos techos, pisos y paredes que pueden haberse mojado, mala calidad del aire usado en los sistemas de empaque y / o empaque primario, materiales en sí.

La pérdida del control de la temperatura en la cadena de frío podría hacer que los productos cárnicos refrigerados envasados al vacío sean susceptibles al deterioro debido al crecimiento de *Clostridium* spp. La carne cruda puede contener niveles bajos de esporas de clostridios que pueden sobrevivir al proceso térmico. El abuso de temperatura en la cadena de frío podría permitir que las esporas de clostridios germinen y crezcan, y el deterioro se manifiesta por la liberación de H₂S y se pueden observar gases en el producto envasado (Holzapfel, 1998; Kalinowski y Tompkin, 1999).

La descomposición del pescado se debe principalmente a una proporción significativa de componentes solubles como azúcares, aminoácidos, óxido de trimetilamina, creatina, taurina, anserina, ácido úrico, betaína, carnosina e histamina e involucra a *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Photobacterium*, y *Vibrio*. El olor característico del pescado en mal estado

proviene de la producción de aminas volátiles, en particular trimetilamina y compuestos de azufre (Leuchener y Hammes, 1999). En el salmón ahumado en frío, la flora de descomposición predominante son las bacterias del ácido láctico y algunas bacterias Gram negativas. Los malos olores y sabores que se desarrollan se han descrito como agrios, ácidos, picantes y ocasionalmente fecales (Stohr et al., 2001).

3.3 Deterioro de Productos Lácteos

La leche es un excelente medio de crecimiento para las bacterias. Proporciona los nutrientes y la humedad y tiene un pH casi neutro. Por tanto, las poblaciones microbianas que sobreviven al proceso de pasteurización pueden provocar el deterioro de la leche y los productos lácteos. La Tabla 3.2 enumera los agentes causales y la manifestación de deterioro en varios productos lácteos.

Tabla 3.2 Agentes causantes de deterioro y manifestaciones de defectos microbianos en productos lácteos

Type of product	Microbial defects	Causative spoilage agents
Milk, pasteurized	Fruity/fermented	<i>Pseudomonas</i> spp.
	Bitter	
	Acid/sour; tart Malty ("grape nuts"); sour	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lc. lactis</i> var. <i>maltingenes</i>
Milk, canned	Putrid; rancid	<i>Clostridium sporogenes</i>
	Swelling, gas	<i>Clostridium</i> <i>thermosaccharolyticum</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i>
Yogurt	Blown packages; off-flavor Yeasty	<i>Hansenula</i> spp. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pichia membranaefaciens</i> <i>Candida guilliermondii</i> <i>Geotrichum candidum</i>
		<i>Candida</i> , <i>Torulopsis</i>
		<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Alteromonas</i>
		<i>Lc. lactis</i>
		<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
Cream	Foamy	<i>Leuconostoc</i> , <i>Lc. lactis</i>
	Butter	subsp. <i>Diacetylactis</i> <i>Penicillium</i> , <i>Mucor</i> , other molds
Cheese	Surface taint	<i>Yarrowia lipolytica</i>
	Malty ("grape nuts"); sour	<i>Torulopsis delbrueckii</i>
	Gassy, butyric acid Gassy, floating, split curd	<i>Candida parapsilosis</i> ; <i>C. sake</i> <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>P. guilliermondii</i> <i>P. membranaefaciens</i> <i>P. norvegensis</i> <i>Rhodotorula</i> spp. <i>Yarrowia lipolytica</i>
Soft cheese	Moldy	<i>Pseudomonas</i>
	Browning defects Gassy; flavor defects	<i>Flavobacterium</i> , yeasts, molds <i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Flavobacterium</i> , coliforms
Cottage cheese	Slimy curd, putrid	Yeasts
	Discoloration	
	Slimy gelatinous	
	Fruity	

Bacterias grampositivas, principalmente *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* spp. y bacterias Gram-negativas: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Flavobacterium* se pueden encontrar en la leche inmediatamente después del ordeño (Bardova et al., 2002). Sin embargo, la inactivación completa de las bacterias gramnegativas se puede lograr mediante la exposición a temperaturas de pasteurización (72 ° C; 15 min). El deterioro de la leche pasteurizada debido a la presencia de bacterias Gram-negativas viables, por lo tanto, solo ocurrirá si hay una brecha en las condiciones sanitarias de los procesos aguas abajo del intercambiador de calor. La mayoría de los problemas surgen en las líneas de llenado como resultado de un saneamiento deficiente y la falta de mantenimiento preventivo. No establecer un cronograma para el desmontaje e inspección de los intercambiadores de calor también puede conducir a la contaminación cruzada resultante de placas agrietadas o juntas dañadas. El aislamiento de bacterias Gram-negativas en leche pasteurizada es evidencia de contaminación posterior al proceso. El crecimiento de bacterias entéricas se manifiesta por malos olores, olor pútrido y leve rancidez.

Streptococcus, *Corynebacterium* y *Bacillus* spp. grampositivos termotolerantes, y los micrococcos y lactococos termodúricos pueden sobrevivir al proceso térmico, y la vida útil de la leche dependerá en gran medida de los niveles presentes en la leche cruda entrante. Los corineformees, micrococcos y lactococos suelen ser incapaces de crecer si la leche pasteurizada se mantiene por debajo de 6 °C. Ciertos *Bacillus* spp., sin embargo, poseen la capacidad de crecer en condiciones de refrigeración. Mientras que las células vegetativas de los bacilos se destruyen fácilmente mediante la pasteurización, las esporas son más resistentes al calor. Dadas las condiciones óptimas para el crecimiento de *Bacillus* spp. tienen un gran potencial de estropearse. Muchos bacilos pueden degradar la proteína de la leche y secretar la enzima fosfolipasa que puede causar la desestabilización de la emulsión grasa en la leche. El deterioro se manifiesta a menudo por la cuajada y agria de la leche, lo que indica el final de la vida útil de un producto.

Una proporción abrumadora de la flora psicrótrofa deteriorada en la leche produjo enzimas degradantes extracelulares termoestables que pueden sobrevivir a la pasteurización. La leche puede contener hasta 60 enzimas autóctonas que tienen el potencial de afectar la calidad del queso. Las cepas psicrótrofas pueden contribuir a la pérdida de calidad del producto al producir lipasas y proteasas resistentes al calor, aunque muchas de estas cepas pueden ser destruidas por la pasteurización de la leche. En consecuencia, la calidad microbiológica de la leche cruda afectará la calidad del producto terminado.

Los sabores ácidos, maltosos, afrutados, amargos, rancios, putrefactos e inmundos en los productos lácteos se han relacionado con la contaminación bacteriana. Varias sustancias químicas asociadas con sabores desagradables se producen como metabolitos durante la fase de crecimiento exponencial de la bacteria. Algunas notas de sabor desagradable características en la leche están asociadas con la contaminación de la leche con bacterias psicrótrofas específicas. La contaminación por *Pseudomonas fragi* a menudo causa notas desagradables a "frutas" en la leche. Las enzimas lipasa y esterasa de *P. fragi* hidrolizan los ácidos grasos de cadena corta en la grasa de la leche, convirtiendo los ácidos en ésteres etílicos por reacción con etanol (Rajmohan y Dodd, 2002). Se ha observado que algunas cepas de *Bacillus* producen notas afrutadas en la leche. Otro psicrótrofo común asociado con un defecto de sabor es *Lactococcus lactis* var. *maltigenes*. La producción de 3-metilbutanal provoca el aroma a malta de los cultivos de leche. Otros metabolitos comunes incluyen

acetato de etilo, sulfuro de dimetilo, etanol y otros alcoholes, metil cetonas, ácidos grasos C₄-C₁₀, ácido láctico, ácido pirúvico y péptidos amargos.

Los incidentes de producción temprana de gas en queso con cultivos iniciadores agregados pueden atribuirse a la actividad de cepas que utilizan citrato y / o heterofermentativas en cultivos de cepas mixtas (Muir y Banks, 2003). Los cultivos comerciales de cepas mixtas pueden contener niveles bajos de bacterias del ácido láctico no iniciadoras, productoras de gas heterofermentativo (NSLAB, Non Starter Lactic Acid Bacteria, por sus siglas en inglés), capaces de crecer a 6 ° C y con niveles altos de sal en humedad (S / M). Se han aislado bacterias heterofermentativas del ácido láctico a partir de leche cruda y muestras de tanques de leche pasteurizada descremada. Es probable que el NSLAB productor de gas en el queso sea el resultado de la leche descremada en tanque, cultivos de cepas mixtas y/o el entorno de la instalación de procesamiento previamente contaminado con microbiota de leche cruda. Un pequeño número de bacterias del ácido láctico no iniciadoras (NSLAB) productoras de gas pueden sobrevivir a la pasteurización. Por lo tanto, el deterioro debido a NSLAB que da como resultado defectos tempranos de gas en el queso podría estar directamente relacionado con la calidad de la leche cruda o con la calidad de la leche desnatada del camión cisterna en algunos casos. La producción de gas en el queso de composición química y pH normales también puede resultar de una serie de factores que interactúan, incluido el iniciador utilizado, los niveles de lactosa y citrato en la cuajada, las temperaturas de la cuajada / queso durante el prensado y curado, la sensibilidad a la sal del iniciador, el nivel de sal / humedad en el queso, los niveles de bacterias NSLAB productoras de gas en el queso y el nivel de lisis celular inducida por fagos en la cuajada en el prensado y durante la maduración temprana del queso. Los quesos refrigerados también pueden estropearse por contaminantes fúngicos como *Penicillium* que produce esporas de color verde azulado.

Los principales defectos de deterioro microbiano en la mantequilla son la “mancha superficial” y la rancidez hidrolítica, los cuales pueden ocurrir por contaminación con *Pseudomonas* spp. (Konarcki et al., 2001). Tal contaminación puede ocurrir por el crecimiento de *Pseudomonas* spp. en leche cruda o nata o por crecimiento superficial del microorganismo sobre mantequilla, lo que da como resultado la producción de lipasas y proteasas resistentes al calor. El crecimiento superficial de especies de mohos como *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Penicillium* y *Cladosporium* también pueden producir rancidez hidrolítica cuando crecen en superficies de mantequilla. Con menos frecuencia, la mantequilla (una emulsión de agua en aceite) puede desarrollar un sabor a malta, un aroma similar al de la piel y una decoloración negra debido a la *Lc. lactis* var. *maltigenes*, *P. mephitica* y *P. nigrificans*, respectivamente (Konarcki et al., 2001). La crema mal enfriada puede resultar en una sobreproducción de ácido por cultivos de *Lc. Lactis* resultando en un sabor demasiado ácido en la mantequilla. La degradación bacteriana también resulta de bacterias que entran en dicha crema al entrar en contacto con equipo lavado o desinfectado incorrectamente, y por contaminación externa, y empeora con un enfriamiento inadecuado. Se puede encontrar una revisión extensa de la microbiología asociada con la mejor fabricación en Konarcki et al. (2001) y una discusión más detallada del deterioro en las emulsiones alimentarias.

A menudo se agregan sorbatos para inhibir el crecimiento de organismos deterioradores. Sin embargo, se ha producido un deterioro del requesón debido al crecimiento de bacterias gramnegativas psicrotróficas como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Proteus*, *Aerobacter* o *Aeromonas*, lo

que da como resultado sabores indeseables y cuajada viscosa. El crecimiento de levaduras y mohos (p. ej., *Geotrichum*, *Penicillium*, *Mucor* y *Alternaria*) puede dañar el sabor, la textura y la vista.

Lactobacillus, *Pedococcus* y *Leuconostoc* spp. se han aislado en queso cheddar. Su actividad proteolítica puede contribuir al desarrollo de sabores deseables, pero también puede resultar en la acumulación de péptidos amargos. Las variedades heterofermentativas de NSLAB también han causado grietas y defectos de división debido a la formación de gas. Además, algunos NSLAB producen una racemasa capaz de convertir L (+) - lactato producido por cultivos iniciadores homofermentativos en el D (-) - lactato menos soluble, lo que resulta en el desarrollo de una neblina blanca debido a la cristalización de lactato de calcio (Chou et al., 2003), que puede confundirse con el crecimiento de moho. La fuente de NSLAB proviene principalmente de la contaminación posterior a la pasteurización a través del contacto con las superficies de los equipos utilizados para la manipulación y el procesamiento de alimentos o de biopelículas bacterianas recalcitrantes que se desarrollaron debido a prácticas inadecuadas de limpieza y saneamiento.

3.4 Deterioro de Bebidas

La alta actividad del agua de la mayoría de las bebidas listas para beber generalmente permite el crecimiento microbiano y se ha producido el deterioro de los productos de bebida (Tabla 3.3). Sin embargo, la adición de azúcares fermentables, ácidos y conservantes químicos, muchos de los cuales también son ácidos, previene el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, excepto aquellos que pueden tolerar condiciones ácidas. Las levaduras de descomposición como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica* y *Zygosaccharomyces bailii* son capaces de superar estos obstáculos (Battery et al., 2002). Se ha informado que *Z. bailii*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Zygosaccharomyces lentus* desarrollan resistencia a los conservantes comunes, el benzoato de sodio y los sorbatos (Steels et al., 1999). La naturaleza fermentativa de estas levaduras permite la producción de sabores y aromas afrutados, ácidos orgánicos y gases que hacen explotar los recipientes.

Las bacterias *Acinetobacter calcoaceticus* y *Gluconobacter oxydans* también han causado deterioro en las bebidas. *Gluconobacter* causa sabores desagradables, mientras que *Acinetobacter* no tiene un efecto perceptible sobre el olor, sabor o apariencia de las bebidas. Sin embargo, este último puede alterar el pH y los niveles de conservantes, lo que permite que otros microorganismos crezcan y estropeen el producto. Se ha informado de la contaminación de bebidas pasteurizadas durante el embotellado con bacterias del ácido láctico, en particular *Lactobacillus perolens*. El crecimiento de bacterias del ácido láctico puede provocar la liberación de un fuerte aroma y sabor a diacetilo.

Debido al bajo pH, los refrescos constituyen un entorno hostil y, por lo tanto, el deterioro es causado por un número limitado de levaduras, mohos y bacterias tolerantes a los ácidos. Los defectos de deterioro incluyen turbidez, partículas, manchas y gas excesivo. Las prácticas de saneamiento inadecuadas, particularmente en el llenado de equipos asociados a la máquina, incluido el llenado en sí, los tanques dosificadores y las bombas (especialmente aquellos con sellos desgastados o rotos), generalmente han contribuido a incidentes de deterioro. La contaminación también puede ocurrir a través de materias primas, botellas devueltas, vectores de aire e insectos (Stratfor et al., 2002). La condensación en el aire comprimido utilizado para soplar las botellas antes

del llenado ha sido una fuente de contaminación por levaduras en los contenedores finales (Kornacki, 2009, comunicación personal).

Tabla 3.3 Agentes causantes de deterioro y manifestaciones de defectos microbianos en bebidas procesadas

Type of product	Microbial defects	Causative spoilage agents
Alcoholic		
Wine	Haze	Acetic acid bacteria, yeasts
Beer	Rope Diacetyl; buttery flavor	<i>Pediococi</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp.
Non-alcoholic, carbonated		
Soda	Acid, off-flavors	<i>Acinetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> , fermentative yeasts, lactic acid bacteria
Fruit drinks Non-carbonated, pasteurized	Diacetyl, acetoin off-flavor	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Tea	Haze, cloudy, slimy sediment	<i>Pseudomonas</i> , coliforms
Water	Slimy particulate, haze, moldy	<i>Pseudomonas</i> , Enterobacteriaceae, molds, yeasts
Fruit juices	Haze, sediment, gassiness, Diacetyl	<i>Oenococcus oenos</i> , molds, <i>Zygosacchomyces</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Saccharomyces</i> spp. <i>Alicyclobacillus</i> spp., <i>L. perolens</i>
Dairy-based	Souring, gassiness	Thermophilic <i>Bacillus</i> spp., heterofermentative LAB
Canned, shelf-stable Fruit drinks	High acid	<i>Clostridium pasteurianum</i>

3.5 Deterioro de los Productos de Panadería

El problema de deterioro predominante en los productos horneados está influenciado por factores interrelacionados, específicamente la temperatura de almacenamiento, la humedad relativa, el nivel de conservantes, el pH, el material de empaque y el ambiente gaseoso que rodea al producto; y lo más importante, por el contenido de humedad y a_w del producto. Para productos horneados con poca humedad ($a_w \leq 0.6$), el deterioro microbiológico no es un problema. En los productos de humedad intermedia (a_w 0.65-0.85), las levaduras osmofílicas / osmotolerantes y los mohos xerófilos son los microorganismos de deterioro predominantes de interés. En productos con alto contenido de humedad (a_w 0.94-0.99), muchas bacterias, levaduras y mohos son capaces de crecer (consulte el Capítulo 5 para conocer las limitaciones de crecimiento de a_w de patógenos

seleccionados). Muchos rellenos pueden favorecer el crecimiento de bacterias patógenas, especialmente si contienen huevos o productos lácteos.

La levadura se encuentra principalmente en productos de panadería de humedad intermedia y alta; y el deterioro se manifiesta por el crecimiento visible de levaduras en la superficie de los productos (manchas blancas o rosadas) o deterioro fermentativo manifestado por olores alcohólicos, afrutados u otros olores y / o evidencia visible de producción de gas, como burbujas de gas en mermeladas y fondants (por ejemplo, en productos de pastelería) o expansión de envases flexibles. El crecimiento de levadura visible generalmente se asocia con productos de a_w alta y vida útil corta, mientras que el deterioro por fermentación se asocia generalmente con productos de a_w baja y vida útil prolongada. Las levaduras que causan el deterioro de la superficie del pan son principalmente *Pichia burtonii* ("Thalk mold") y, en menor medida, *Candida guilliermondii*, *Hansenula anomala* y *Beব্যomyces hansenii*. La levadura osmotolerante más común que causa el deterioro de recubrimientos y rellenos con alto contenido de azúcar, como mermelada, mazapán y carne picada, es *Z. rouxii*. La contaminación de los productos por levaduras osmofílicas resulta de utensilios y equipos sucios y de una limpieza inadecuada de los tanques de almacenamiento de jarabe.

Muchos mohos son capaces de crecer a valores de $a_w \leq 0.8$, pero algunos mohos xerófilos, aunque raros, han provocado deterioro en productos con a_w tan bajos como 0.65. Sin embargo, los mohos más importantes aislados de los productos de panadería son *Eurotium*, *Cladosporium* y las especies altamente xerotolerantes de *Aspergillus* y *Penicillium* (Tabla 3.4). Los productos recién horneados están libres de mohos vegetales viables y esporas de moho; los productos, sin embargo, se contaminan como resultado de la contaminación posterior a la cocción por esporas de moho del aire, superficies y equipos de panadería, manipuladores de alimentos e ingredientes crudos como glaseados, nueces, especias y azúcares. Los mohos son especialmente problemáticos en los meses de verano debido a la contaminación del aire y las condiciones de almacenamiento más cálidas y húmedas. Además, los productos se pueden envolver antes de que se enfríen por completo. Esto da como resultado la formación de condensación dentro del paquete y en la superficie del producto, condiciones que favorecen el crecimiento de moho. Las esporas de moho más comunes que se encuentran en la torta fueron *Wallemia sebi*, *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., Grupo *Eurotium glaucus* y otros *aspergilli*. *Penicillium* spp., Particularmente *P. notatum*, *P. expansum* y *P. viridicatum* fueron los mohos de descomposición predominantes en productos con un alto ERH $\geq 86\%$ (ERH Humedad relativa ambiental, por sus siglas en inglés). El grupo *E. glaucus* y *Eurotium amstelodami* predominan en valores por debajo de este nivel.

Tabla 3.4 Agentes causantes de deterioro y manifestaciones de defectos microbianos en productos de panadería listos para comer / calentar y servir

Type of product	Microbial defects	Causative spoilage agents
Bread	Moldy	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Eurotium</i>
Fruit-filled pastries	Gassing; souring	<i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Bacillus</i> spp.
Cheesecake	Splits; gassiness	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

El pan *ropey* (filante) es una condición de deterioro bacteriano del pan causada principalmente por *Bacillus subtilis* y ocasionalmente por *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. cereus* (Thompson et al., 1998). El deterioro se detecta inicialmente por un olor afrutado dulce que se asemeja a melones o piñas demasiado maduros. A esto le sigue una degradación enzimática que da como resultado una decoloración y la miga se vuelve blanda y pegajosa debido a la producción de polisacáridos extracelulares. La principal fuente de contaminación son las materias primas. Por lo tanto, los panaderos deben identificar aquellas formulaciones y procesos del pan con mayor probabilidad de producir deterioro asociado con "rope spoilage" y establecer especificaciones de materia prima que permitan solo el uso de ingredientes con niveles más bajos de contaminación aceptable.

3.6 Deterioro de Alimentos Enlatados

Los alimentos enlatados procesados térmicamente que tienen una acidez baja y se procesan adecuadamente aún pueden echarse a perder si se incuban a temperaturas superiores a 37 ° C. el organismo termófilo *Bacillus stearothermophilus* normalmente sobrevive al proceso térmico de enlatado y acidifica los alimentos enlatados si se incuban a temperaturas más altas. El procesamiento inadecuado de alimentos enlatados en condiciones anaeróbicas favorece el crecimiento de productores de gas como *Clostridium sporogenes*. Los alimentos procesados incorrectamente en condiciones aeróbicas favorecen el crecimiento de *Bacillus coagulans* que aumenta la acidez sin la producción de gas, lo que resulta en un defecto de deterioro "agrio" (Palop et al., 19197). Los alimentos con alto contenido de ácido procesados incorrectamente, como los tomates, pueden estropearse por el moho *Bysochlamys fulva*, que provoca el ablandamiento de la fruta. Una revisión más extensa del procesamiento térmico de alimentos enlatados, incluida una descripción de las condiciones de deterioro asociadas con los alimentos enlatados, se puede encontrar en David et al. (1996).

3.7 Deterioro de Frutas y Productos de Confitería

J.L. Kornacki (ed.) Principios de Resolución de Problemas Microbiológicos en la Industria Entorno de Procesamiento de Alimentos, Microbiología Alimentaria y Seguridad Alimentaria, DOI 10.1007/978-1-4419-5518-0.3, ©Springer Science + Business Media, LLC 2010

Las mermeladas, jaleas y conservas se caracterizan por una baja actividad de agua y un pH bajo. Dado que también se envasan a altas temperaturas, no es probable que alberguen organismos nocivos de enfermedades transmitidas por los alimentos. Sin embargo, el deterioro del moho puede desarrollarse si la tapa aplicada no se calienta a una temperatura adecuada para destruir las esporas del moho. Esta destrucción de organismos en la tapa generalmente se logra mediante la inversión del frasco o mediante el uso de una tapadora de tallos. Los enlatadores caseros a menudo vierten cera caliente en la superficie para excluir el aire de la superficie del producto.

Se han aislado hongos xerófilos tales como *Bettsia alvei*, *Chysosporium xerophilum*, *Neosartorya glabra* y *Chysosporium farincola* de varios productos de chocolate manufacturados en mal estado. El deterioro causado por *chysosporim* spp. puede confundirse con una "floración de grasa", pero el crecimiento de hongos blancos se puede observar con un microscopio electrónico (Kinderlerer, 1997).

3.8 Emulsiones

Las emulsiones son sistemas bifásicos estabilizados con tensioactivos compuestos por dos o más líquidos inmiscibles y, por tanto, son sistemas inherentemente inestables. El crecimiento de microorganismos puede resultar en un deterioro que está indicado por una rápida separación de las fases continua y dispersa. La descomposición física de las emulsiones es una consecuencia de (1) la alteración del pH, generalmente durante la producción de ácido, que puede afectar la solubilidad del surfactante; (2) la utilización microbiana de un componente de la emulsión esencial para la estabilidad (p. ej., surfactante o agente espesante), o (3) producción de factores de deterioro extracelulares. Los microorganismos producen una variedad de moléculas extracelulares que tienen la capacidad de desestabilizar las emulsiones. El deterioro puede resultar de la recontaminación directa del producto terminado o de la contaminación de los componentes acuosos antes de la emulsificación, ambos seguidos por el crecimiento del microorganismo.

Las principales causas del deterioro de las salsas y aderezos son las levaduras y los lactobacilos; el deterioro de hecho rara vez ocurre. El deterioro debido principalmente a las levaduras *Z. bailii*, *Pichia membranaefaciens*, *Z. rouxii*, *S. cerevisiae* y *Candida magnolia* se caracteriza por la formación de gas o el crecimiento de colonias superficiales de color marrón claro. La manifestación de deterioro debido a *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri* y *L. fructivorans* incluye la producción de gas y un cambio en el pH del producto.

3.9 Aislamiento e Identificación de Organismos de Descomposición

La recuperación e identificación del agente causante del deterioro, ya sea en los alimentos o en las superficies en contacto con los alimentos, forma parte integral del proceso de investigación. La base de los métodos utilizados para la prueba de microorganismos en los alimentos está bien establecida y generalmente se basa en la recolección de una muestra representativa del producto en mal estado (ver Capítulo 8) e incorporarla en un medio de crecimiento en el cual el microorganismo puede desarrollar colonias, lo que resulta en una indicación visual de crecimiento. La recuperación del

organismo de descomposición suele implicar el uso de medios de cultivo selectivos y no selectivos según el tipo de organismo. El Compendio de métodos para el examen microbiológico de alimentos proporciona métodos para una amplia variedad de microorganismos, incluidos los deterioradores, en una amplia variedad de alimentos (Downes e Ito, 2001).

Si los métodos de prueba convencionales no logran recuperar el organismo de un producto obviamente estropeado, es posible que deba desarrollarse un medio especializado basado en la naturaleza del producto. La producción de subproductos de la degradación metabólica y el análisis químico, como el pH, también podrían proporcionar pistas sobre la identidad de un grupo de organismos que exhiben propiedades similares. También se pueden usar compuestos específicos como marcadores de deterioro tales como sulfuro de dimetilo para pollos y huevos, diacetilo para jugo de naranja y trimetilamina para pescado y leche. Se ha utilizado la espectroscopia de masas y la cromatografía de gases para identificar estas sustancias.

Ha habido una investigación considerable sobre métodos microbiológicos rápidos y automatizados, pero la identificación de aislamientos continúa dependiendo de técnicas convencionales de cultivo puro en el aislamiento de organismos de descomposición (Betts, 2000). Tradicionalmente, una vez que se ha aislado un organismo de un producto alimenticio, se utilizan métodos de identificación que implican análisis bioquímicos o inmunológicos de organismos purificados. Los principales avances en biología molecular han hecho posible identificar organismos por referencia a su estructura de ADN. La comparación de las secuencias de genes utilizando la tecnología de secuenciación de ADN y PCR mostró que el gen del ARNr 16S está altamente conservado y, por lo tanto, puede usarse como el nuevo "estándar de oro". El uso de esta técnica permitirá la identificación del aislado a nivel de especie que no se puede lograr con otras técnicas. (Para un análisis del valor de la subtipificación molecular de los métodos para la industria alimentaria, consulte el Capítulo 10).

3.10 Estudios de Caso

Un fabricante de salchichas envasadas al vacío experimentó un problema de deterioro con el desarrollo de un limo pegajoso y tenaz. Algunos de los envases de los puntos de venta al por menor desarrollaron mucosidad durante el almacenamiento, pero todos los envases tenían recuentos de placas aeróbicas extremadamente altos. La revisión de los registros de saneamiento no reveló ningún evento inusual que pudiera resultar en la recontaminación del producto terminado. El problema parecía no estar relacionado con cambios en las medidas higiénicas, con la calidad microbiológica de los recortes de carne o especias, o con el proceso de calor aplicado. La revisión de los registros de producción, sin embargo, reveló que la formación de limo estaba asociada con las salchichas producidas para la temporada de Pascua. Estas salchichas contenían sacarosa, mientras que en otras épocas del año la formulación usaba dextrosa. La causa del deterioro se confirmó más tarde cuando las salchichas de Frankfurt viscosas y no viscosas se colocaron en placas en dos medios separados, uno que contenía sacarosa y el otro que contenía dextrosa. Cuando se sembraron salchichas de Frankfurt viscosas y no viscosas en un medio de laboratorio que contenía sacarosa como fuente de carbohidratos, todas las colonias que se desarrollaron en la placa eran

Este trabajo fue traducido del texto de Konarcki Chapter 3 Solving Microbial Spoilage Problems in Processed Foods. 2010. Para su utilización en la clase de microbiología de los alimentos en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Dentro del departamento de Agroindustria Alimentaria.

mucoides y viscosas. Cuando ambas salchichas se sembraron en placas sobre el medio que contenía dextrosa, las colonias que se desarrollaron estaban húmedas, pero no viscosas. El almacenamiento de un producto recién hecho que contiene sacarosa confirmó la causa probable del desarrollo del limo pegajoso y tenaz.

Otro caso involucró una hamburguesa de jamón enlatado percedero que desarrolló hinchazones suaves durante el almacenamiento refrigerado. Los recuentos de placas aeróbicas tanto en latas normales como en latas hinchadas se consideraron insignificantes, sin embargo, el recuento del medio APT (un medio especialmente adaptado para la recuperación de microorganismos exigentes como las bacterias del ácido láctico) fue extremadamente alto en latas hinchadas, pero no en las latas no hinchadas. Los hallazgos preliminares sugieren que la causa más probable de deterioro parecía ser un microorganismo que sobreviviera al proceso de calor a 64-65 ° C. Se determinó que el organismo de descomposición era *Lactobacillus viridescens* y la causa principal estaba relacionada con el uso de reprocesos que permitieron que el organismo creciera a grandes poblaciones en condiciones de almacenamiento refrigerado.

Un fabricante de una variedad de aderezos para ensaladas experimentó un problema de deterioro relacionado con la fermentación gaseosa. El defecto se observó unas semanas después de la fabricación de todas las variedades de aderezos para ensaladas. Los análisis del producto en mal estado revelaron la presencia de un gran número de levaduras y lactobacilos. No hubo evidencia de que algún ingrediente crudo contribuyera al alto recuento de LAB y levaduras ni hubo ningún cambio en la descomposición de la formulación en las prácticas de limpieza. Sin embargo, una revisión de los registros de producción reveló que todos los productos estropeados se fabricaron en la Línea 1. Estos hallazgos preliminares llevan a la conclusión de que alguna fuente de contaminación del producto está asociada con la Línea 1 y no con la Línea 2. Hisopados de superficie fueron recolectados del interior de las tuberías, válvulas, caras y cabezas de bombas de llenado, recolectados antes de la puesta en marcha y durante las operaciones no revelaron la fuente de contaminación. Sin embargo, el desmontaje de las bombas que conducen a los cabezales de llenado, reveló que la junta detrás de la cara de la bomba se había deteriorado y había una gran acumulación de varios tipos de aderezos para ensaladas en proceso de fermentación. Se obtuvieron recuentos altos de levadura y lactobacilos de los hisopos recolectados. Experimentos posteriores revelaron que la formulación es capaz de prevenir el crecimiento de pequeñas cantidades de microorganismos deterioradores de los ingredientes entrantes. Sin embargo, es de gran importancia el hecho de que los microorganismos deterioradores se adaptaron al ambiente ácido y los altos números presentes redujeron significativamente la vida útil de varios aderezos para ensaladas.

Referencia de este documento:

J.L. Konarcki (2010) Principios de Resolución de Problemas Microbiológicos en la Industria Entorno de Procesamiento de Alimentos, Microbiología Alimentaria y Seguridad Alimentaria, DOI 10.1007/978-1-4419-5518-0.3, ©Springer Science + Business Media, LLC 2010

Este trabajo fue traducido del texto de Konarcki Chapter 3 Solving Microbial Spoilage Problems in Processed Foods. 2010. Para su utilización en la clase de microbiología de los alimentos en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Dentro del departamento de Agroindustria Alimentaria.

References

- Anifantaki K, Metaxopoulos J, Kammenou M, Drosinos EH, Vlassi M (2002) The effect of smoking, packaging and storage temperature on the bacterial greening of frankfurters caused by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*. *Ital J Food Sci* 14(2):135–144
- Bathey AS, Duffy S, Schaffner D (2002) Modeling yeast spoilage in cold-filled ready-to-drink beverages with *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, and *Candida lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 68(4):1901–1906
- Betts RP (2000) Conventional and rapid analytical microbiology. In: Stringer M, Davis C (eds) *Chilled Foods: A Comprehensive Guide*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, FL
- Bordova O, Baranova M, Laukova A, Rozanska A, Rola J (2002) Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic organisms. *Bull Vet Inst Pulawy* 46:325–329
- Chou YE, Edwards CG, Luedecke LO, Bates MP, Clark S (2003) Nonstarter lactic acid bacteria and aging temperature affect calcium lactate crystallization in cheddar cheese. *J Dairy Sci* 86: 2516–2524
- David JRD, Graves RH, Carlson VR (1996) *Aseptic Processing and Packaging of Food: A Food Industry Perspective*. CRC Press, New York
- Downes FP, Ito K (eds) (2001) *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th edn. American Public Health Association, Washington, DC
- Dillon V (1998) Yeasts and moulds associated with meat and meat products. In: Davies A, Board R (eds) *The Microbiology of Meat and Poultry*, 1st edn. Blackie Academic and Professional, London
- García-López ML, Prieto M, Otero A (1998) The physiological attributes of Gram negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products. In: Davies A, Board R (eds) *The Microbiology of Meat and Poultry*, 1st edn. Blackie Academic and Professional, London
- Hamasaki Y, Ayaki M, Fuchu H, Sugiyama M, Morita H (2003) Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. *Appl Environ Microbiol* 69: 3668–3671
- Holzappel W (1998) The Gram-positive bacteria associated with meat and meat products. In: Davies A, Board R (eds) *The Microbiology of Meat and Poultry*, 1st edn. Blackie Academic and Professional, London
- Kalinowski RM, Tompkin B (1999) Psychrotrophic clostridia causing spoilage in cooked meat and poultry products. *J Food Prot* 62:766–772
- Kinderlerer JL (1997) *Chrysosporium* species, potential spoilage organisms of chocolate. *J Appl Microbiol* 83:771–778
- Kornacki JL, Bradley RL, Flowers RS (2001) Microbiology of butter and related products, Chapter 5. In: Marth EH, Steele JL (eds) *Applied Dairy Microbiology*, 2nd edn. Marcel Dekker, New York
- Leuchner R, Hammes WP (1999) Formation of biogenic amine in mayonnaise, herring and tuna fish salad by lactobacilli. *Intl J Food Sci Nutr* 50:159–164
- Metaxopoulos J, Mataragas M, Drosinos EH (2002) Microbial interaction in cooked cured meat products under vacuum or modified atmosphere at 4°C. *J Appl Microbiol* 93:363–373
- Muir DD, Banks JM (2003) Factors affecting the shelf-life of milk and milk products. In: Smit G (ed) *Dairy Processing: Improving Quality*, 1st edn. CRC Press, Boca Raton, FL

3. Resolviendo Problemas de Deterioro Microbiano en Alimentos Procesados

80

Este trabajo fue traducido del texto de Konarcki Chapter 3 Solving Microbial Spoilage Problems in Processed Foods. 2010. Para su utilización en la clase de microbiología de los alimentos en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Dentro del departamento de Agroindustria Alimentaria.

- Palop, A., Marco, A., Raso, J., Sala, F, and Condon, S. 1997. Survival of heated *Bacillus coagulans* spores in a medium acidified with lactic or citric acid. *Int J Food Microbiol*, 38:25–30.
- Rajmohan S, Dodd CER (2002) Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *J Appl Microbiol* 93:205–213
- Stanbridge LH, Davies AR (1998) The microbiology of chill-stored meat. In: Davies A, Board R (eds) *The Microbiology of Meat and Poultry*, 1st edn. Blackie Academic and Professional, London
- Steels H, James SA, Roberts IN, Stratford M (1999) *Zygosaccharomyces lentus*: A significant new osmophilic preservative resistant spoilage yeast, capable of growth at low temperature. *J Appl Microbiol* 87:520–527
- Stiles ME, Holzapfel WH (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* 36:1–29
- Stratford M, Bond CJ, James SA, Roberts IN, Steels H (2002) *Candida davenportii* sp. Nov., a potential soft drink spoilage yeast isolated from a wasp. *Int J Sys Evol Microbiol* 52:1369–1375
- Thompson, J.M., Waites, W.M. and Dodd, C.E.R. 1998. Detection of rope spoilage in bread caused by *Bacillus* species. *J Appl Microbiol* 85:481–486.
- Wolter H, Laing E, Viljoen B (2000) Isolation and identification of yeasts associated with intermediate moisture meats. *Food Technol Biotechnol* 38:69–75

Anexo C

Factores intrínsecos y extrínsecos de los alimentos que afectan el crecimiento microbiano

Este documento fue traducido de Jay (2005), Capítulo 3: Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano. En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

Capítulo 3

Factores intrínsecos y extrínsecos de los alimentos que afectan el crecimiento microbiano

Como nuestros alimentos son de origen vegetal y / o animal, vale la pena considerar aquellas características de los tejidos vegetales y animales que afectan el crecimiento de microorganismos. Las plantas y los animales que sirven como fuente de alimento han desarrollado todos mecanismos de defensa contra la invasión y proliferación de microorganismos, y algunos de estos permanecen vigentes en los alimentos frescos. Teniendo en cuenta estos fenómenos naturales, se puede hacer un uso eficaz de todos o de todos para prevenir o retardar el crecimiento de organismos patógenos y de descomposición en los productos que se derivan de ellos.

PARAMETROS INSTRÍNSECOS

Los parámetros de los tejidos vegetales y animales que son parte inherente de los tejidos se denominan parámetros intrínsecos. Estos parámetros son los siguientes:

1. pH
2. Contenido de humedad
3. Potencial de oxidación-reducción (eh)
4. Contenidos de Nutrientes
5. Constituyentes Antimicrobianos
6. Estructuras Biológicas

Cada uno de estos factores limitantes del sustrato se analiza a continuación, con énfasis en sus efectos sobre los microorganismos en los alimentos.

Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano 40

pH

Está bien establecido que la mayoría de los microorganismos crecen mejor a valores de pH alrededor de 7.0 (6.6-7.5), mientras que pocos crecen por debajo de 4.0 (Figura 3-1). Las bacterias tienden a ser más exigentes en sus relaciones al pH que los mohos y las levaduras,

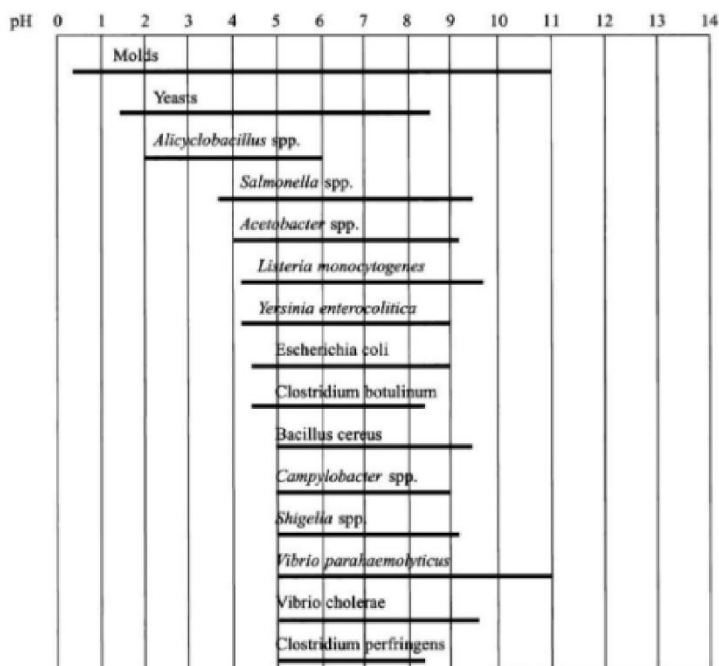


Figura 3-1 rangos de crecimiento de pH aproximados para algunos organismos transmitidos por los alimentos. Los rangos de pH para *L.monocytogenes* y *S. aureus* son similares.

siendo las bacterias patógenas las más exigentes. Con respecto a los pH mínimos y máximos de los microorganismos, los representados en la figura 3-1 no deben tomarse como límites precisos, ya que se sabe que los valores reales dependen de otros parámetros de crecimiento. Por ejemplo, se ha demostrado que el pH mínimo de ciertos lactobacilos depende del tipo de ácido utilizado, y los ácidos cítrico, clorhídrico, fosfórico y tartárico permiten el crecimiento a un valor de pH más bajo que los ácidos acético o láctico. En presencia de NaCl 0.2 M, se ha demostrado que *Alcaligenes faecalis* crece en un rango de pH más amplio que en ausencia de NaCl o en presencia de citrato de sodio 0.2 M (Figura 3-2). De los alimentos presentados en la Tabla 3-1, se puede ver que las frutas, los refrescos, el vinagre y los vinos caen por debajo del punto en el

Este documento fue traducido de Jay (2005), Capítulo 3: Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano. En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

que las bacterias crecen normalmente. La excelente calidad de conservación de estos productos se debe en gran parte al pH. Es una observación común que las frutas generalmente se deterioran por hongos y levaduras, y esto se debe a la capacidad de estos organismos para crecer a valores de $\text{pH} \leq 3.5$, que está considerablemente por debajo de los mínimos para la mayoría de las bacterias que deterioran los alimentos y todas las intoxicaciones alimentarias (ver Tabla 3-2).

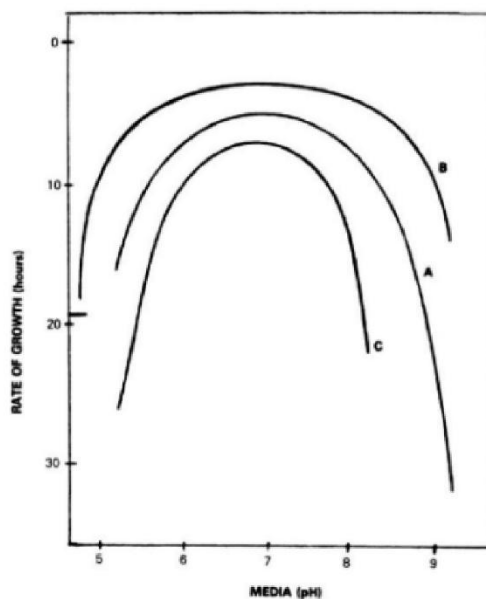


Figura 3-2 Relación de pH, NaCl y citrato de Na en la tasa de crecimiento de *Alcaligenes faecalis* en peptona al 1%: A = peptona al 1%; B = NaCl 0.2 M; C = 1% de peptona + citrato de Na 0.2 M. Fuente: Rediseñado de Sherman y Holm, usado con permiso del editor.

Puede observarse en la Tabla 3-3 que la mayoría de las carnes y mariscos tienen un pH final de aproximadamente 5.6 y más. Esto hace que estos productos sean susceptibles a las bacterias, así como al moho y la levadura. La mayoría de las verduras tienen valores de pH más bajos que las frutas y, en consecuencia, las verduras deben estar más expuestas a la descomposición por bacterias que por hongos.

Con respecto a la calidad de conservación de las carnes, está bien establecido que la carne de los animales fatigados se echa a perder más rápidamente que la de los animales descansados y que esto es una consecuencia directa del pH final alcanzado al completar el rigor mortis. Tras

Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano 42

la muerte de un animal de carne que ha descansado bien, el 1% de glucógeno habitual se convierte en ácido láctico, lo que provoca directamente una depresión en los valores de pH de aproximadamente 7.4 a aproximadamente 5.6, dependiendo del tipo de animal que Callow encontró los valores de pH más bajos para la carne de vacuno debe ser 5.1 y la más alta 6.2 después del rigor mortis. El valor de pH habitual que se alcanza tras completar el rigor mortis de la carne de vacuno es de alrededor de 5.6. Callow encontró que los valores más bajos y más altos para el cordero y el cerdo eran 5.4 y 6.7, y 5.3 y 6.9, respectivamente. Briskey informó que el pH final de la carne de cerdo puede ser tan bajo

Este documento fue traducido de Jay (2005), Capítulo 3: Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano. En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

Tabla 3-1 valores de pH aproximados de algunas frutas y verduras frescas

<i>Product</i>	<i>pH</i>	<i>Product</i>	<i>pH</i>
Vegetables		Fruits	
Asparagus (buds and stalks)	5.7–6.1	Apples	2.9–3.3
Beans (string and Lima)	4.6–6.5	Apple cider	3.6–3.8
Beets (sugar)	4.2–4.4	Apple juice	3.3–4.1
Broccoli	6.5	Bananas	4.5–4.7
Brussels sprouts	6.3	Figs	4.6
Cabbage (green)	5.4–6.0	Grapefruit (juice)	3.0
Carrots	4.9–5.2; 6.0	Grapes	3.4–4.5
Cauliflower	5.6	Limes	1.8–2.0
Celery	5.7–6.0	Melons (honeydew)	6.3–6.7
Corn (sweet)	7.3	Oranges (juice)	3.6–4.3
Cucumbers	3.8	Plums	2.8–4.6
Eggplant	4.5	Watermelons	5.2–5.6
Lettuce	6.0		
Olives	3.6–3.8		
Onions (red)	5.3–5.8		
Parsley	5.7–6.0		
Parsnip	5.3		
Potatoes (tubers and sweet)	5.3–5.6		
Pumpkin	4.8–5.2		
Rhubarb	3.1–3.4		
Rutabaga	6.3		
Spinach	5.5–6.0		
Squash	5.0–5.4		
Tomatoes (whole)	4.2–4.3		
Turnips	5.2–5.5		

Como aproximadamente 5.0 bajo ciertas condiciones. El efecto del pH de esta magnitud sobre los microorganismos, especialmente las bacterias, es obvio. Con respecto al pescado, se sabe que el fletán, que normalmente alcanza un pH final de aproximadamente 5,6, tiene mejores

cualidades de conservación que la mayoría de los demás peces, cuyos valores de pH final oscilan entre 6.2 y 6.6.

Algunos alimentos se caracterizan por una acidez inherente; otros deben su acidez de pH a la acción de ciertos microorganismos. Este último tipo se conoce como acidez biológica y se muestra en productos como leches fermentadas, chucrut y encurtidos. Independientemente de la fuente de acidez, el efecto sobre el mantenimiento de la calidad parece ser el mismo.

Algunos alimentos son más capaces de resistir los cambios de pH que otros. Se dice que los que tienden a resistir los cambios de pH están tamponados. En general, las carnes están más amortiguadas que las verduras. Contribuyen a la capacidad amortiguadora de las carnes sus diversas proteínas. Las verduras son generalmente bajas en proteínas y, en consecuencia, carecen de la capacidad amortiguadora para resistir cambios en su pH durante el crecimiento de microorganismos (ver Tablas 6-4 y 6-5 para la composición química general de las verduras).

Se evaluó la capacidad de *E. coli* para crecer en tres mostazas al por menor, y con un inóculo de 10^6 ufc/ g de este patógeno, se inhibió su crecimiento en los tres productos. El microorganismo no se detectó en la mostaza estilo Dijon (pH 3.55-3.6) más allá de las 3 horas a temperatura ambiente y después de 2 días a 5° C. En las mostazas amarillas y tipo delicatesen (pH 3.30 y 3.38, respectivamente), el organismo no se detectó más allá de 1 h.

Tabla 3-2 Valores mínimos de pH reportados para el crecimiento de algunas bacterias transmitidas por los alimentos

<i>Aeromonas hydrophila</i>	ca. 6.0
<i>Asaia siamensis</i>	3.0
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	2.0
<i>Bacillus cereus</i>	4.9
<i>Botrytis cinerea</i>	2.0
<i>Clostridium botulinum</i> , Group I	4.6
<i>C. botulinum</i> , Group II	5.0
<i>C. perfringens</i>	5.0
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	4.5
<i>Gluconobacter</i> spp.	3.6
<i>Lactobacillus brevis</i>	3.16
<i>L. plantarum</i>	3.34
<i>L. sakei</i>	3.0
<i>Lactococcus lactis</i>	4.3
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.1
<i>Penicillium roqueforti</i>	3.0
<i>Propionibacterium cyclohexanicum</i>	3.2
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	4.5
<i>Pseudomonas fragi</i>	ca. 5.0
<i>Salmonella</i> spp.	4.05
<i>Shewanella putrefaciens</i>	ca. 5.4
<i>Shigella flexneri</i>	5.5-4.75
<i>S. sonnei</i>	5.0-4.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4.8
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4.18
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	1.8

Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano 44

La acidez natural o inherente de los alimentos, especialmente las frutas, puede haber evolucionado como una forma de proteger los tejidos de la destrucción por microorganismos. Es interesante que las frutas tengan valores de pH inferiores a los requeridos por muchos organismos de descomposición. La función biológica del fruto es la protección del cuerpo reproductor de la planta, la semilla. Este único hecho sin duda ha sido muy importante en la evolución de las frutas actuales. Aunque el pH de un animal vivo favorece el crecimiento de la mayoría de los organismos de descomposición, entran en juego otros parámetros intrínsecos para permitir la supervivencia y el crecimiento del organismo animal.

Aunque los valores de pH ácido son de mayor utilidad para inhibir microorganismos, se sabe que los valores alcalinos en el intervalo de pH 12-13 son destructivos, al menos para algunas bacterias. Por ejemplo, se ha demostrado que el uso de CaOH_2 para producir valores de pH en este rango es destructivo para *Listeria monocytogenes* y otros patógenos transmitidos por los alimentos en algunos alimentos frescos.

Efectos del pH

El pH adverso afecta al menos a dos aspectos de una célula microbiana que respira: el funcionamiento de sus enzimas y el transporte de nutrientes al interior de la célula. La membrana citoplasmática de los microorganismos es relativamente impermeable a los iones H^+ y OH^- . Su concentración en el citoplasma probablemente permanece razonablemente

Este documento fue traducido de Jay (2005), Capítulo 3: Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano. En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

Tabla 3-3 Valores aproximados de pH de productos lácteos, cárnicos, avícolas y pesqueros.

Product	pH	Product	pH
Dairy products		Fish and shellfish	
Butter	6.1–6.4	Fish (most species)*	6.6–6.8
Buttermilk	4.5	Clams	6.5
Milk	6.3–6.5	Crabs	7.0
Cream	6.5	Oysters	4.8–6.3
Cheese (American mild and cheddar)	4.9; 5.9	Tuna fish	5.2–6.1
		Shrimp	6.8–7.0
Meat and poultry		Salmon	6.1–6.3
Beef (ground)	5.1–6.2	White fish	5.5
Ham	5.9–6.1		
Veal	6.0		
Chicken	6.2–6.4		
Liver	6.0–6.4		

*Just after death.

constante a pesar de las amplias variaciones que pueden ocurrir en el pH del medio circundante. Conway y Downey encontraron que el pH intracelular de las células de levadura de panadería en reposo era de 5.8. aunque se descubrió que la región exterior de las células durante la fermentación de la glucosa era más ácida, la célula interior permaneció más alcalina. Por otro lado, Peña *et al.* no apoyó la noción de que el pH de las células de levadura permanece constante con variaciones en el pH del medio. Parece que el pH interno de casi todas las células es casi neutral. Sin embargo, las bacterias como *Sulfolobus* y *Methanococcus* pueden ser excepciones. Cuando los microorganismos se colocan en ambientes por debajo o por encima de la neutralidad, su capacidad para proliferar depende de su capacidad para llevar el pH ambiental a un valor o rango más óptimo. Cuando se colocan en ambientes ácidos, las células deben evitar la entrada de H^+ o expulsar iones H^+ tan rápido como entran. Compuestos celulares clave como el ADN y el ATP requieren neutralidad. Cuando la mayoría de los microorganismos crecen en medios ácidos, su actividad metabólica da como resultado que el medio o sustrato se vuelva menos ácido, mientras que los que crecen en entornos de pH alto tienden a reducir el pH. Las descarboxilasas de aminoácidos que tienen una actividad óptima a aproximadamente pH 4.0 y casi ninguna actividad a pH 5.5 provocan un ajuste espontáneo del pH hacia la neutralidad cuando las células crecen en el intervalo ácido. Bacterias como *Clostridium acetobutylicum* elevan el pH del sustrato al reducir el ácido butírico a butanol, mientras que *Enterobacter aerogenes* produce acetoina a partir del ácido pirúvico para elevar el pH de su entorno de crecimiento. Cuando los aminoácidos se descarboxilan, el aumento del pH se produce a partir de las aminas resultantes. Cuando se cultiva en el rango alcalino, un grupo de aminoácidos desaminasas que tienen una actividad óptima a aproximadamente pH 8.0 y provocan el ajuste espontáneo del pH hacia la neutralidad como resultado de los ácidos orgánicos que se acumulan.

Con respecto al transporte de nutrientes, la célula bacteriana tiende a tener una carga negativa residual. Por lo tanto, los compuestos no ionizados pueden ingresar a las células, mientras que los compuestos ionizados no pueden. A pH neutro o alcalino, los ácidos orgánicos no entran, mientras que a valores de pH ácido, estos compuestos no ionizados pueden entrar en las células cargadas negativamente. Además, el carácter iónico del grupo ionizable de la cadena lateral se ve afectado en ambos lados de la neutralidad, lo que aumenta la desnaturalización de la membrana y las enzimas de transporte.

Entre los otros efectos que ejercen sobre los microorganismos el pH adverso se encuentra el de la interacción entre el H^+ y las enzimas de la membrana citoplasmática. La morfología de algunos microorganismos puede verse afectada por el pH. Se ha informado que la longitud de las hifas de *Penicillium chrysogenum* disminuye cuando se cultiva en cultivo continuo donde los valores de pH aumentaron por encima de 6.0. Se formaron gránulos de micelio en lugar de hifas libres a aproximadamente pH 6.7. El H^+ y el K^+ extracelulares pueden competir cuando el último estimula la fermentación, por ejemplo, mientras que el primero la reprime. El metabolismo de la glucosa por las células de levadura en un medio ácido fue estimulado notablemente por K^+ . La glucosa se consumió un 83% más rápidamente en presencia de K^+ en condiciones anaeróbicas y un 69% más en condiciones aeróbicas.

Otros factores ambientales interactúan con el pH. Con respecto a la temperatura, el pH del sustrato se vuelve más ácido a medida que aumenta la temperatura. La concentración de sal tiene un efecto definido sobre las curvas de la tasa de crecimiento del pH, como se ilustra en la

Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano 46

Figura 3-2, donde se puede observar que la adición de NaCl 0.2 M amplió el rango de crecimiento del pH de *Alcaligenes faecalis*. Estos investigadores observaron un resultado similar para *Escherichia coli*. Cuando el contenido de sal excede este nivel óptimo, el rango de crecimiento del pH se reduce. Un pH adverso hace que las células sean mucho más sensibles a los agentes tóxicos de una amplia variedad y las células jóvenes son más susceptibles a los cambios de pH que las células más viejas o en reposo.

Cuando los microorganismos crecen a ambos lados de su rango de pH óptimo, se produce una fase de adaptación aumentada. Se esperaría que la fase de adaptación incrementada sea de mayor duración si el sustrato es muy amortiguado en contraste con uno que tiene poca capacidad amortiguadora. En otras palabras, se puede esperar que la duración de la fase de adaptación refleje el tiempo necesario para que los organismos lleven el ambiente externo dentro de su rango de crecimiento de pH óptimo. El análisis de las sustancias que son responsables del pH adverso es valioso para determinar no solo la velocidad de crecimiento posterior, sino también el pH mínimo al que las salmonelas iniciarían el crecimiento. Chung y Goeppfert encontraron que el pH mínimo era de 4.05 cuando se usaban ácidos clorhídrico y cítrico, pero de 5.4 y 5.5 cuando se usaban ácidos acético y propiónico, respectivamente. Esto es, sin duda, un reflejo de la capacidad de los organismos para alterar su entorno externo a un rango más favorable en el caso de los ácidos clorhídrico y cítrico en comparación con los otros ácidos probados. También es posible que factores distintos del pH entren en juego en los efectos variables de los ácidos orgánicos como inhibidores del crecimiento. Para obtener más información sobre el pH y la acidez, consulte Corlett y Brown.

Contenido de Humedad

Uno de los métodos más antiguos de conservación de alimentos es el secado o desecación; se desconoce precisamente cómo se llegó a utilizar este método. La conservación de los alimentos por secado es una consecuencia directa de la eliminación o retención de humedad, sin la cual los microorganismos no crecen. Actualmente se acepta generalmente que las necesidades de agua de los microorganismos deberían describirse en términos de la actividad del agua (a_w) en el medio ambiente. Este parámetro se define por la relación entre la presión de vapor de agua del sustrato alimenticio y la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura: $a_w = P / P_o$, donde p es la presión de vapor de la solución y P_o es la presión de vapor de la solvente (generalmente agua). Este concepto se relaciona con la humedad relativa (RH) de la siguiente manera: $RH = 100 \times a_w$. El agua pura tiene una a_w de 0.75 (Tabla 3-4)

La actividad del agua (a_w) de la mayoría de los alimentos frescos es superior a 0.99. los valores mínimos notificados para el crecimiento de algunos microorganismos en los alimentos se presentan en el cuadro 3.5 (véase también el capítulo 18). En general, las bacterias requieren valores más altos de a_w para el crecimiento que los hongos, y las bacterias Gram negativas tienen requisitos más altos que las Gram positivas. La mayoría de las bacterias de descomposición no crecen por debajo de $a_w = 0.91$, mientras que los mohos de descomposición pueden crecer hasta 0.80. con respecto a las bacterias que intoxican los alimentos *Staphylococcus aureus* puede crecer tan bajo como 0.86, mientras que *Clostridium*

Tabla 3-4 Relación entre la actividad del agua y la concentración de soluciones salinas

Water Activity	Sodium Chloride Concentration	
	Molal	Percent, w/v
0.995	0.15	0.9
0.99	0.30	1.7
0.98	0.61	3.5
0.96	1.20	7
0.94	1.77	10
0.92	2.31	13
0.90	2.83	16
0.88	3.33	19
0.86	3.81	22

Source: From *The Science of Meat and Meat Products*, by the American Meat Institute Foundation. W.H. Freeman and Company, San Francisco; copyright © 1960.

Tabla 3-5 Valores mínimos aproximados de a_w para el crecimiento de microorganismos importantes en los alimentos

Organisms	a_w	Organisms	a_w
Groups		Groups	
Most spoilage bacteria	0.9	Halophilic bacteria	0.75
Most spoilage yeasts	0.88	Xerophilic molds	0.61
Most spoilage molds	0.80	Osmophilic yeasts	0.61
Specific Organisms		Specific Organisms	
<i>Clostridium botulinum</i> , type E	0.97	<i>Candida scottii</i>	0.92
<i>Pseudomonas</i> spp.	0.97	<i>Trichosporon pullulans</i>	0.91
<i>Acinetobacter</i> spp.	0.96	<i>Candida zeylanoides</i>	0.90
<i>Escherichia coli</i>	0.96	<i>Geotrichum candidum</i>	ca. 0.9
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.95	<i>Trichothecium</i> spp.	ca. 0.90
<i>Bacillus subtilis</i>	0.95	<i>Byssoschlamys nivea</i>	ca. 0.87
<i>Clostridium botulinum</i> , types A and B	0.94	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.86
<i>Candida utilis</i>	0.94	<i>Alternaria citri</i>	0.84
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.94	<i>Penicillium patulum</i>	0.81
<i>Botrytis cinerea</i>	0.93	<i>Eurotium repens</i>	0.72
<i>Rhizopus stoloniter</i>	0.93	<i>Aspergillus glaucus</i> *	0.70
<i>Mucor spinosus</i>	0.93	<i>Aspergillus conicus</i>	0.70
		<i>Aspergillus echinulatus</i>	0.64
		<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0.62
		<i>Xeromyces bisporus</i>	0.61

*Perfect stages of the *A. glaucus* group are found in the genus *Eurotium*.

botulinum no crece por debajo de 0.94. Así como las levaduras y los mohos crecen en un rango de pH más amplio que las bacterias, lo mismo ocurre con a_w . El valor más bajo reportado para las bacterias transmitidas por los alimentos es de 0.75 para las halófilas (literalmente, "amantes de la sal"), mientras que se ha informado que los mohos xerófilos ("amantes de la sequedad") y las levaduras osmofílicas (que prefieren altas presiones osmóticas) crecen a valores a_w de 0.65 y 0.61, respectivamente (Tabla 3-5). Cuando se emplea sal para controlar la a_w , es necesario un nivel extremadamente alto para lograr valores de a_w por debajo de 0.80 (ver tabla 3-4).

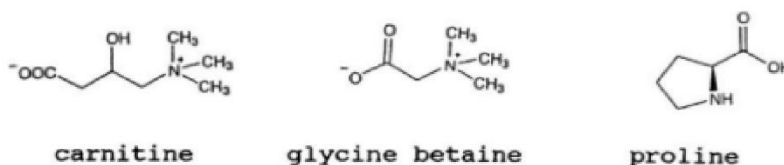
Se ha demostrado que existen ciertas relaciones entre a_w , temperatura y nutrición. Primero, a cualquier temperatura, la capacidad de crecimiento de los microorganismos se reduce a medida que se reduce la a_w . En segundo lugar, el intervalo de a_w sobre el que se produce el crecimiento es mayor a la temperatura óptima para el crecimiento; y tercero, la presencia de nutrientes aumenta el rango de a_w sobre el cual los organismos pueden sobrevivir. Los valores específicos dados en la Tabla 3-5, entonces, deben tomarse sólo como puntos de referencia, ya que un cambio en la temperatura o el contenido de nutrientes podría permitir el crecimiento a valores más bajos de a_w .

Efectos de la baja a_w

El efecto general de reducir a_w por debajo del óptimo es aumentar la duración de la fase de retraso del crecimiento y disminuir la tasa de crecimiento y el tamaño de la población final. Se puede esperar que este efecto sea el resultado de influencias adversas de la disminución del agua en todas las actividades metabólicas porque todas las reacciones químicas de las células requieren un ambiente acuoso. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que la a_w está influenciada por otros parámetros ambientales como el pH, la temperatura de crecimiento y Eh. En su estudio del efecto de la a_w sobre el crecimiento de *Enterobacter aerogenes* en medios de cultivo, Wodzinski y Frazier encontraron que la fase de retardo y el tiempo de generación se alargaron progresivamente hasta que no se produjo crecimiento con una disminución de a_w . Sin embargo, la a_w mínima aumentó cuando se redujo la temperatura de incubación. Cuando tanto el pH como la temperatura de incubación se hicieron desfavorables, la a_w mínima para el crecimiento fue mayor. Horner y Anagnostopoulos demostraron la interacción de a_w , pH y temperatura en el crecimiento de mohos en la mermelada. La interacción entre a_w y temperatura fue la más significativa.

En general, la estrategia empleada por los microorganismos como protección frente al estrés osmótico es la acumulación intracelular de solutos compatibles. Los halófilos (p. ej., *Halobacterium spp.*) mantienen el equilibrio osmótico manteniendo la concentración de KCl en su citoplasma igual a la del medio en suspensión, y esto se conoce como la respuesta de "sal en el citoplasma". Los no halófilos acumulan solutos compatibles (osmolitos) de manera bifásica. La primera respuesta es aumentar el K⁺ (y el glutamato sintetizado endógenamente) y la segunda es aumentar, ya sea por síntesis de novo o por captación, los solutos compatibles. Estas

últimas son moléculas muy solubles que no tienen carga neta a pH fisiológico y no se adhieren ni reaccionan con macromoléculas intracelulares (ver referencia 49). Los tres solutos compatibles más comunes en la mayoría de las bacterias son carnitina, glicina betaína y prolina. La carnitina puede sintetizarse de novo, pero las otras dos generalmente no lo son. La prolina es sintetizada por algunas bacterias grampositivas mientras que es transportada por gramnegativos. La solubilidad de la glicina betaína en 100 ml de agua a 25° C es de 160 g; son 162 g para la prolina. La glicina betaína es empleada por más organismos vivos que los otros dos osmolitos.



La captación de osmolitos está mediada por un sistema de transporte. En *L. monocytogenes*, la glicina betaína es transportada por BetL (acopla la acumulación de betaína a un motivo Na⁺) y Gbu (transporta betaína) mientras que el transportador de carnitina es OpuC. Aunque algunas bacterias Gram positivas acumulan prolina, las bacterias Gram negativas la concentran a niveles más altos. Los tres sistemas transportadores en *E. coli* y *S. Typhimurium* son PutP, ProP y ProU, siendo ProP el más eficaz. Se ha demostrado que la sobreproducción de prolina por mutantes de *L. monocytogenes* produce 12 proteínas una de las cuales es muy similar a la proteína Ctc de *B. subtilis*, y está involucrada en la tolerancia al estrés osmótico en ausencia de osmoprotectores en el medio. El factor sigma-B juega un papel importante en la regulación de la utilización de carnitina en *L. monocytogenes*, pero no es esencial para la utilización de betaína.

Debido a que puede crecer a 4° C, se ha presentado evidencia de que el crecimiento a baja temperatura de *L. monocytogenes* se ve favorecido por la acumulación de glicina betaína. Lo mismo es cierto para *Yersinia enterocolitica*, donde las células estresadas osmóticamente y las estresadas por frío acumularon osmolitos, incluida la glicina betaína. La descarga de temperatura y la descarga osmótica provocaron una absorción de 30 veces de glicina betaína radiomarcada. En al menos una cepa de *L. monocytogenes*, el transporte de glicina betaína está mediado por Gbu y BetL; y en menor medida OpuC.

Con respecto a los compuestos específicos utilizados para reducir la actividad del agua, se han informado resultados similares a los observados con los sistemas de adsorción y desorción. En un estudio de la a_w mínima para el crecimiento y germinación de *Clostridium perfringens*, Kang *et al.* encontraron que el valor estaba entre 0.97 y 0.95 en medios complejos cuando se usaba sacarosa o NaCl para ajustar a_w pero 0.93 o menos cuando se usaba glicerol. En otro estudio, se encontró que el glicerol es más inhibidor que el NaCl para las bacterias relativamente tolerantes a la sal, pero menos inhibidor que el NaCl para las especies sensibles a la sal cuando se compara con niveles similares de a_w en medios complejos. En sus estudios sobre la germinación de las esporas de *Bacillus* y *Clostridium*, Jackobsen y Murrell observaron una fuerte inhibición de la germinación de las esporas cuando la a_w estaba controlada por NaCl o CaCl₂, pero menos inhibición cuando se usaba glucosa o sorbitol, y muy poca inhibición cuando se usaba glicerol, etilenglicol, acetamida o urea. La germinación de las esporas de clostridios se inhibió completamente a una $a_w = 0.95$ con

Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano 50

Este documento fue traducido de Jay (2005), Capítulo 3: Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano. En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

NaCl, pero no se produjo inhibición en la misma a_w cuando se empleó urea, glicerol o glucosa. En otro estudio, se demostró que la a_w limitante para la formación de esporas maduras por la cepa T de *B. cereus* era de aproximadamente 0.95 para la glucosa, sorbitol y NaCl, pero de aproximadamente 0.91 para el glicerol. Se ha descubierto que tanto las levaduras como los mohos son más tolerantes al glicerol que a la sacarosa. Utilizando un medio mínimo de glucosa y *Pseudomonas fluorescens*, Prior descubrió que el glicerol permitía el crecimiento a valores de a_w más bajos que la sacarosa o el NaCl. Este investigador demostró además que el catabolismo de la glucosa, el lactato de sodio y la DL-arginina estaba completamente inhibido por valores de a_w mayores que el mínimo para el crecimiento cuando a_w se controlaba con NaCl. El control de a_w con glicerol permitió que el catabolismo continuara a valores de a_w inferiores a los del crecimiento en glucosa. En todos los casos en los que este investigador utilizó NaCl para ajustar la a_w , el catabolismo del sustrato cesó a una a_w mayor que el mínimo para el crecimiento, mientras que el glicerol permitió el catabolismo a valores de a_w más bajos que el mínimo para el crecimiento. A pesar de algunos informes que indican lo contrario, parece que el glicerol inhibe menos los organismos que respiran que los agentes como la sacarosa y el NaCl.

Las levaduras osmófilas acumulan alcoholes polihídricos a una concentración acorde con su a_w extracelular. Según Pitt, los hongos xerófilos acumulan solutos u osmorreguladores compatibles como consecuencia de la necesidad de solutos internos altos si se quiere que el crecimiento a una a_w baja sea posible. En un estudio comparativo de levaduras xerotolerantes y no xerotolerantes al estrés hídrico, Edgley y Brown encontraron que *Zygosaccharomyces rouxii* respondió a una a_w baja controlada por polietilenglicol reteniendo dentro de las células niveles crecientes de glicerol. Sin embargo, la cantidad no cambió mucho, ni el nivel de arabitól cambió apreciablemente en a_w . Por otro lado, una *S. cerevisiae* no tolerante respondió a una disminución de a_w sintetizando más glicerol pero reteniendo menos. La respuesta de *Z. rouxii* a una a_w baja fue el nivel de permeación / transporte de glicerol, mientras que la de *S. cerevisiae* fue metabólica. De este estudio se desprende que una a_w baja obliga a *S. cerevisiae* a desviar una mayor proporción de su actividad metabólica hacia la producción de glicerol, acompañada de un aumento en la cantidad de glucosa consumida durante el crecimiento. En un estudio posterior, se observó que hasta el 95% de la presión osmótica externa ejercida sobre *S. cerevisiae*, *Z. rouxii* y *Debaryomyces hansenii* puede ser contrarrestada por un aumento de glicerol. *Z. rouxii* acumula más glicerol bajo estrés, mientras que el ribitol permanece constante.

Se sabe que el crecimiento de al menos algunas células puede ocurrir en grandes cantidades a valores de a_w reducidos, mientras que ciertos productos extracelulares no se producen. Por ejemplo, la a_w reducida da como resultado el cese de la producción de enterotoxina B por *S. aureus*, aunque se produzcan al mismo tiempo un gran número de células. En el caso de *Neurospora crassa*, una a_w baja no produjo alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular, lo que provocó la pérdida de varias moléculas esenciales. Se observaron resultados similares con electrolitos o no electrolitos.

En general, el efecto de una disminución de la a_w sobre la nutrición de los microorganismos parece ser de naturaleza general cuando los requisitos de las células que deben ser mediados a través de un medio acuoso se cierran progresivamente. Además del efecto sobre los nutrientes, una

a_w baja indudablemente tiene efectos adversos sobre el funcionamiento de la membrana celular, que debe mantenerse en estado fluido. Se esperaría que se produjera el secado de las partes internas de las células al colocar las células en un medio de a_w reducida hasta un punto en el que se produzca el equilibrio de agua entre las células y el sustrato. Aunque los mecanismos no están del todo claros, todas las células microbianas pueden requerir la misma a_w interna efectiva. Aquellos que pueden crecer en condiciones extremas de baja a_w aparentemente lo hacen en virtud de su capacidad para concentrar sales, polioles y aminoácidos (y posiblemente otros tipos de compuestos) a niveles internos suficientes no solo para evitar que las células pierdan agua, pero que puede permitir que la célula extraiga agua del entorno externo deprimido por el agua. Para obtener más información, consulte las referencias 49,51.

Potencial de reducción de oxidación

Se sabe desde hace décadas que los microorganismos muestran diversos grados de sensibilidad al potencial de oxidación-reducción (O / R, Eh) de su medio de crecimiento. El potencial O / R de un sustrato puede definirse generalmente como la facilidad con la que el sustrato pierde o gana electrones. Cuando un elemento o compuesto pierde electrones, el sustrato se oxida, mientras que un sustrato que gana electrones se reduce:



La oxidación también se puede lograr mediante la adición de oxígeno, como se ilustra en la siguiente reacción:



Por lo tanto, una sustancia que cede electrones fácilmente es un buen agente reductor, y una que absorbe electrones fácilmente es un buen agente oxidante. Cuando los electrones se transfieren de un compuesto a otro, se crea una diferencia de potencial entre los dos compuestos. Esta diferencia puede medirse mediante el uso de un instrumento apropiado y expresarse en milivoltios (mV). Cuanto más oxidada sea una sustancia, más positivo será su potencial eléctrico; cuanto más reducida sea una sustancia, más negativo será su potencial eléctrico. Cuando la concentración de oxidante y reductor es igual, existe un potencial eléctrico cero. El potencial O / R de un sistema se expresa mediante el símbolo Eh. Los microorganismos aerobios requieren valores Eh positivos (oxidados) para el crecimiento, mientras que los anaerobios requieren valores

Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano 52

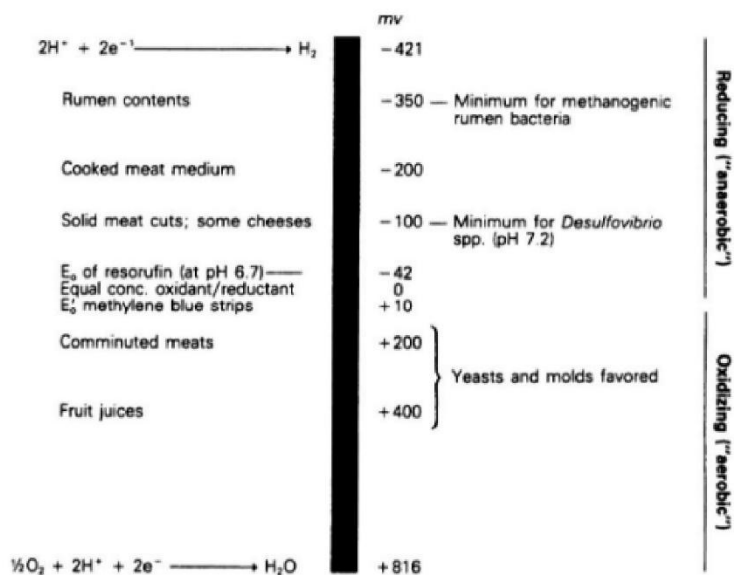


Figura 3-3 Representación esquemática de los potenciales de oxidación-reducción en relación con el crecimiento de ciertos microorganismos.

negativos de Eh (reducido) (Figura 3-3). Entre las sustancias de los alimentos que ayudan a mantener las condiciones reductoras se encuentran los grupos SH en las carnes y el ácido ascórbico y los azúcares reductores en las frutas y verduras. Con respecto a los valores máximos de mV positivos y negativos de la figura 3-3, no solo no son necesarios para el crecimiento de aerobios o anaerobios, sino que estos valores extremos también pueden ser letales para el grupo respectivo (ver la sección de agua de OE en el capítulo 13).

El potencial O / R de un alimento está determinado por lo siguiente:

1. El potencial O / R característico del alimento original.
2. La capacidad de equilibrio; es decir, la resistencia al cambio de potencial del alimento
3. La tensión de oxígeno de la atmósfera alrededor de la comida.
4. El acceso que tiene el ambiente a la comida.

Con respecto a los requisitos de Eh de los microorganismos, algunas bacterias requieren condiciones reducidas para el inicio del crecimiento (Eh de aproximadamente -200 mV), mientras que otras requieren un Eh positivo para el crecimiento. En la primera categoría están las bacterias anaerobias como el género *Clostridium*; en este último pertenecen bacterias aeróbicas como algunos miembros del género *Bacillus*. Algunas bacterias aeróbicas crecen mejor en condiciones ligeramente reducidas

y estos organismos se denominan microaerófilos. Ejemplos de bacterias microaerófilas son lactobacilos y campilobacterias. Algunas bacterias tienen la capacidad de crecer en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Estos tipos se conocen como anaerobios facultativos. La mayoría de los mohos y levaduras que se encuentran dentro y sobre los alimentos son aeróbicos, aunque algunos tienden a ser anaerobios facultativos.

Con respecto a la Eh de los alimentos, los alimentos vegetales, especialmente los jugos vegetales, tienden a tener valores de Eh de +300 a 400 mV. No es sorprendente encontrar que las bacterias aeróbicas y los mohos son la causa común de deterioro de productos de este tipo. Las carnes sólidas tienen valores de Eh de alrededor de -200 mV; en las carnes picadas, el Eh suele rondar los 200 mV. Se ha informado que el queso de varios tipos tiene valores de Eh en el lado negativo, de -20 a -200 mV.

Con respecto a la Eh de los músculos pre-rigor frente a la post-rigor, Barnes e Ingram llevaron a cabo un estudio de la medición de Eh en el músculo durante períodos de hasta 30 horas post-mortem y su efecto sobre el crecimiento de bacterias anaeróbicas. Estos autores encontraron que la Eh del músculo esternocéfalo del caballo inmediatamente después de la muerte era de +250 mV, momento en el cual los clostridios no se multiplicaron. A las 30 horas post-mortem, la Eh había caído a aproximadamente 30 mV en ausencia de crecimiento bacteriano. Cuando se permitió que ocurriera el crecimiento bacteriano, la Eh descendió a aproximadamente 250 mV. Se observó crecimiento de clostridios a valores de Eh de 36 mV e inferiores. Estos autores confirmaron para la carne de caballo el hallazgo de la carne de ballena: que las bacterias anaeróbicas no se multiplican hasta el inicio del rigor mortis debido a la alta Eh en la carne pre-rigor. Sin duda, lo mismo ocurre con la ternera, el cerdo y otras carnes de este tipo.

Efectos de la oxidación-reducción (Eh)

Los microorganismos afectan la Eh de sus ambientes durante el crecimiento al igual que lo hacen con el pH. Esto es cierto especialmente para los aerobios, que pueden reducir el Eh de su entorno, mientras que los anaerobios no pueden. A medida que crecen los aerobios, el O₂ en el medio se agota, lo que resulta en la disminución de Eh. Sin embargo, el crecimiento no se ralentiza tanto como podría esperarse debido a la capacidad de las células para hacer uso de sustancias donantes o que aceptan hidrógeno en el medio. El resultado es que el medio se vuelve más pobre en oxidantes y más rico en sustancias reductoras. Los microorganismos pueden reducir la Eh de un medio mediante la producción de ciertos subproductos metabólicos como el H₂S, que tiene la capacidad de disminuir la Eh a -300mV. Debido a que el H₂S reacciona fácilmente con el O₂, se acumulará solo en entornos anaeróbicos.

Eh depende del pH del sustrato, y la relación directa entre estos dos factores es el valor de rH definido de la siguiente manera:

$$Eh = 2.303 \frac{RT}{F} (rH - 2pH)$$

Donde R = 8.315 jules, F = 96.500 coulombs y T es la temperatura absoluta. Por lo tanto, el pH de un sustrato debe indicarse cuando se administra Eh. Normalmente, el Eh se toma a pH 7.0 (expresado Eh'). Cuando se toma a pH 7.0, 25° C y con todas las concentraciones a 1.0 M, Eh = Eh'0 (ecuación de Nernst simplificada). En la naturaleza, Eh tiende a ser más negativo en condiciones progresivamente alcalinas.

Entre los nutrientes naturales, el ácido ascórbico y los azúcares reductores en plantas y frutas y los grupos -SH en las carnes son de importancia primordial. La presencia o ausencia de cantidades apropiadas de agentes oxidantes-reductores en un medio es de valor obvio para el crecimiento y la actividad de todos los microorganismos.

Aunque normalmente se cree que el crecimiento de anaerobios ocurre a valores reducidos de Eh, la exclusión de O₂ puede ser necesaria para algunos anaerobios. Cuando se cultivaron *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis* y *Peptococcus magnus* en presencia de O₂, se produjo la inhibición del crecimiento incluso cuando el medio tenía una Eh negativa de -50 mV. Estos investigadores encontraron que el crecimiento se produjo en medios con un Eh tan alto como 325 mV cuando no había O₂ presente.

Con respecto al efecto de Eh sobre la producción de lípidos por *Saccharomyces cerevisiae*, se ha demostrado que las células cultivadas anaeróbicamente producen un nivel total más bajo, una fracción de glicéridos muy variable y una disminución de los componentes de fosfolípidos y esterol en comparación con las células cultivadas aeróbicamente. El lípido producido por células cultivadas anaeróbicamente se caracterizó por un alto contenido (hasta el 50% del ácido total) de ácidos 8:0 a 14:0 y un bajo nivel de ácido graso insaturado en la fracción de fosfolípidos. En células cultivadas aeróbicamente, el 80-90% del componente de ácido graso se asoció con glicérido, y se encontró que el fosfolípido era ácidos 16:1 y 18:1. A diferencia de las células cultivadas aeróbicamente, se encontró que las células de *S. cerevisiae* cultivadas anaeróbicamente tienen requerimientos de lípidos y esteroles.

Contenido de Nutrientes

Para crecer y funcionar normalmente, los microorganismos de importancia en los alimentos requieren lo siguiente:

1. Agua

Este documento fue traducido de Jay (2005), Capítulo 3: Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano. En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

2. Fuente de Energía
3. Fuente de Nitrógeno
4. Vitaminas y factores de crecimiento relacionados
5. Minerales

La importancia del agua para el crecimiento y el bienestar de los microorganismos se presentó anteriormente en este capítulo. Con respecto a los otros cuatro grupos de sustancias, los mohos tienen el requerimiento más bajo, seguidos de las bacterias Gram negativas, las levaduras y las bacterias Gram positivas.

Como fuentes de energía, los microorganismos transmitidos por los alimentos pueden utilizar azúcares, alcoholes y aminoácidos. Algunos microorganismos pueden utilizar carbohidratos complejos como almidones y celulosa como fuentes de energía al degradar primero estos compuestos a azúcares simples. Los ayunos también son utilizados por los microorganismos como fuente de energía, ya que estos compuestos son atacados por un número relativamente pequeño de microorganismos en los alimentos.

Las principales fuentes de nitrógeno utilizadas por los microorganismos heterótrofos son los aminoácidos. Una gran cantidad de otros compuestos nitrogenados pueden cumplir esta función para varios tipos de organismos. Algunos microorganismos, por ejemplo, pueden utilizar nucleótidos y aminoácidos libres, mientras que otros pueden utilizar péptidos y proteínas. En general, casi todos los organismos utilizarán compuestos simples como los aminoácidos antes de que se ataque a los compuestos más complejos como las proteínas de alto peso molecular. Lo mismo ocurre con los polisacáridos y las grasas.

Los microorganismos pueden requerir vitamina B en cantidades bajas, y casi todos los alimentos naturales tienen una cantidad abundante para aquellos organismos que son incapaces de sintetizar sus requerimientos esenciales. En general, las bacterias Gram positivas son las menos sintéticas y, por lo tanto, se les debe suministrar uno o más de estos compuestos antes de que crezcan. Las bacterias Gram-negativas y los mohos son capaces de sintetizar la mayoría o todos sus requerimientos. En consecuencia, estos dos grupos de organismos se pueden encontrar creciendo en alimentos con bajo contenido de vitamina B. Las frutas tienden a ser más bajas en vitamina B que las carnes, y este hecho, junto con el pH bajo habitual y la Eh positiva de las frutas, ayuda a explicar el deterioro habitual de estos productos por hongos en lugar de bacterias.

Constituyentes Antimicrobianos

La estabilidad de algunos alimentos frente al ataque de microorganismos se debe a la presencia de determinadas sustancias naturales que procesan y expresan actividad antimicrobiana. Se sabe que algunas especies de plantas contienen aceites esenciales que poseen actividad antimicrobiana. Entre estos se encuentran el eugenol en el clavo, la alicina en el ajo, el aldehído cinámico y el eugenol en la canela, el isotiocianato de alilo en la mostaza, el eugenol y el timol en la salvia, y el carvacrol (isotimol) y el timol en el orégano. La leche de vaca contiene varias sustancias antimicrobianas, que incluyen lactoferrina (ver abajo), conglutinina y

Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano 56

Este documento fue traducido de Jay (2005), Capítulo 3: Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano. En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

el sistema de lactoperoxidasa (ver más abajo). Se ha informado que la leche cruda contiene un inhibidor de rotavirus que puede inhibir hasta 10^6 ufp (unidades formadoras de placa) / ml se destruyen por pasteurización. Se ha demostrado que la caseína de la leche y algunos ácidos grasos libres son antimicrobianos en determinadas condiciones.

Los huevos contienen lisozima, al igual que la leche, y esta enzima, junto con la conalbúmina, proporciona a los huevos frescos un sistema antimicrobiano bastante eficaz. Los derivados del ácido hidroxicinámico (ácidos p-cumárico, ferúlico, cafeico y clorogénico) que se encuentran en frutas, verduras, té, melaza y otras fuentes vegetales, todos poseen actividad antibacteriana y antifúngica. La lactoferrina es una glicoproteína fijadora de hierro que inhibe varias bacterias transmitidas por los alimentos y su uso como agente bloqueante microbiano en canales de res se analiza en el capítulo 13. La ovotransferrina parece ser la sustancia inhibidora de la clara de huevo cruda que inhibe la *Salmonella enteritidis*.

Las vacuolas celulares de las plantas crucíferas (repollo, coles de Bruselas, brócoli, nabos, etc.) contienen glucosinolatos que, tras una lesión o rotura mecánica, producen isotiocianatos. Algunos de estos últimos poseen actividad antifúngica y antibacteriana. Puede encontrar más información sobre los antimicrobianos en los alimentos en el Capítulo 13.

Sistema de Lactoperoxidasa

Este es un sistema inhibidor que se encuentra naturalmente en la leche bovina y consta de tres componentes: lactoperoxidasa, tiocianato y H_2O_2 . Los tres componentes son necesarios para los efectos antimicrobianos, y los psicrótrofos gramnegativos como las *Pseudomonas* son bastante sensibles. La cantidad de lactoperoxidasa necesaria es de 0.5 a 1.0 ppm, mientras que la leche bovina normalmente contiene alrededor de 30 ppm. Aunque tanto el tiocianato como el H_2O_2 se encuentran normalmente en la leche, las cantidades varían. Para el H_2O_2 , se requieren alrededor de 100 U / ml en el sistema inhibidor, mientras que normalmente solo se encuentran 1-2 U / ml en la leche. Un nivel efectivo de tiocianato es de alrededor de 0.25 mM, mientras que en la leche la cantidad varía entre 0.02 y 0.25 mM.

Cuando se activó el sistema de lactoperoxidasa en la leche cruda añadiendo tiocianato a 0.25 mM junto con una cantidad equimolar de H_2O_2 , la vida útil se extendió a 5 días en comparación con 48 horas para los controles. El sistema fue más eficaz a 30° C que a 4° C. El efecto antibacteriano aumenta con la acidez y la membrana citoplasmática parece ser el objetivo celular. Además de la adición directa de H_2O_2 , se puede proporcionar una fuente exógena mediante la adición de glucosa y glucosa oxidasa. Para evitar la adición directa de glucosa oxidasa, esta enzima se ha inmovilizado en perlas de vidrio para que la glucosa se genere solo en las cantidades necesarias mediante el uso de β -galactosidasa inmovilizada. Este sistema fue efectivo en leche de cabra contra *P. flyorens* y *E. coli* donde se controló el crecimiento de la primera durante 3 días y de la segunda durante 2 días a 8° C.

El sistema de lactoperoxidasa se puede utilizar para conservar la leche cruda en países donde la refrigeración es poco común. La adición de aproximadamente 12 ppm de SCN⁻ y 8 ppm de H_2O_2 debería ser inofensiva para el consumidor. Un aspecto interesante de este sistema es

el efecto que tiene sobre las propiedades térmicas. En un estudio, se demostró que reduce los valores de D térmica a 57.8° C en alrededor de un 80% para *L. monocytogenes* y alrededor de un 86% para *S. aureus* a 55.2° C. aunque el mecanismo de esta mayor destrucción térmica no está claro, se pueden prever algunas implicaciones interesantes.

Estructuras Biológicas

La cobertura natural de algunos alimentos proporciona una excelente protección contra la entrada y el daño posterior de los organismos de descomposición. En esta categoría se encuentran estructuras como la prueba de semillas, la cubierta exterior de frutas, la cáscara de nueces, la piel de animales y la cáscara de huevos. En el caso de frutos secos como pacanas y nueces, la cáscara del recubrimiento es suficiente para evitar la entrada de todos los organismos. Una vez quebradas, por supuesto, las nueces están sujetas a deterioro por los mohos. La cáscara exterior y la membrana de los huevos, la humedad y la temperatura. Las frutas y verduras con cubierta dañada se deterioran mucho más rápido que las que no están dañadas. La piel que cubre el pescado y las carnes, como la de res y de cerdo, evita la contaminación y el deterioro de estos alimentos, en parte porque tiende a secarse más rápido que las superficies recién cortadas.

En conjunto, estos seis parámetros intrínsecos representan la forma en que la naturaleza preserva los tejidos vegetales y animales de los microorganismos. Al determinar en qué medida existe cada uno en un producto determinado, se pueden predecir los tipos generales de microorganismos que es probable que crezcan y, en consecuencia, la estabilidad general de este alimento en particular. Su determinación también puede ayudar a determinar la edad y posiblemente el historial de manipulación de un bien dado.

Parametros Extrínsecos

Los parámetros extrínsecos de los alimentos no dependen del sustrato. Son aquellas propiedades del entorno de almacenamiento que afectan tanto a los alimentos como a sus microorganismos. Los de mayor importancia para el bienestar de los organismos transmitidos por los alimentos son los siguientes:

1. Temperatura de almacenamiento
2. Humedad relativa del medio ambiente
3. Presencia y concentración de gases
4. Presencia y actividades de otros microorganismos

Temperatura de Almacenamiento

Los microorganismos, individualmente y como grupo, crecen en un rango muy amplio de temperaturas. Por lo tanto, es bueno considerar en este punto los rangos de crecimiento de temperatura para organismos de importancia en los alimentos como una ayuda para seleccionar la temperatura adecuada para el almacenamiento de diferentes tipos de alimentos.

Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano 58

Este documento fue traducido de Jay (2005), Capítulo 3: Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano. En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

La temperatura más baja a la que se ha informado que crece un microorganismo es -34°C ; el más alto está en algún lugar por encima de los 100°C . Es habitual colocar los microorganismos en tres grupos según sus requisitos de temperatura para el crecimiento. Los organismos que crecen bien a 7°C o menos y tienen su óptimo entre 20°C y 30°C se denominan psicrótrofos (véase el capítulo 16). Aquellos que crecen bien entre 20°C y 45°C con óptimos entre 30°C y 40°C se denominan mesófilos, mientras que aquellos que crecen bien a 45°C y por encima con óptimos entre 55°C y 65°C son referidos como termófilos. (Las propiedades fisiológicas de estos grupos se tratan en los Capítulos 16 y 17.)

Con respecto a las bacterias, las especies y cepas psicrótróficas se encuentran entre los siguientes géneros de los presentados en el Capítulo 2: *Alcaligenes*, *Shewanella*, *Brochothrix*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Enterococcus*, y otros. Los psicrótrofos que se encuentran con mayor frecuencia en los alimentos son los que pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Enterococcus* (véase el capítulo 16). Estos organismos crecen bien a las temperaturas del refrigerador y causan el deterioro a $5-7^{\circ}\text{C}$ de carnes, pescados, aves, huevos y otros alimentos que normalmente se mantienen a esta temperatura. Los recuentos estándar de organismos viables en tales alimentos son generalmente más altos cuando las placas se incuban a aproximadamente 7°C durante al menos 7 días que cuando se incuban a 30°C y más. Las especies y cepas mesófilas se conocen entre todos los géneros presentados en el Capítulo 2 y se pueden encontrar en los alimentos que se mantienen a la temperatura del refrigerador. Aparentemente no crecen a esta temperatura, pero sí crecen a temperaturas dentro del rango mesófilo si otras condiciones son adecuadas. Cabe señalar que algunos organismos pueden crecer en un rango de 0°C a $\geq 40^{\circ}\text{C}$. Uno de esos organismos es *Enterococcus faecalis*.

La mayoría de las bacterias termófilas de importancia en los alimentos pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Clostridium*, *Geobacillus*, *Alicyclobacillus* y *Thermoanaerobacter*. Aunque no todas las especies de estos géneros son termofílicas, son de gran interés para el microbiólogo y tecnólogo de alimentos de la industria de conservación.

Así como los mohos pueden crecer en rangos más amplios de pH, presión osmótica y contenido de nutrientes, también pueden crecer en amplios rangos de temperatura al igual que las bacterias. Muchos mohos pueden crecer a temperaturas del refrigerador, en particular algunas cepas de *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Thamnidium*, que se pueden encontrar creciendo en huevos, lados de carne de res y frutas. Las levaduras crecen en los rangos de temperatura psicrotófica y mesófila, pero generalmente no dentro del rango termófilo.

La calidad del producto alimenticio también debe tenerse en cuenta al seleccionar una temperatura de almacenamiento. Aunque parecería deseable almacenar todos los alimentos a la temperatura del refrigerador o por debajo, esto no siempre es lo mejor para mantener la calidad deseable en algunos alimentos. Por ejemplo, los plátanos se conservan mejor si se almacenan a $13-17^{\circ}\text{C}$ que a $5-7^{\circ}\text{C}$. Una gran cantidad de verduras se ven favorecidas por temperaturas de aproximadamente 10°C , incluidas las patatas, el apio, el repollo y muchos otros. En todos los casos, el éxito de la temperatura de almacenamiento depende en gran medida de la humedad relativa (HR) del entorno de almacenamiento y de la presencia o ausencia de gases como CO_2 y O_3 .

La temperatura de almacenamiento es el parámetro más importante que afecta al deterioro de los alimentos altamente perecederos, y este hecho ha sido enfatizado por el trabajo de Olley y Ratkowsky y sus colaboradores. Según estos investigadores, el deterioro se puede predecir mediante una curva de tasa de deterioro. La curva de deterioro general se ha incorporado a los circuitos de un integrador de funciones de temperatura que lee los días equivalentes de almacenamiento a 0° C y, por lo tanto, permite predecir la vida útil restante y que a 15° C es aproximadamente tres veces mayor que a 5° C. En lugar de utilizar la ecuación de la ley de Arrhenius, se desarrolló lo siguiente para describir la relación entre la temperatura y la tasa de crecimiento de los microorganismos entre las temperaturas mínima y óptima.

$$\sqrt{r} = B(T - T_0)$$

Donde r es la tasa de crecimiento, B es la pendiente de la línea de regresión y T_0 es una temperatura conceptual sin importancia metabólica. Se ha demostrado que la relación lineal se aplica a las bacterias y hongos que se descomponen cuando se cultivan en los alimentos o cuando se utilizan aminoácidos. La incorporación de datos de crecimiento en ecuaciones matemáticas para predecir el comportamiento de los microorganismos en los sistemas alimentarios se analiza con más detalle en el Capítulo 20.

Humedad relativa del medio ambiente

La HR del entorno de almacenamiento es importante tanto desde el punto de vista de la a_w dentro de los alimentos como del crecimiento de microorganismos en las superficies. Cuando la a_w de un alimento se establece en 0.60, es importante que este alimento se almacene en condiciones de HR que no permitan que el alimento recoja la humedad del aire y, por lo tanto, aumente su propia a_w superficial y subsuperficial hasta un punto en el que los microorganismos puede producirse crecimiento. Cuando los alimentos con valores de a_w bajos se colocan en ambientes de HR alta, los alimentos absorben humedad hasta que se establece el equilibrio. Del mismo modo, los alimentos con una a_w alta pierden humedad cuando se colocan en un ambiente de baja HR. Existe una relación entre la humedad relativa y la temperatura que debe tenerse en cuenta al seleccionar los entornos de almacenamiento adecuados para los alimentos. En general, cuanto mayor es la temperatura, menor es la HR y viceversa.

Los alimentos que se deterioran en la superficie a causa de mohos, levaduras y ciertas bacterias deben almacenarse en condiciones de baja humedad relativa. Las carnes envueltas incorrectamente, como pollos enteros y cortes de res, tienden a sufrir mucho deterioro en la superficie del refrigerador antes de que se produzca un deterioro profundo, debido a la HR generalmente alto del refrigerador y al hecho de que la biota de descomposición de la carne es esencialmente de naturaleza aeróbica. Aunque es posible reducir las posibilidades de deterioro de la superficie en ciertos alimentos almacenándolos en condiciones bajas de HR, debe recordarse que el alimento mismo perderá humedad en la atmósfera en tales condiciones y, por lo tanto, se volverá

Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano 60

Este documento fue traducido de Jay (2005), Capítulo 3: Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano. En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

indeseable. Al seleccionar las condiciones ambientales adecuadas de HR, se debe considerar tanto la posibilidad de crecimiento en la superficie como la calidad deseable que se debe mantener en los alimentos en cuestión. Al alterar la atmósfera gaseosa, es posible retrasar el deterioro de la superficie sin reducir la HR.

Presencia y concentración de gases en el medio ambiente

El dióxido de carbono (CO₂) es el gas atmosférico más importante que se utiliza para controlar los microorganismos en los alimentos. Junto con el O₂, son los dos gases más importantes en los alimentos envasados en atmósfera modificada (MAP), y esto se analiza en el Capítulo 14.

El ozono (O₃) es el otro gas atmosférico que tiene propiedades antimicrobianas y se ha probado durante varias décadas como agente para prolongar la vida útil de ciertos alimentos. Se ha demostrado que es eficaz contra una variedad de microorganismos, pero debido a que es un agente oxidante fuerte, no debe usarse en alimentos con alto contenido de lípidos ya que causaría un aumento de la rancidez. El ozono se probó contra *Escherichia coli* = O157: H7 en medio de cultivo, y de 3 a 18 ppm la bacteria se destruyó en 20 a 50 minutos. El gas se administró desde un generador de ozono y en agar de soya tripticas, el valor D para 18 ppm fue 1.18 minutos, pero en tampón fosfato, el valor D fue 3.18 minutos. Para lograr una inactivación del 99% de aproximadamente 10,000 quistes de *Giardia lamblia* por mililitro, se encontró que el tiempo medio de concentración era de 0.17 y 0.53 mg-min / L a 25° C y 5° C, respectivamente. El protozoo era aproximadamente tres veces más sensible al O₃ a 25° C que a 5° C. Está permitido en los alimentos en Australia, Francia y Japón, y en 1997 se le otorgó el estatus GRAS (generalmente considerado como inocuo) en los Estados Unidos para uso alimentario. En general, se ha demostrado que los niveles de O₃ de 0.15 a 5.00 ppm en el aire inhiben el crecimiento de algunas bacterias de descomposición y de levaduras. El uso de ozono como agente desinfectante de alimentos se presenta en el Capítulo 13.

Presencia y Actividades de Otros Microorganismos

Algunos organismos transmitidos por los alimentos producen sustancias que inhiben o son letales para otros; estos incluyen antibióticos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos. Las bacteriocinas y algunos antibióticos se analizan en el Capítulo 13. El efecto inhibitorio de algunos miembros de la microbiota alimentaria sobre otros está bien establecido, y esto se analiza en la sección de control biológico en el Capítulo 13.

Referencia del Documento:

Jay. 2005. Factores intrínsecos y extrínsecos que afectan el crecimiento microbiano. Capítulo 3. Pag. 39-59.

REFERENCES

1. Angelidis, A.S., and G.M. Smith. 2003. Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnitine in *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1013–1022.
2. Barnes, E.M., and M. Ingram. 1955. Changes in the oxidation–reduction potential of the sterno-cephalic muscle of the horse after death in relation to the development of bacteria. *J. Sci. Food Agric.* 6:448–455.
3. Barnes, E.M., and M. Ingram. 1956. The effect of redox potential on the growth of *Clostridium welchii* strains isolated from horse muscle. *J. Appl. Bacteriol.* 19:117–128.
4. Baron, F., M. Gautier, and G. Brule. 1997. Factors involved in the inhibition of *Salmonella enteritidis* in liquid egg white. *J. Food Protect.* 60:1318–1323.
5. Bate-Smith, E.C. 1948. The physiology and chemistry of rigor mortis, with special reference to the aging of beef. *Adv. Food Res.* 1:1–38.
6. Björck, L. 1978. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk. *J. Dairy Res.* 45:109–118.
7. Björck, L., and C.-G. Rosen. 1976. An immobilized two-enzyme system for the activation of the lactoperoxidase antibacterial system in milk. *Biotechnol. Bioeng.* 18:1463–1472.
8. Briskey, E.J. 1964. Etiological status and associated studies of pale, soft, exudative porcine musculature. *Adv. Food Res.* 13:89–178.
9. Burleson, G.R., T.M. Murray, and M. Pollard. 1975. Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonication. *Appl. Microbiol.* 29:340–344.
10. Byun, M.-W., L.-J. Kwon, H.-S. Yook, and K.-S. Kim. 1998. Gamma irradiation and ozone treatment for inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7 in culture media. *J. Food Protect.* 61:728–730.
11. Callow, E.H. 1949. Science in the imported meat industry. *J. R. Sanitary Inst.* 69:35–39.
12. Charlang, G., and N.H. Horowitz. 1974. Membrane permeability and the loss of germination factor from *Neurospora crassa* at low water activities. *J. Bacteriol.* 117:261–264.
12. Charlang, G., and N.H. Horowitz. 1974. Membrane permeability and the loss of germination factor from *Neurospora crassa* at low water activities. *J. Bacteriol.* 117:261–264.
13. Christian, J.H.B. 1963. Water activity and the growth of microorganisms. In *Recent Advances in Food Science*, ed. J.M. Leitch and D.N. Rhodes, vol. 3, 248–255. London: Butterworths.
14. Chung, K.C., and J.M. Goepfert. 1970. Growth of *Salmonella* at low pH. *J. Food Sci.* 35:326–328.
15. Clark, D.S., and C.P. Lentz. 1973. Use of mixtures of carbon dioxide and oxygen for extending shelf-life of prepackaged fresh beef. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 6:194–196.
16. Conway, E.J., and M. Downey. 1950. pH values of the yeast cell. *Biochem. J.* 47:355–360.
17. Corlett, D.A., Jr., and M.H. Brown. 1980. pH and acidity. In *Microbial Ecology of Foods*, 92–111. New York: Academic Press.
18. Daud, H.B., T.A. McMeekin, and J. Olley. 1978. Temperature function integration and the development and metabolism of poultry spoilage bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:650–654.
19. Edgley, M., and A.D. Brown. 1978. Response of xerotolerant and nontolerant yeasts to water stress. *J. Gen. Microbiol.* 104:343–345.
20. Fraser, K.R., D. Sue, M. Wiedmann, K. Boor, and C.P. O'Byrne. 2003. Role of σ^B in regulating the compatible solute uptake systems of *Listeria monocytogenes*: Osmotic induction of *opuC* is σ^B dependent. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2015–2022.
21. Gardan, R., O. Duché, S. Leroy-Sétrin, European *Listeria* genome consortium, and J. Labadie. 2003. Role of *ctc* from *Listeria monocytogenes* in osmotolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:154–161.
22. Goepfert, J.M., and H.U. Kim. 1975. Behavior of selected foodborne pathogens in raw ground beef. *J. Milk Food Technol.* 38:449–452.
23. Hewitt, L.F. 1950. *Oxidation–Reduction Potentials in Bacteriology and Biochemistry*, 6th ed. Edinburgh: Livingston.
24. Horner, K.J., and G.D. Anagnostopoulos. 1973. Combined effects of water activity, pH and temperature on the growth and spoilage potential of fungi. *J. Appl. Bacteriol.* 36:427–436.

Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano 62

Este documento fue traducido de Jay (2005), Capítulo 3: Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano. En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

25. Jakobsen, M., and W.G. Murrell. 1977. The effect of water activity and the a_w -controlling solute on germination of bacterial spores. *Spore Res.* 2:819–834.
26. Jakobsen, M., and W.G. Murrell. 1977. The effect of water activity and a_w -controlling solute on sporulation of *Bacillus cereus* T. *J. Appl. Bacteriol.* 43:239–245.
27. Kamau, D.N., S. Doores, and K.M. Pruitt. 1990. Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2711–2716.
28. Kang, C.K., M. Woodburn, A. Pagenkopf, and R. Cheney. 1969. Growth, sporulation, and germination of *Clostridium perfringens* in media of controlled water activity. *Appl. Microbiol.* 18:798–805.
29. Ko, R., L.T. Smith, and G.M. Smith. 1994. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 176:426–431.
30. Marshall, B.J., F. Ohye, and J.H.B. Christian. 1971. Tolerance of bacteria to high concentrations of NaCl and glycerol in the growth medium. *Appl. Microbiol.* 21:363–364.
31. Mayerhauser, C.M. 2001. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in retail mustard. *J. Food Protect.* 64:783–787.
32. Morris, E.O. 1962. Effect of environment on microorganisms. In *Recent Advances in Food Science*, ed. J. Hawthorn and J.M. Leitch, vol. 1, 24–36. London: Butterworths.
33. Mossel, D.A.A., and M. Ingram. 1955. The physiology of the microbial spoilage of foods. *J. Appl. Bacteriol.* 18:232–268.
34. Olley, J., and D.A. Ratkowsky. 1973. The role of temperature function integration in monitoring fish spoilage. *Food Technol. N.Z.* 8:13–17.
35. Parekh, K.G., and M. Solberg. 1970. Comparative growth of *Clostridium perfringens* in carbon dioxide and nitrogen atmospheres. *J. Food Sci.* 35:156–159.
36. Park, S., L.T. Smith, and G.M. Smith. 1995. Role of glycine betaine and related osmolytes in osmotic stress adaptation in *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4378–4381.
37. Peña, A., G. Cinco, A. Gomez-Puyou, and M. Tuena. 1972. Effect of pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 153:413–425.
38. Pitt, J.I. 1975. Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. In *Water Relations of Foods*, ed. R.B. Duckworth, 273–307. London: Academic Press.
39. Prior, B.A. 1978. The effect of water activity on the growth and respiration of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Bacteriol.* 44:97–106.
40. Ratkowsky, D.A., J. Olley, T.A. McMeekin, and A. Ball. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.* 149:1–5.
41. Rattray, J.B.M., A. Schibeci, and D.K. Kidby. 1975. Lipids of yeasts. *Bacteriol. Rev.* 39:197–231.
42. Reay, G.A., and J.M. Shewan. 1949. The spoilage of fish and its preservation by chilling. *Adv. Food Res.* 2:343–398.
43. Reed, R.K., J.A. Chudek, K. Foster, and G.M. Gadd. 1987. Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2119–2123.
44. Reiter, B., and G. Harnulv. 1984. Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and practical applications. *J. Food Protect.* 47:724–732.
45. Rose, A.H. 1965. *Chemical Microbiology*, chap. 3. London: Butterworths.
46. Rothstein, A., and G. Demis. 1953. The relationship of the cell surface to metabolism: The stimulation of fermentation by extracellular potassium. *Arch. Biochem. Biophys.* 44:18–29.
47. Shelef, L.A. 1983. Antimicrobial effects of spices. *J. Food Safety.* 6:29–44.
48. Sherman, J.M., and G.E. Holm. 1922. Salt effects in bacterial growth. II. The growth of *Bacterium coli* in relation to H-ion concentration. *J. Bacteriol.* 7:465–470.
49. Sleator, R.D., and C. Hill. 2001. Bacterial osmoadaptation: The role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:49–71.
50. Stier, R.F., L. Bell, and K.A. Ito, B.D. Shafer, L.A. Brown, M.L. Seeger, B.H. Allen, M.N. Porcuna, and P.A. Lerke. 1981. Effect of modified atmosphere storage on *C. botulinum* toxigenesis and the spoilage microflora of salmon fillets. *J. Food Sci.* 46:1639–1642.
51. Troller, J.A. 1986. Water relations of foodborne bacterial pathogens: an updated review. *J. Food Protect.* 49:656–670.

Este documento fue traducido de Jay (2005), Capítulo 3: Factores Intrínsecos y Extrínsecos que Afectan el Crecimiento Microbiano. En la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, para la clase de Microbiología de los Alimentos en el departamento de Agroindustria Alimentaria.

52. Walden, W.C., and D.J. Hentges. 1975. Differential effects of oxygen and oxidation–reduction potential on the multiplication of three species of anaerobic intestinal bacteria. *Appl. Microbiol.* 30:781–785.
53. Wickramanayake, G.B., A.J. Rubin, and O.J. Sproul. 1984. Inactivation of *Giardia lamblia* cysts with ozone. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:671–672.
54. Wodzinski, R.J., and W.C. Frazier. 1961. Moisture requirements of bacteria. II. Influence of temperature, pH, and maleate concentration on requirements of *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.* 81:353–358.
55. Zapico, P., P. Gaya, and M. Nuñez, and M. Medina. 1994. Activity of goats' milk lactoperoxidase system on *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli* at refrigeration temperatures. *J. Food Protect.* 58:1136–1138.

Anexo B

Fuentes de microorganismos en alimentos

INTRODUCCIÓN

41

1

Introducción

Fuentes de microorganismos en alimentos

La cadena de alimentos del hombre consiste primordialmente de plantas, animales y productos derivados de estos. Los microorganismos están presentes naturalmente en el suelo, agua y aire, y por eso las superficies exteriores de plantas y animales están contaminadas con una variedad de microorganismos. Hay poca especificidad para esta micro flora ya que refleja la del ambiente en que las plantas fueron crecidas y los animales criados. Tejidos internos de las plantas y animales usualmente contienen pocos, o ningún, microorganismo. El tracto gastrointestinal de animales, sin embargo, contienen altos números de organismos. Pero si hay una cosecha con procedimientos apropiados, la contaminación del musculo interno puede ser evitada.

Desde el tiempo de cosecha, atrapado, o matanza, la superficie y los tejidos internos de los animales y plantas son sujetos a contaminación. Esto es en parte por la descompostura de mecanismos normales de defensa, particularmente en animales. Cada paso del procesamiento sujeta el material crudo a oportunidades para contaminación. Las fuentes de contaminación incluyen superficies de animales y plantas cosechadas, agua, equipo, utensilios, trabajadores y el ambiente de procesamiento.

Actividad microbiana en alimentos

Aspectos históricos

Durante su existencia, los seres humanos se han enfrentado al problema de la vida útil limitada de los alimentos de origen animal y vegetal, en parte debido a las actividades microbianas. Durante los últimos 5.000 a 10.000 años, una variedad de técnicas (como secado, salazón, calentamiento, fermentación, refrigeración o congelación) evolucionaron empíricamente y contribuyeron a aumentar la vida útil de los alimentos de origen vegetal y animal. Estas técnicas, que controlaban la actividad microbiana en mayor o menor medida, fueron aplicadas antes de que se entendiera el mecanismo de su efecto. A principios de la década de 1800, Francois Nicholas Appert recibió una patente por un método práctico de conservación de alimentos, llamado, el "enlatado". Desde entonces, y particularmente durante los últimos 40 años, se han desarrollado nuevos procesos para extender la vida útil de los alimentos. Aunque algunos otros pueden haber sugerido la participación microbiana en el deterioro de los alimentos en fechas anteriores, fue Louis Pasteur quien a mediados del siglo XIX estableció por primera vez una base científica para la relación directa entre el deterioro de los alimentos y la actividad microbiana. Los microorganismos responsables de las enfermedades transmitidas por los alimentos se reconocieron por primera vez

alrededor de 1880. Desde entonces, el número de agentes microbianos reconocidos como involucrados en las enfermedades transmitidas por los alimentos ha aumentado constantemente.

Microorganismos útiles, patógenos, y de descomposición.

Los microorganismos asociados con los alimentos pueden clasificarse como "deterioradores", "patógenos" o "útiles". Los microorganismos deterioradores son aquellos que pueden crecer en un alimento y causar cambios indeseables en el sabor, consistencia (cuerpo y textura), color o apariencia. Además, las enzimas bacterianas pueden provocar un deterioro lento de los alimentos congelados o secos durante un almacenamiento prolongado. Estos cambios disminuyen las características de calidad de los alimentos y, en última instancia, pueden hacerlos no aptos para el consumo humano. Por ejemplo, los alimentos perecederos refrigerados como la leche, la carne fresca, las aves, el pescado, las frutas y las verduras pierden algunas características de calidad durante el almacenamiento normal y finalmente se echan a perder, debido en parte a la actividad de los microorganismos capaces de crecer a temperaturas de refrigeración. Por lo general, se produce un crecimiento microbiano extenso (millones de organismos por g o cm²) antes de que las pérdidas de calidad sean perceptibles. Estos cambios, cuando los percibe el consumidor, sirven como una alerta de que se ha producido una actividad microbiana extensa.

Los microorganismos patógenos pueden convertir los alimentos en dañinos para los seres humanos de diversas formas. Los alimentos pueden servir como vehículo para la introducción de microorganismos infecciosos en el tracto gastrointestinal, por ejemplo, *Salmonella* y *Shigella*. La multiplicación de ciertos microorganismos en los alimentos antes del consumo puede resultar en la producción de toxinas, por ejemplo, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. Los alimentos también pueden ser el vehículo para microorganismos que forman toxinas in vivo, por ejemplo, *Clostridium perfringens* y ciertas *Escherichia coli* patógenas.

Con algunos alimentos, se eligen ciertas condiciones que favorecen el desarrollo de microorganismos útiles como las bacterias ácido lácticas y las levaduras, que están presentes de forma natural o añadidas intencionalmente. Alimentos como quesos, yogur, panes, encurtidos y salchichas fermentadas ofrecen propiedades organolépticas y vida útil deseables.

Los Alimentos como Ambiente Selectivo

Las actividades microbianas en los alimentos se pueden ver desde la perspectiva de los alimentos como un "ambiente selectivo", a pesar de la diversidad de microorganismos que contaminan las superficies de las materias primas. La selectividad viene impuesta por las características físico-químicas del alimento, los aditivos que contiene, las técnicas de procesamiento, el material de empaque y las condiciones de almacenamiento. Es necesario distinguir entre la vida útil de dos categorías amplias de alimentos, a saber, los que son estables y los perecederos. Para esta discusión, la vida útil se tratará solo en relación con la actividad microbiana.

La estabilidad microbiológica de muchos alimentos está relacionada con las condiciones de almacenamiento. Por ejemplo, los alimentos secos y congelados son microbiológicamente estables en almacenamiento siempre que permanezcan secos o congelados. Los alimentos estables en

INTRODUCCIÓN

43

almacenamiento no son necesariamente estériles; de hecho, muchos contienen microorganismos. Algunos alimentos enlatados no perecederos pueden sufrir un deterioro microbiológico si se exponen a temperaturas elevadas que permitan el crecimiento de bacterias termófilas formadoras de esporas supervivientes, mientras que estos organismos están inactivos a temperatura ambiente y, de hecho, tienden a morir durante el almacenamiento normal. Los alimentos estables en almacenamiento se distinguen de los alimentos perecederos en que un atributo o atributos del alimento estable en almacenamiento previene el crecimiento de microorganismos contaminantes. Por ejemplo, ciertos productos enlatados se procesan térmicamente en la medida en que son estériles; el atributo que asegura la estabilidad de tales productos es la eliminación de todas las formas vivas. Con muchos alimentos no perecederos, otros atributos previenen el crecimiento microbiano. Los frijoles secos son estables en almacenamiento porque contienen humedad insuficiente para permitir el crecimiento microbiano. La mayonesa es estable en almacenamiento porque contiene suficiente ácido acético con la fase húmeda del para evitar el crecimiento de organismos contaminantes. Ciertas carnes curadas enlatadas son estables en almacenamiento, no porque sean estériles, sino porque el tratamiento térmico subletal daña tanto a las esporas supervivientes que son incapaces de crecer en presencia de sal y nitrito. La característica distintiva de los alimentos estables en almacenamiento, entonces, es su resistencia al deterioro microbiológico. El crecimiento microbiano en tales productos es un evento anormal e inesperado.

Los alimentos perecederos, por otro lado, tienen una vida útil limitada y, si no se consumen, se echan a perder en algún momento durante el almacenamiento. El momento exacto de deterioro depende de un gran número de variables. Aunque se pueden aplicar varios procedimientos de procesamiento, aditivos, métodos de envasado y condiciones de almacenamiento para aumentar la vida útil, los microorganismos capaces de crecer sobreviven y finalmente crecen. Cuando tal crecimiento se produce en la medida en que el procesador, el preparador o el consumidor percibe cambios indeseables, el alimento se considera de calidad inferior o se echa a perder y se rechaza. La característica distintiva de los alimentos perecederos, en contraste con los alimentos no perecederos, es que el deterioro microbiológico es un evento esperado. En última instancia, ocurrirá incluso si la comida se ha preparado a partir de materias primas saludables y se ha procesado, empacado y almacenado adecuadamente.

Microflora de Alimentos Procesados

Aunque la microflora de las materias primas suele ser heterogénea, el procesamiento de los alimentos (excepto los que son estériles) impone a menudo una flora microbiológica característica y muy específica. La flora normal de los alimentos enlatados de bajo contenido ácido, muy procesados térmicamente, pero no esterilizados, se compone de bacterias termófilas formadoras de esporas, los componentes microbianos más resistentes al calor de las materias primas. La flora predominante de las carnes curadas enlatadas estables en almacenamiento consiste en bacterias mesófilas aeróbicas y anaeróbicas formadoras de esporas, los organismos predominantes resistentes al proceso de calor aplicado a estos productos. La flora normal de la mayonesa y el aderezo para ensaladas se compone de pequeñas cantidades de bacterias formadoras de esporas, levaduras y bacterias ácido lácticas. Las bacterias aerobias formadoras de esporas predominan en las especias secas y en varios productos vegetales secos. En los frutos secos predominan los mohos

INTRODUCCIÓN

44

Este documento es una traducción del ICSMF y se utiliza con fines educativos en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, dentro del departamento de Agroindustria Alimentaria.

y las levaduras. La flora normal de las bebidas carbonatadas se compone de levaduras. En cada uno de los anteriores, la microflora superviviente y predominante refleja la naturaleza de las materias primas, las condiciones de procesamiento, el envasado y el almacenamiento del producto estable en almacenamiento. Sin embargo, el deterioro aún es posible. Si los alimentos enlatados severamente procesados térmicamente se expusieron a altas temperaturas durante el almacenamiento, podría ocurrir el deterioro debido a la germinación y al crecimiento de bacterias termófilas formadoras de esporas. Si la carne curada en conserva, estable en el almacenamiento, tuviera un número excesivo de bacterias aerobias formadoras de esporas, el crecimiento de estos organismos podría resultar en deterioro, a pesar de un proceso térmico adecuado y niveles normales de sal y nitrito. Los niveles excesivos de levaduras o bacterias ácido lácticas pueden resultar en su propio crecimiento y posterior deterioro de la mayonesa, a pesar de los niveles de ácido acético que asegurarían la estabilidad de un producto que contiene niveles "normales" de los mismos organismos. El abuso de tiempo / temperatura de un ingrediente de una bebida carbonatada (por ejemplo, un sabor) puede conducir al desarrollo de un gran número de levaduras que podrían superar el efecto del ácido carbónico, que normalmente haría que la misma bebida fuera estable. La flora normal en un producto microbiológicamente estable en almacenamiento es, por lo tanto, bastante específica. Si se supera la naturaleza estabilizadora del sistema, esta microflora puede multiplicarse y causar deterioro, un evento inesperado.

Con los productos perecederos, la microflora que sobrevive al procesamiento puede ser heterogénea, pero la parte que se desarrolla durante el almacenamiento y causa el deterioro suele ser bastante específica. Por ejemplo, existe una flora heterogénea en las carnes rojas, aves y pescados crudos como resultado de la contaminación del animal y / o el ambiente de procesamiento. Sin embargo, durante el almacenamiento refrigerado de tales productos, el deterioro es causado predominantemente por un grupo muy específico de microorganismos, como llamados, *Pseudomonas* y bacterias psicótropas gram negativas aeróbicas estrechamente relacionadas. Si el mismo producto se envasa al vacío en películas impermeables al oxígeno, predomina una microflora diferente, llamadas, bacterias ácido lácticas que crecen tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. En ambos ejemplos, a pesar de la flora heterogénea del producto terminado, puede desarrollarse un grupo bastante restringido de microorganismos y finalmente causar cambios sensoriales en el producto. Existen relaciones similares para muchos otros alimentos perecederos.

De ello se deduce que, dado que la mayoría de las clases de alimentos perecederos constituyen ambientes selectivos para grupos bastante restringidos de microorganismos, el deterioro causado por el crecimiento de estos microorganismos se manifiesta de una manera característica, es decir, un patrón de deterioro normal. Por ejemplo, cuando las *pseudomonas* y otras bacterias aeróbicas psicrotróficas gramnegativas estrechamente relacionadas crecen en grandes cantidades en la superficie de la carne, las aves y el pescado frescos refrigerados, se producen cambios sensoriales. La primera manifestación de deterioro es el desarrollo de mal olor. A medida que avanza el crecimiento, se puede desarrollar una baba y el mal olor puede intensificarse. El patrón normal de deterioro de un alimento perecedero puede ser una salvaguardia, ya que en ciertas situaciones advierte al procesador, al preparador o al consumidor que el alimento ya no es comestible.

Los cambios en el procesamiento de alimentos perecederos deben tener en cuenta el efecto que estos cambios pueden tener en la flora de descomposición y, por lo tanto, en el patrón normal de descomposición de los alimentos involucrados. Si tales cambios tienden a alterar el patrón

normal de deterioro de los alimentos involucrados. Si tales cambios tienden a alterar los patrones normales de deterioro, deben tenerse en cuenta los aspectos de salud pública. Un ejemplo clásico de esto se relaciona con la comercialización de bacalao ahumado. Durante generaciones, este producto se comercializó en condiciones en las que el pescado estaba expuesto al aire. El deterioro fue evidenciado por el desarrollo de bacterias que produjeron malos olores y limo que fueron fácilmente reconocidos por el consumidor y causaron rechazos del producto. Luego se descubrió que la vida útil del pescado ahumado podría aumentar significativamente si el producto se envasa en una película impermeable al oxígeno. Con un almacenamiento prolongado del producto en estas condiciones, *C. botulinum* tipo E pudo crecer y producir toxina, tal como hubiera podido hacerlo en el producto empacado convencionalmente. Sin embargo, en estas condiciones de almacenamiento, las bacterias aeróbicas que producen malos olores y baba no pudieron desarrollarse y la flora normal de descomposición ahora estaba compuesta por bacterias ácido lácticas que no producían malos olores. Este cambio en el patrón de deterioro normal del producto redujo la probabilidad de que el consumidor rechazara un producto que había estado almacenado fuera de refrigeración durante un período prolongado. Esto condujo a un brote multiestatal de botulismo tipo E (Kautter, 1964). Por lo tanto, es esencial que, si se realizan cambios en el procesamiento o comercialización de un producto perecedero, se tenga en cuenta la influencia de estos cambios en los patrones normales de deterioro del producto.

Control de Microorganismos en Alimentos

Se debe ejercer control sobre tres categorías diferentes de microorganismos que pueden estar presentes en los alimentos: (1) los que tienen el potencial de producir enfermedades transmitidas por los alimentos, (2) los que causan el deterioro de los alimentos y (3) los que crecen en los alimentos y producen cambios deseables.

Los programas eficaces de control de los alimentos eliminan la posibilidad de enfermedades transmitidas por los alimentos de diversas formas. Se pueden emplear técnicas de prueba que causan la destrucción de patógenos, por ejemplo, la pasteurización de la leche para destruir *Coxiella burnetii* y *Mycobacterium tuberculosis* y patógenos menos resistentes al calor como el bacilo de la difteria, las salmonelas y los estreptococos piógenos, y el proceso 12-D [1] para la destrucción de *C. botulinum* en alimentos enlatados bajos en ácido. En otros casos, los microorganismos toxigénicos e infecciosos se controlan mediante la formulación del producto (ácido acético en mayonesa) o las condiciones de almacenamiento (la refrigeración de carnes curadas enlatadas pasteurizadas perecederas para controlar el crecimiento de *C. botulinum*). En otras situaciones, el control final lo ejerce la persona que prepara la comida (coccción adecuada de las aves de corral para eliminar las salmonelas y del cerdo para eliminar las triquinelas). A pesar de estos esfuerzos, los programas de control de los alimentos no han logrado sus objetivos de controlar los patógenos transmitidos por los alimentos (véase en particular el Capítulo 4 donde se tratan en detalle las enfermedades de origen microbiológico transmitidas por los alimentos).

¹El proceso 12-D es el tratamiento térmico mínimo que se aplica a las conservas bajas en ácido; prevé la reducción de 10^{12} esporas resistentes al calor de *C. botulinum* a una. Esto requiere aproximadamente 2.5 minutos de exposición a 121.1 ° C (250 ° F) o su equivalente.

INTRODUCCIÓN

Este documento es una traducción del ICSMF y se utiliza con fines educativos en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, dentro del departamento de Agroindustria Alimentaria.

Las medidas de control dirigidas a la prevención del deterioro tampoco han sido las ideales. Aunque es difícil obtener cifras precisas, se estima que una cuarta parte del suministro de alimentos del mundo se pierde solo por la actividad microbiana. El control del deterioro de los alimentos es un objetivo económico primordial de los programas de control. Para los productos diseñados para ser estables en almacenamiento, el control se logra a través de procedimientos de procesamiento y / o formulación que resultan en la inhibición de organismos de descomposición. Con los alimentos perecederos, el objetivo es lograr la vida útil más larga posible en consonancia con la seguridad del producto. En general, esto se intenta instituyendo medidas que darán como resultado productos con baja carga microbiana, ya que la vida útil y el nivel inicial de contaminación suelen estar directamente relacionados en los alimentos perecederos. El control de los microorganismos restantes se logra con mayor frecuencia mediante un almacenamiento refrigerado adecuado.

Las propiedades organolépticas deseables (sabor, olor, cuerpo y textura) de alimentos tales como quesos, yogur, suero de mantequilla cultivado, crema agria, encurtidos y salchichas fermentadas resultan en parte de las actividades de una flora microbiana específica. Se necesitan extensos procedimientos de control microbiológico para procesar "productos cultivados" de alta calidad y para asegurar que las actividades microbianas estén guiadas de tal manera que los productos finales tengan las propiedades sensoriales deseables. Por ejemplo, en los productos lácteos cultivados, esto se logra mediante (1) la selección y manipulación adecuadas de los cultivos iniciadores, (2) el control de la presencia de antibióticos y bacteriófagos, y (3) el control por medios químicos y organolépticos del progreso de la actividad microbiana en materias primas y productos terminados. Estas medidas pueden influir tanto en la calidad como en la seguridad de los alimentos. Por ejemplo, la falta de acidez causada por la falla del cultivo puede permitir el desarrollo de *S. aureus*, lo que podría resultar en queso que contiene enterotoxina estafilocócica.

Otro objetivo de los programas de control de alimentos es mantener la suciedad y otras sustancias extrañas fuera de los alimentos. En algunos casos, las materias extrañas son un problema de salud pública, por ejemplo, excremento y pelo de roedores; en otros casos, el material extraño es de importancia estética más que para la salud, por ejemplo, ciertos insectos en cereales.

Finalmente, otro objetivo de los programas de control de alimentos es asegurar que el empaque, almacenamiento, manipulación, transporte, exhibición y venta de alimentos se realicen correctamente. Los procesadores y los funcionarios reguladores pueden ejercer control sobre un producto mientras se empaca, almacena y prepara para su distribución desde la planta de origen. Pero más allá de ese punto, la intensidad del control disminuye rápidamente.

La mayor parte de los problemas con las enfermedades transmitidas por los alimentos y el deterioro de los alimentos se debe a eventos que ocurren después de que los alimentos han salido de la planta de procesamiento, durante el transporte, durante las ventas minoristas y, finalmente, en el establecimiento de servicio de alimentos o en el hogar (CDC, 1981). En estos lugares, el control en ocasiones no existe o se ejecuta de manera ineficaz, produciendo así el eslabón más débil de la cadena alimentaria. Muchas de las mejoras en el control de los alimentos que se realizan a nivel de procesamiento quedarán anuladas si los procedimientos de manipulación más allá de la planta no se controlan eficazmente.

Enfoques para el control microbiológico en los alimentos

Tradicionalmente, las agencias reguladoras y los procesadores de alimentos han utilizado tres medios principales para controlar los microorganismos en los alimentos. Estos son (1) educación y capacitación, (2) inspección de instalaciones y operaciones, y (3) pruebas microbiológicas.

Aunque los manipuladores de alimentos tienen el potencial de contaminar los alimentos con microorganismos que producen enfermedades, es decir, estafilococos, salmonelas y virus de la hepatitis, el examen de salud de los manipuladores de alimentos es un enfoque no productivo para el control de enfermedades transmitidas por los alimentos. Las muestras de manipuladores de alimentos se han examinado tradicionalmente solo para detectar unos pocos microorganismos, y tales pruebas no siempre detectan portadores. La prueba de detección no se puede realizar con suficiente frecuencia para que sea eficaz en la detección del estado de portador en personas que están continuamente expuestas al riesgo de contraer patógenos transmitidos por los alimentos. Las pruebas negativas transmiten a los manipuladores de alimentos, gerentes y personal de salud pública el concepto erróneo de que los trabajadores están libres de infecciones y, por lo tanto, son incapaces de transmitir patógenos transmitidos por los alimentos a los alimentos que manipulan. Si bien la transferencia directa de patógenos de los manipuladores de alimentos a los alimentos es un peligro, con mucha más frecuencia las prácticas inadecuadas de manipulación de alimentos crean un peligro que no se evita mediante exámenes de salud.

Programas de educación y formación

Estos programas están dirigidos principalmente a desarrollar y comprender las causas y consecuencias de la contaminación microbiana y las medidas para prevenir la contaminación y el crecimiento posterior. El grado de capacitación que se requiere del personal dentro de las plantas de procesamiento y los establecimientos de servicio de alimentos depende de la complejidad técnica de la operación de alimentos y del nivel de responsabilidad de las personas que se capacitan. El personal de supervisión puede necesitar capacitación en profundidad, mientras que para otros la capacitación puede estar relacionada solo con aspectos específicos de una operación alimentaria. Si bien la educación y la capacitación son partes necesarias de cualquier programa de control de alimentos, por sí solas tienen ciertas limitaciones y deficiencias. La rotación de personal en la industria alimentaria es constante y rápida, por lo que la educación de los trabajadores debe ser continua y no un ejercicio esporádico. Es esencial que el personal de supervisión esté debidamente capacitado con respecto a los peligros asociados con las operaciones de las que son responsables.

Inspección de instalaciones y operaciones

Las inspecciones de instalaciones y operaciones se utilizan comúnmente para evaluar el cumplimiento de las buenas prácticas de manipulación. El Departamento de Agricultura de EE. UU. (USDA) se basa casi por completo en este enfoque en la regulación de las operaciones de carne y aves de corral. El inspector residente observará todas las fases del procesamiento desde el animal vivo hasta el producto terminado. Se confía poco en las pruebas microbiológicas en los programas de control de carne y aves de corral. En sus actividades con respecto a la leche en polvo y el procesamiento de huevo, el USDA se basa no solo en las inspecciones sino también en las pruebas microbiológicas de los productos terminados.

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) también depende en gran medida de las inspecciones de las instalaciones y operaciones. Además, se recogen y analizan muestras de productos terminados y en proceso. Los resultados de dichos análisis se utilizan para corroborar las observaciones realizadas durante las inspecciones; no están destinados a cumplir con la responsabilidad de los procesadores del control microbiológico en el día a día. El programa de inspección de la FDA está diseñado para determinar si los procesadores están operando de conformidad con la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos. Por lo tanto, esta actividad contrasta fuertemente con la de la inspección de carnes y aves de corral del USDA, en la que los inspectores residentes están encargados de asegurar que las plantas cumplan con la Ley Federal de Inspección de Carnes y la Ley de Inspección de Productos de Aves de corral diariamente.

Los procedimientos varían ampliamente a nivel estatal, nacional y municipal, pero el enfoque del control regulatorio es principalmente a través de la inspección periódica de las instalaciones y operaciones.

Al igual que con el enfoque de educación y capacitación para el control de los alimentos, la inspección de las instalaciones y operaciones por sí sola no es suficiente. Por lo general, el inspector se basa en documentos de asesoramiento u obligatorios, como las pautas de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) y los Códigos de Prácticas de Higiene o las leyes, ordenanzas o reglamentos locales de control de alimentos. Desafortunadamente, tales documentos a menudo se refieren a requisitos establecidos sin especificar qué se considera que cumple con los requisitos [2]. Esta falta de especificidad, o la falta de indicación de la importancia relativa de los requisitos, deja la interpretación del cumplimiento únicamente a discreción del inspector. La falta de discriminación entre requisitos importantes y relativamente poco importantes y, por lo tanto, aumentan los costos sin reducir significativamente los peligros. Los requisitos que son críticos para la seguridad del producto pueden pasarse por alto o subestimarse.

²Una excepción notable es la Ordenanza de leche pasteurizada de grado A de USPHS / FDA, en la que para cada requisito se proporciona una declaración que especifica qué constituye el cumplimiento del requisito.

Pruebas Microbiológicas

Las muestras de ingredientes, materiales obtenidos de puntos seleccionados durante el curso del procesamiento o manipulación y productos terminados pueden examinarse microbiológicamente para determinar el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación. En algunos casos, los alimentos se examinan en busca de un patógeno específico o sus toxinas, pero con mayor frecuencia se realizan exámenes para detectar organismos que sean indicativos de la posible presencia de patógenos o deterioro o para detectar la presencia de organismos de deterioro específicos o sus productos. Las pruebas microbiológicas son absolutamente esenciales para el control de ciertos productos, por ejemplo, para asegurar que la leche en polvo, los huevos y los productos de confitería estén libres de peligro de *Salmonella*. Las pruebas son esenciales para asegurar que las materias primas críticas sean satisfactorias para su uso previsto, por ejemplo, para asegurar que el azúcar utilizado en el enlatado cumpla con los estándares establecidos y para asegurar que los productos críticos utilizados en mezclas secas estén libres de *Salmonella*.

Las pruebas microbiológicas tienen graves limitaciones como opción de control. La deficiencia más grave es la limitación de tiempo. La mayoría de los resultados de las pruebas microbiológicas no están disponibles hasta varios días después de la prueba. Por lo tanto, si la aceptabilidad del producto terminado debe medirse mediante pruebas microbiológicas, el producto se mantiene pendiente de los resultados. Con los alimentos perecederos, esto generalmente no es posible; con alimentos estables en almacenamiento, el almacenamiento del producto terminado aumenta los costos. Si se recolectan y analizan muestras en línea, los resultados son de valor retrospectivo ya que el producto terminado ya se ha producido. Otras dificultades están relacionadas con el muestreo (ver capítulo 6), los métodos analíticos (ver capítulos 4 y 5) y el uso de organismos indicadores de patógenos (ver capítulo 5).

Programas Compuestos

Los programas sofisticados de control microbiológico abarcan los tres enfoques, a saber, educación y capacitación, inspecciones de instalaciones y operaciones y pruebas microbiológicas. El énfasis varía de una planta a otra, de un producto a otro y de un establecimiento a otro, al igual que el éxito de los diversos programas de control microbiológico.

El Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP)

El sistema HACCP, presentado por primera vez en la Conferencia Nacional de Protección de Alimentos de 1971 (APHA, 1971), proporciona un enfoque más específico y crítico para el control de peligros microbiológicos que el que se puede lograr mediante los procedimientos tradicionales de inspección y control de calidad. El sistema consiste en: (1) identificación y evaluación de los peligros asociados con el cultivo, cosecha, procesamiento-fabricación, comercialización, preparación y / o uso de una determinada materia prima o producto alimenticio; (2) determinación de puntos críticos de control para controlar cualquier peligro identificable; y (3) establecimiento de procedimientos para monitorear puntos críticos de control. El análisis de los factores a considerar en los análisis de peligros, detallados en el Capítulo 3, conduce al establecimiento de los puntos de control a monitorear. Dependiendo de la situación, el monitoreo puede involucrar inspecciones, mediciones físicas o químicas y / o pruebas microbiológicas.

El sistema HACCP es un enfoque estructurado para el control de la calidad microbiológica. Su clave radica en el significado de "punto crítico de control", que es una ubicación de un proceso que, si no se controla correctamente, podría conducir a la contaminación del producto con patógenos transmitidos por los alimentos o microorganismos de deterioro o su supervivencia o crecimiento inaceptable. Un análisis de peligros cuidadoso conduce a la identificación de puntos críticos de control. Una vez que se han identificado los puntos críticos de control, el problema final consiste en encontrar los medios más eficaces y prácticos para monitorear estos puntos. Si se aplica correctamente, el sistema HACCP separa los aspectos esenciales de los superfluos del control microbiológico. Como se discutió en el Capítulo 10, el uso del sistema HACCP por la industria no solo ofrece al procesador de alimentos un enfoque racional para el control microbiológico, sino que también conduce a una utilización más efectiva y económica de la mano de obra reguladora. El inspector centra la atención inicial en los registros de seguimiento y, si los resultados indican un control satisfactorio de los puntos críticos de control, concluye lógicamente que los esfuerzos podrían dedicarse de manera más eficaz a otras operaciones de procesamiento de alimentos, ya sea con la misma o con otras plantas de procesamiento de alimentos.

El sistema HACCP se ha aplicado con éxito al control microbiológico de alimentos enlatados de baja acidez. De hecho, en los Estados Unidos, el monitoreo de puntos críticos de control en la producción de estos productos está sujeto a regulaciones federales. Muchas organizaciones industriales han adoptado el sistema HACCP como medio de control microbiológico de productos distintos de los alimentos enlatados de baja acidez. El sistema también se ha aplicado al control microbiológico de establecimientos de servicio de alimentación e incluso se ha utilizado en el hogar. Desafortunadamente, las autoridades reguladoras solo han hecho un uso limitado del sistema HACCP. Los impedimentos para su uso más generalizado se analizan en detalle en el Capítulo 10.

El Papel Actual de los Criterios en el Control Microbiológico de los Alimentos

Los criterios microbiológicos de una forma u otra han existido en los Estados Unidos desde principios de este siglo. Las normas microbiológicas más importantes formuladas y aplicadas por las agencias reguladoras federales son las de la leche, el agua, los mariscos y los productos de huevo. Existen otras normas para las aflatoxinas, la toxina escombroides, la toxina paralítica de los mariscos en alimentos específicos y los niveles de acción de defectos para alimentos específicos. La aplicación de estos estándares ha contribuido a mejoras significativas en la seguridad microbiológica y la calidad de estos productos. A nivel federal, no existen estándares microbiológicos formales para otros alimentos. A pesar de esta carencia, las leyes existentes otorgan autoridad suficiente para retirar del mercado productos con condiciones microbiológicas que representan una amenaza para la salud. Por lo tanto, existen estándares microbiológicos "implícitos"³. Incluso en ausencia de una amenaza para la salud, las leyes federales existentes otorgan autoridad suficiente para la incautación de productos si existe evidencia directa o indirecta de que un producto está contaminado con suciedad, por ejemplo, incautación de nueces de árbol contaminadas con *E. coli* e incautación de camarones crudos contaminados con *salmonelas*. En el último caso, la incautación no se basa en un peligro para la salud, sino en la premisa de que la presencia de *salmonelas* es indicativa de insalubridad en el procesamiento del camarón. Las leyes federales también otorgan autoridad suficiente para la incautación de productos por razones estéticas. Si se considerara que las BPM tienen fuerza de ley, podrían otorgar autoridad a la FDA para el uso de criterios microbiológicos en la evaluación de buenas prácticas de fabricación. Sin embargo, con pocas excepciones, las BPM generales son inadecuadas para tales propósitos, ya que carecen de estándares precisos y alcanzables (U.S. v. An Article of Food, 1972).

³ La Sección 402 (a) (1) de la Ley de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (Congreso de los EE. UU., 1980) especifica que se considera adulterado un alimento que contenga o contenga una sustancia venenosa o nociva que pueda causar daños a la salud. Los patógenos o sus toxinas pueden considerarse sustancias nocivas o venenosas, respectivamente. Sin embargo, no se debe tolerar la presencia de ciertos patógenos en cualquier número en un alimento disponible para los consumidores (por ejemplo, *Shigelladysenteriae*, *Vibrio cholera O-1*); la mera presencia de algunos otros no es peligrosa, aunque sí lo sería una gran población de ellos (por ejemplo, *C. perfringens*, *B. cereus*). La sección 402 (a) (1) no hace esta distinción. En consecuencia, los criterios microbiológicos resultan útiles para interpretar esta sección de la ley, ya que especifican el patógeno o la toxina de interés, el método analítico mediante el cual pueden ser detectados, el plan de muestreo para obtener el alimento que se va a analizar y el nivel de población de un patógeno o concentración de toxina que no debe excederse. Sin embargo, en ausencia de tales criterios, los estándares "implícitos" para patógenos existen por la misma naturaleza de la redacción de la Sección 402 (a) (1), y la FDA los ha hecho cumplir cuando a su juicio existe un peligro directo para la salud. es decir, un alimento contiene un agente nocivo que puede volverlo nocivo para la salud. Por lo tanto, los criterios microbiológicos proporcionan un medio para interpretar las disposiciones de 402 (a) (1) en lo que respecta a los patógenos.

Por lo tanto, a nivel federal, aunque se ha hecho un uso limitado de las normas formales, la ley ha otorgado la autoridad adecuada para la incautación de alimentos que se sabe que presentan riesgos para la salud. En el capítulo 8 se presenta una discusión detallada del estado actual de los criterios microbiológicos y sus bases legislativas. Los criterios microbiológicos adoptados por las agencias de salud estatales, del condado y locales también se incluyen en esta revisión. Veinticinco estados tienen criterios microbiológicos, generalmente pautas, para uno o más alimentos (Wehr, 1982).

La FDA ha propuesto recientemente estándares de calidad microbiológica. Estos estándares no pretenden tener ninguna relación con la seguridad. Hasta el momento, ninguno ha sido adoptado. Para un análisis más detallado de los estándares de calidad microbiológica, consulte el Capítulo 2.

Los criterios microbiológicos han sido utilizados por la industria durante mucho tiempo para evaluar la seguridad microbiológica y la calidad de sus productos, para el monitoreo durante el proceso y para la inspección microbiológica de las materias primas. Generalmente, estos criterios se generan internamente y son propietarios, aunque algunas empresas publican los criterios microbiológicos relacionados con sus productos terminados con fines de promoción de ventas. La industria también utiliza criterios microbiológicos en relación con las especificaciones de compra. Estos criterios se incluyen en los contratos de compra entre proveedores y compradores de productos. Existen "estándares" industriales para ciertas materias primas, los mejores ejemplos son los estándares de la Asociación Nacional de Procesadores de Alimentos para bacterias formadoras de esporas en azúcar y almidones y el estándar de la Asociación Nacional de Bebidas Gaseosas para la presencia de levaduras, mohos y bacterias en el azúcar.

Consideraciones en el Establecimiento de Criterios

El establecimiento de un criterio microbiológico significativo no es un proceso simple. En 1964, el Comité de Protección de Alimentos del Consejo Nacional de Investigación propuso tres principios básicos para establecer un criterio microbiológico (NRC, 1964). Estos principios eran que los criterios microbiológicos para los alimentos deberían: (1) lograr lo que pretenden hacer, es decir, disminuir sus peligros en la salud pública (2) ser técnicamente factibles, esto es alcanzable en las condiciones de la práctica comercial de alimentos; y (3) ser administrativamente factible.

Las preguntas difíciles deben responderse antes de poder establecer un criterio microbiológico útil. Por ejemplo, ¿qué alimentos deberían estar sujetos a criterios microbiológicos y sobre qué base? ¿Qué contaminantes deben especificarse (patógenos, organismos indicadores, toxinas, etc.)? ¿Qué límites se deben imponer a la presencia de cada contaminante? ¿Qué tamaño de muestra de cada alimento debe examinarse y con qué método? El análisis más completo de estas cuestiones a nivel internacional lo proporciona la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 1985) y los Principios Generales del Codex para el Establecimiento y Aplicación de Criterios Microbiológicos para los Alimentos (véase el Apéndice B).

El Informe Actual

Este libro es el resultado del examen del Subcomité de Criterios Microbiológicos sobre el valor de los criterios microbiológicos en el control de la calidad e inocuidad de los alimentos. El subcomité trató de poner los usos de los criterios microbiológicos en perspectiva con respecto a su lugar en un programa total para el control microbiológico de alimentos en los Estados Unidos. El libro contiene capítulos sobre el propósito de los criterios microbiológicos y las definiciones de los términos utilizados en relación con ellos, sobre los factores que influyen en la selección de alimentos a ser considerados para los criterios, sobre la selección de microorganismos como componentes de los criterios, sobre la selección de planes de muestreo, y sobre la acción a tomar cuando se excede un criterio. Los alimentos de varios de los principales grupos de productos se identifican como candidatos apropiados para los criterios microbiológicos sobre la base de problemas reconocidos relacionados con la inocuidad y la calidad. Finalmente, los planes de acción son criterios microbiológicos significativos. Las respuestas del subcomité a preguntas específicas planteadas por las agencias patrocinadoras y las recomendaciones generales del subcomité se presentan en secciones dedicadas a esos propósitos.

REFERENCES

- APHA (American Public Health Association) 1971. Proceedings of the 1971 National Conference on Food Protection. Washington, D.C.: U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Food and Drug Administration.
- CDC (Centers for Disease Control) 1981. Foodborne Disease Outbreaks. Annual Summary 1979. Issued April 1981. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) 1985. Microorganisms in Foods. 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. 2nd Ed. In preparation.
- Kautter, D. A. 1964. *Clostridium botulinum* type E in smoked fish. J. Food Sci. 29:843-849.
- NRC (National Research Council) 1964. An Evaluation of Public Health Hazards from Microbiological Contamination of Foods. Food Protection Committee. Washington D.C.: National Academy of Sciences-National Research Council.
- U.S. Congress 1980. Federal Food, Drug and Cosmetic Act, as amended. Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office.
- U.S. v. *An Article of Food* 1972. Pasteurized whole eggs, 339 F. Supp. 131 (N.D. Ga., 1972).
- Wehr, H. M. 1982. Attitudes and policies of governmental agencies on microbial criteria for foods—an update. Food Technol. 36(9):45-54, 92.

Referencia de este documento:

National Research Council (U.S.). Food Protection Committee. Subcommittee on Microbiological Criteria. An evaluation of the role of microbiological criteria for foods and food ingredients. Includes bibliographies and index. ISBN 0-309-03497-3

Chapter 1:Introduction. 41-54.

Anexo C*Bosquejo de artículo para revista indexada.*

Received: May 2021
DOI: 10.1111/1541-2345.12211

CLASSROOM TECHNIQUES**Using Case Studies as Online Teaching Method during COVID-19**

BSE Oscar Castellon

Ph.D. Mayra Marquez

Ph.D. Ana Maier

Universidad Zamorano, apartado postal 93, Km 30 carretera de Tegucigalpa. Email:
oscar.castellon#est.zamorano.edu

Correspondence

Universidad Zamorano, apartado postal 93, Km 30 carretera de Tegucigalpa. Email:
oscar.castellon#est.zamorano.edu

Abstract

Undergraduate's students tend to ask for more assignments based on case studies. This work was made by developing a Food Microbiology module where students were taught the most important microorganisms in foods, how foods work as a growing media, which factors impact the development of microorganisms, food spoilage, harmful microorganisms in foods, sources of contamination, and specific microbiology in water and other foods. Besides the lectures, students were given four readings to complete their learning; they also participated in discussion boards to improve their critical thinking. This methodology was adopted after switching from traditional classes to online classes due to COVID-19. In order to assess the learning outcome, students were assigned a study case about a food outbreak. They had to read the case, discuss with their partners about how the outbreak was made, made further investigations about the outbreak, research about the intrinsic and extrinsic factors of the food involved in the outbreak, learn about the pathology from the microorganism involved in the outbreak and propose a solution to the problem. This assignment raised comments and discussion that made the students develop a better understanding from their lectures and readings. After making conclusions, they wrote a paper with all the information they collected. To conclude the module, each group made a video presentation and included student evaluation. Last, we made comparisons between grades on student's works and test with a t test. We found significant variability on student's grades after adopting this methodology.

Received: May 2021
DOI: 10.1111/1541-2345.12211

Introduction

Improvement and sustainability are major drivers in the design of course materials at Zamorano to move forward in the learning and teaching environment. For this reason, the module of Food Microbiology went through some changes in the material students used this year, in comparison to last year. The purpose of this research was to assess if there was improvement in student's learning in the course of Food Microbiology when comparing the grades of last year student's final assignment and this year student's final assignment. To improve the critical thinking and learning comprehension, students were provided with some major case studies. They had 14 case studies that they had to review in groups to make the final project. Working in groups permitted students to discuss different points of views as the reasons why food outbreaks occurred, which were some of the major factors that played a role in the outbreak and which factors could have controlled the outbreak. In order for students to gain knowledge about the topics, they received the lectures from the class. Nevertheless, they also had four reading that they could use to have a better understanding. Last year students only had access to the reading in English. In order to improve this year's learning, we handed students the reading in English and Spanish. We had to work on the translation and adjustment of the reading so students could have the same learning outcomes regardless of the language they prefer.

The class material was handed, the lectures were given, and the project was assigned. To complete the material handed to this year students of food microbiology we prepared a template/ model of what was expected that they should do in their last project. The project consisted on the reading of a case study related to a food outbreak. After, they had to complete an investigation about how the outbreak occurred, inquiring in which parts of the process could the outbreak occurred. Later, they reviewed how the food they were assigned was a vehicle for the pathogen involved in the outbreak, which are the extrinsic and intrinsic factors of the food and environment where the outbreak occurred, and how could this outbreak been avoided. This paper takes a lot of effort from the students, teamwork, critical thinking and dedication. Most of the papers will cover the information in 20 pages, more or less. After they did all the research the students will have to make a video presentation where they explain the all the information they collected for the paper. The aim of this study was to test if there is a change in the students' learning compared to last year students, by having more resources for the class.

Materials and Methods

Case studies review

A case study is defined as "a particular case of something used or analyzed to illustrate a thesis or principle" (Merriam-Webster Inc, 2004). In this case, the case studies are related to

Received: May 2021
DOI: 10.1111/1541-2345.12211

outbreaks of foodborne diseases. To teach students about how case studies work, they are presented with 16 real situations from which they can choose to carry out their final project. Teaching with case studies can improve food safety skills and behavior (Yiannas, 2008). These case studies were meticulously selected using databases such as the Cambridge Core of the University of Cambridge in England, searched in the Journal of Food Protection which has publications dating back to 1937 (Journal of Food Protection, 2019). Four of the cases that were given to the students come from the database of the Food and Drugs Administration of the United States, five from the Centers for Disease Control and Prevention CDC of the United States. Other databases were ELSEVIER, European Food Safety Authority (EFSA) for the European Union and BMC which is part of Springer Nature, part of Springer publisher. Each of these case studies presents an outbreak of disease in different foods that caused poisonings on different continents. All of these case studies are from recent real events, with dates from 2017, 2019, 2020, and beyond. These include foods such as soy butter, beef, curry powder, cheese, crabmeat, sprouts, infant formulas, and others. Among the microorganisms that affected these foods are: *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Cyclospora*, *Clostridium botulinum* and others.

Review of teaching material and translating

It was considered necessary to complement the hours of classes that students received with some readings and homework. This would allow students to achieve greater skills when starting to make their documents and presentations of the final project. For this, 5 book readings were sought that were relevant and congruent with what is being taught in the Food Microbiology class. The documents that were searched cover the topics of: microbial activity in food, food as a selective environment, control of microorganisms, the hazard analysis system and critical control points (HACCP), intrinsic and extrinsic factors of food that affect the microbial growth, microbial spoilage problems in processed foods, factors that are required for microorganisms to grow, survive, and die. All of these topics were meticulously selected from the best texts that we were able to acquire to present to the students.

All the information collected was in the English language, knowing that some of our students do not have sufficient abilities to understand a reading in English as if it were in Spanish, it was decided to translate the documents. This translation was carried out one document at a time, going from the titles to the references to the translation, keeping the tables and the format. This information was reviewed, and the necessary changes were made. Once the document was free of translation errors, the necessary changes were made to the format so that both documents were identical. A legend was written to each of these documents in the left margin indicating that it is a translation of each document used

Received: May 2021
DOI: 10.1111/1541-2345.12211

for the Food Microbiology class in the food agribusiness Food Science and Technology Department at Zamorano University.

Once the students received the lectures from the classes, they supplemented what they learned weekly with one of the readings for every other week. After the students read the topic, they were given an assignment to achieve a complete understanding of the presented document. This assignment consisted of a summary of the reading which would serve them later when they faced the task of carrying out the final class project. The students' assignments had good quality, demonstrating that they had managed to assimilate the information that was given in the documents in a satisfactory way.

Making of the final project model for the class

To provide the students with a guide on what they are expected to do in their final project, a sample project was carried out with two case studies related to the same microorganisms and food. These case studies were obtained from the Center for Disease Control and Prevention in the United States, in order to use one of the databases that was also used to search for the case studies presented to the students. The purpose of carrying out a sample final class project using two case studies was to be able to demonstrate how this food in two different cases presented a problem to society caused by the same microorganism. To give the students a suitable model of the final project for the class, this paper was elaborated step by step following the instructions that were had to present to the microbiology students this year. The intrinsic and extrinsic parameters, the flow diagram, the safety of the product was given by listing the pathogens of interest, the food outbreak that occurred was described, the sources and mechanisms of contamination were determined, control mechanisms were given and they were provided regulations for this food in different countries. This assignment is expected to be written by students in approximately 20 pages, more or less, and is expected to exceed the minimum expectations which are presented in the model assignment. It should be noted that the model assignment serves to guide students, however, it is expected that the work they produce will be of higher quality. They are also presented as their video should be along with the slide show for this project so they can do better work with their teams. This group project will have a lot of discussion among the students, who will give their points of view according to what they have learned in class, what they read and what they investigated. Each student is expected to achieve the skills to find the intrinsic and extrinsic parameters of the product, describe a flow diagram of the food product associated with their case, describe the safety of the product, and list the pathogens of interest. In addition, they should look for a reason why the contamination occurred, thus identifying the sources and mechanisms of contamination, discuss how intrinsic and extrinsic factors can provide or control the growth of spoilage microorganisms, and suggest control mechanisms. To complete their training and to be able to relate this to each of their countries, students must

Received: May 2021
DOI: 10.1111/1541-2345.12211

investigate the regulations according to the elaboration norms and microbiological criteria for their assigned foods.

Results and Discussion

Identify case studies that are relevant to food microbiology training

With these case studies, the students were able to relate different microorganisms with different foods; they were also able to see certain pathologies that are related to these microorganisms by being able to carry out a final project for the class. Students were expected to learn to associate foodborne illness outbreaks with specific causes. Many outbreaks are the result of post-process contamination or poor personal hygiene, which can be prevented by ensuring that the workforce has appropriate behavior and attitude (Chapman et al, 2010). The causes are different in each of these cases; however, it was expected that the students would be able to do work where they identified and that was the case.

The system of learning through projects gives the opportunity to take into account that each student learns, thinks and processes information in different ways (Davis, 1993). For this reason, when students discuss among themselves they will achieve better critical thinking by making each other reason about the points that will be highlighted in the project. In the same way, it is hoped that this will make the students broaden their knowledge of the subjects and achieve a better-quality assignment. It is hoped that this project will simulate how students as future food technologists can track the reason for the food outbreak and can provide a solution as a group, in the way they would if they were already in a company in the labor sector. Project teaching assists the student to apply skills learned in class to real situations outside of class by putting the student in a situation similar to what they would find in real life (Fruger 2003).

In order to evaluate the change that the students of this class had before and after receiving the case studies as a way of learning, we decided to measure the marks of exams 1 and 2 of these. The marks from the first exam represent the grades the students were getting before they started reading case studies. The second exam marks show the students' marks after they have managed to read all the case studies and have discussed them with their peers. To measure we used the SAS program where we perform a t-test with dependent samples. The reason for making dependent samples in this measurement was that we are comparing the grades of the same students, but at different times, thus having the same numbers of samples, within the same population. We were able to observe how there is a standard deviation of 10.90 points between one exam and the other, with the exam having two higher

Received: May 2021
DOI: 10.1111/1541-2345.12211

marks. When performing the probability analysis, we find that it is well below our error of 5%, making us reject the null hypothesis and being able to accept the alternate one. The test results appears in Table 1.

Table 1. Average results of the difference in qualification of test 1 and test 2 of the class 2022..

Class 2022	Mean \pm S.D
Test 1 vs Test 2	12.1622 \pm 10.7996
Pr> t	<0.0001

Achieve the design of activities to complement the teaching of the subject while preparing students for their case study.

Review and translation of teaching materials

In order to measure and verify an existence of change in learning of the subject by the students, it was decided to make a comparison of exam 2 presented by the students of this course with exam 2 presented by the students of the previous year. Both classes received quality talks, with the difference being the integration of more didactic material in the students this year. There were 4 readings that were translated from English to Spanish to provide the students with the complement of their training. The first reading was from Konarchi's book, Chapter 5, which covered topics about the factors that are required for microorganisms to grow, survive, and die. This reading was important for the training of the students since it gave them knowledge about the extrinsic and intrinsic factors of food, they learned about the groups of microorganisms that are important in the food industry. They were also able to learn about the characteristic way bacteria grow by reading about the adaptation, lag, log, stationary and death phases. They learned about intrinsic factors such as the amount of biologically available water, the oxidation / reduction potential of the food, its pH and the type of acid present. With this reading, they also managed to read about extrinsic factors such as temperature and learn about high pressure treatments, pulsed electric fields, pulsed light, x-rays, ultraviolet light, and drying. Concepts were presented here, as a concept of obstacles: "The ability of intrinsic and extrinsic factors to affect the ability of microorganisms to survive or grow has been used to promote safety and delay deterioration" (Konarcki, J.L e.d).

The second reading is from the same Konarchi book, this reading analyzes processes of microbial spoilage in common foods. Likewise, it addresses the isolation and identification of decomposition organisms, closing with case studies as examples. The foods and their spoilage microorganisms addressed in this reading are: spoilage of processed meat, poultry, and fish, spoilage of dairy products, spoilage of beverages, spoilage of bakery products,

Received: May 2021
DOI: 10.1111/1541-2345.12211

spoilage of canned foods, and spoilage of fruits and confectionery products. This reading is useful for students by having a place to quickly consult or guide themselves when starting to work on the case studies they have been assigned. The third translated document deals with intrinsic and extrinsic factors that affect microbial growth, going deeper than the first reading, but always covering related topics. In this, the effects of intrinsic and extrinsic parameters are discussed. The intrinsic parameters include pH, moisture content, oxidation-reduction potential, nutrient content, antimicrobial constituents, and biological structures. The effect that each of these parameters has on microorganisms and how the combination of one or more of these parameters affects the growth of microorganisms is covered. The extrinsic parameters talk about the storage temperature, the relative humidity of the environment, the presence and contraction of gases, and the presence and activity of other microorganisms. This reading works a lot for students since one of the specific competencies in the case study project measures their ability to relate the intrinsic and extrinsic factors of their food to the bacteria that are related to the food outbreak. In addition, it is vitally important that students be able to relate different microorganisms with food by seeing it from the characteristics of each food, being able to relate the microorganisms capable of attacking each food.

The last reading was written by the international commission on microbiological specifications for food. This lecture covers historical topics on microorganisms in food, foods as selective environments, the micro flora of processed foods, the control of microorganisms in foods, education and training programs, and the HACCP control system. This reading enriches the student by providing a broader understanding of the approach that an engineer should take to an industry that is processing food. It covers important topics in a general way, giving the student a general idea of the aspects that must be taken into account when starting a processed food production. The topics covered in this reading are of great importance to this course as they are all covered in the case study project. To carry out the review and find if there was any significant change in the notes, the SAS program was used, where a t-test was performed, with independent sample types. The reason why the independent sample type was used is because no student was in both groups, having data from unique people in each year to be evaluated. When carrying out an analysis of the variances, we were able to see that since our probability is above 5%, we can assume that the variances are equal. By analyzing the data with equal variances, we can see that the probability is well below our 5% error, thus being able to reject the null hypothesis and accept the alternative hypothesis, which dictates that there is a significant difference between the students' scores. of this year against the students of the previous course. These values are shown in Table 2.

Table 2. Average results of test 2 score for class 2021 and class 2022

Received: May 2021
DOI: 10.1111/1541-2345.12211

Test 2	Mean \pm S.D
Class 2021	63.5938 \pm 9.4327
Class 2022	78.4054 \pm 9.9944
Pr> t	<0.0001

Class project review

When reviewing the assignment, it was possible to see that the students were able to do part of what was expect without much problem, they worked as a team and were able to determine the causes of the outbreaks in most cases. The students produced high-quality assignments, only some made the mistake of not italicizing the scientific names. Scientific names are in Latin and not in Spanish or English, which are the universally used writing languages (Cruz, 2014). Using Latin for scientific names helps us in scientific society to ensure that we speak a universal language when referring to microorganisms and that are no variations when wanting to translate from one language to another. However, this may have been an error of the students since they could not have noticed instead of wanting to tell us that they could not understand why the names are italicized. When we made a comparison of the assignments of the last class with the results of this class, we obtained significant changes in only one area. The area where there was significant change covered the competence of knowing the regulations required for the manufacture and sale of the product, as well as official methods for the microbiological analysis of the product. Students in Class 2022 were able to improve significantly their skills and abilities in this competition.

Table 3. Average results of the qualification of the competences in the final project of the class 2021 and class 2022.

Objetives	Class 2021	Class 2022	Pr> t
	Mean \pm S.D	Mean \pm S.D	
Competence 1: Discuss the role and importance of adaptation and environmental factors in the growth and inactivation of microorganisms in various environments.	5 \pm 0	4.93 \pm 0.2500	0.3332

Received: May 2021
DOI: 10.1111/1541-2345.12211

Competence 2: Identify the sanitary conditions and practices in which food contamination can be controlled.	5±0	4.93±0.2500	0.3332
Competence 3: Identify the main beneficial, pathogenic and spoilage microorganisms of interest in food and the conditions under which they grow.	4.62 ± 0.8062	4.50± 0.8165	0.6661
Competence 4: Identify the main related pathogens in food and describe the conditions under which the pathogens of interest in food are destroyed or controlled.	4.87±0.5000	4.93±0.2500	0.6591
Competence 5: Description of the ATS outbreak. It includes numbers of cases, incubation period, sources and mechanisms of contamination, factors influencing spread, pathogen control measures, history of seizures, cost of the outbreak, and consequences of the outbreak.	5±0	5 ±0	
Competence 6: Know government regulations required for the manufacture and sale of the product, as well as official methods for the microbiological analysis of the products.	4.31±0.8732	5±0	0.0066

Conclusions

This study provided an insight in the effectiveness of learning food microbiology with case studies and additional reading can make a difference on the outcomes of students. The use of this methodology can improve the students' grades and understanding of the subject. The

Received: May 2021
DOI: 10.1111/1541-2345.12211

class environment obtained after the students reviewed the case studies were significant, making the classroom a more vivid place to learn and teach.

References

- Chapman B, Eversley T, Fillion K, MacLaurin T, Powell D. 2010. Assessment of food safety practices of food service food handlers (risk assessment data): testing a communication intervention (evaluation of tools). *J Food Protect* 73(6): 1101– 7.
- Cruz, F. 2014. Why are scientific names italicized? Available online: <https://mnh.uplb.edu.ph/14-content/news/133-why-are-scientific-names-italicised#:~:text=Going%20back%20to%20the%20question,writing%20language%2C%22%20Lit%20explained.>
- Furger, R. 2003. Urban academy: Where testing is anything but standard. *EduTopia*. [On-line]. Available from: <http://glef.org>.
- Journal of Food Protection (2019): Basic Journal Info. Available online at <https://www.foodprotection.org/publications/journal-of-food-protection/#:~:text=First%20published%20in%201937%2C%20the,journal%20dedicated%20to%20food%20safety.>, checked on 4/6/2020.
- Kornack, J.L (ed.) *Principios de resolución de Problemas Microbiológicos en la Industria Entorno de Procesamiento de Alimentos, Microbiología Alimentaria y Seguridad Alimentaria*, Capitulo 3. DOI 10.1007/978-1-4419-5518-0_5, ©Springer Science+ Business Media, LLC 201
- Merriam–Webster Inc. 2004. Merriam–Webster's collegiate dictionary. Available from: <http://www.merriam-webster.com>. Accessed 2015 Aug 10.
- Yiannas F. 2008. *Food safety culture: creating a behavior–based food safety management system*. New York: Springer Science & Business Media.