

MICROORGANISMOS ALTERANTES DE ALIMENTOS

Bqca. Silvina Farrando

INTRODUCCIÓN

Los **microorganismos** se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, adaptados a ambientes muy diversos, no se encuentran aislados sino que conformando agrupaciones que interactúan entre sí, en las que podemos encontrar bacterias (células procariontes), algas, protozoos y hongos microscópicos (células eucariotas). Se hallan distribuidos sobre superficies animadas como plantas, frutos, animales y sobre sustratos inanimados, también en el aire, en el agua, etc., llegando desde estos hábitats a los alimentos.

Los **alimentos** definidos como “toda sustancia o mezcla de sustancias naturales o elaboradas que ingeridas por el hombre aporten a su organismo los materiales y la energía necesarios para el desarrollo de sus procesos biológicos”, pueden ser utilizados al igual que nosotros, por los microorganismos aprovechando para su crecimiento los nutrientes presentes.

Si las condiciones ambientales son favorables los microorganismos presentes en el alimento pueden desarrollarse y como producto de su metabolismo cambiar las características organolépticas del producto, estos son llamados **microorganismos alterantes**; por ejemplo bacterias acéticas en vinos dulces, bacterias peptonolíticas que atacan frutas y hortalizas, hongos que desarrollan en alimentos de bajo contenido de humedad.

A diferencia de éstos, los **microorganismos patógenos** son aquellos que utilizan el alimento como vehículo para producir enfermedad, ya que por sus factores de virulencia o por productos de su metabolismo afectan la salud del consumidor; por ejemplo *Campylobacter* y *Salmonella*, así como la cepa O157:H7 de la enterobacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* y *Listeria monocytogenes* son los agentes causales de Enfermedades transmitidas por alimentos más frecuentes en la mayoría de los países de Europa y América. Sin embargo generalmente éstos no alteran las características organolépticas del producto.

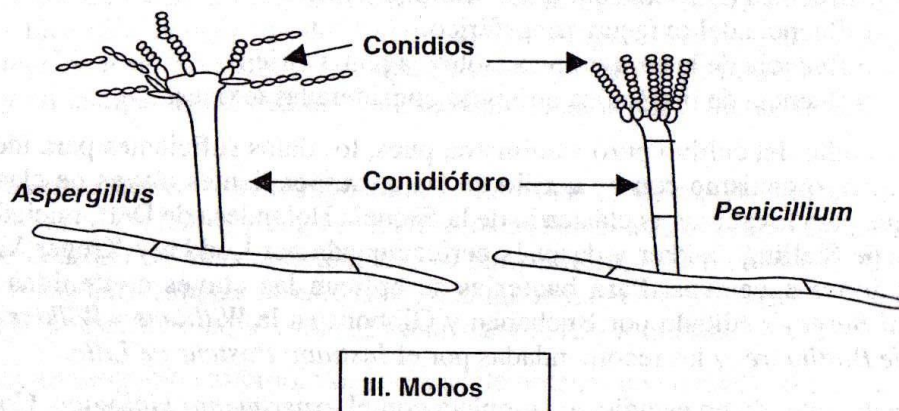
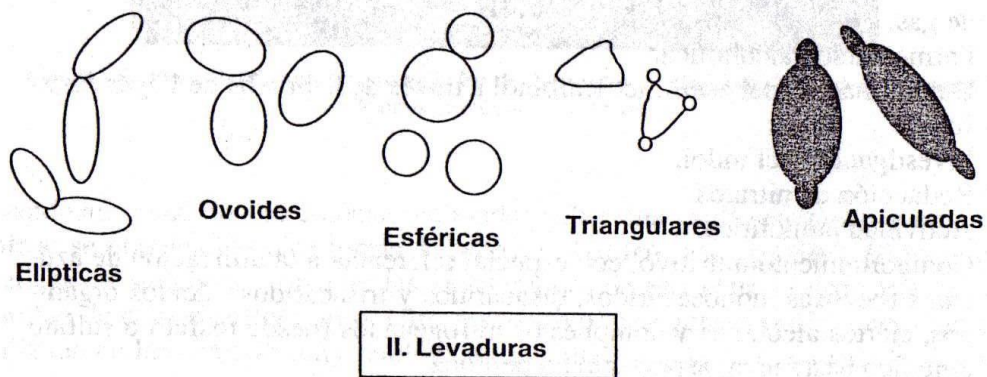
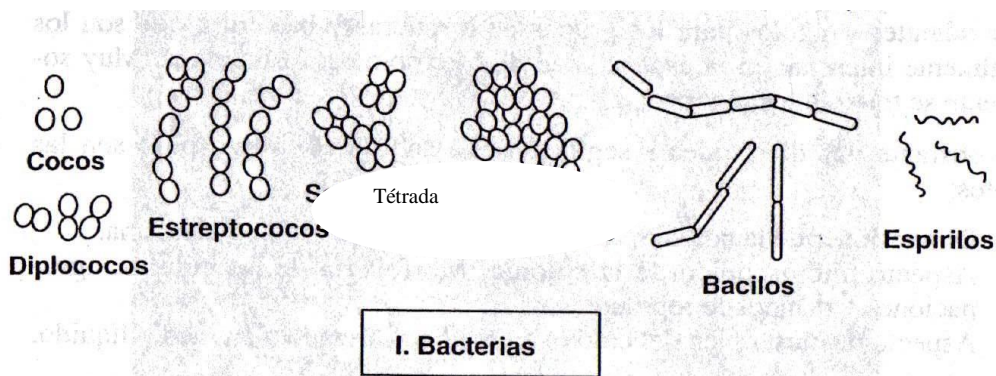
Otro grupo importante de microorganismos son los **industriales** que son empleados a diario en la elaboración de alimentos, tales como bacterias lácticas en la elaboración de yogurt, levaduras en la elaboración de pan y bebidas alcohólicas, hongos en la elaboración de quesos, etc.

Las **bacterias** son microorganismos unicelulares, presentan morfología y tamaño variado, siendo las morfologías más frecuentes las esféricas denominadas cocos, bastoncitos denominados bacilos; pero también se encuentran otras formas como bacilos helicoidales espirilos, forma de estrella, con apéndices, etc. Pueden encontrarse solas (aisladas), agrupadas de a dos (diplococo o diplobacilo) o varias unidas (en cadena). El tamaño oscila

de 0,5 a 1 μm de ancho por 1 a 5 μm de largo, algunos bastones son muy cortos y se denominan cocobacilos.

Los hongos incluyen levaduras y mohos. Las **levaduras** son hongos unicelulares que pueden presentar morfología esférica, globosa, ovoide, elongada, cilíndrica, apiculada, ojival, de botella, triangular, de 2 a 3 μm de ancho por 1 a 10 μm de largo, pudiendo tener algunas especies hasta 20 a 50 μm de largo. Se reproducen asexualmente por gemación, fisión binaria o fragmentación. Algunas levaduras forman cadenas, denominadas pseudohifas y la agregación de varias de ellas se conoce como pseudomicelio.

Los **hongos** son multicelulares forman un entramado de filamentos denominados hifas, estructuras cilíndricas, tabicadas o no, generalmente multinucleadas, las que crecen sobre un sustrato y forman ovillos denominados micelio que pueden observarse a simple vista.



OBJETIVOS

- Aislar microorganismos alterantes de alimentos y presentes en el ambiente.
- Describir las características culturales de los microorganismos aislados.
- Adquirir destreza en técnicas básicas de observación al microscopio óptico.
- Ejercitar una herramienta sencilla utilizada en el inicio de la identificación bacteriana.

ACTIVIDADES

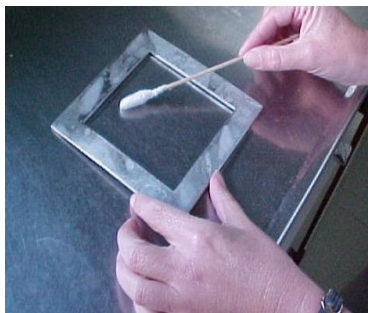
I. Detección de microorganismos ambientales

- a. *Aislamiento de microorganismos de alimentos alterados*: el objeto es esparcir los microorganismos presentes en la muestra en el medio de cultivo a fin de obtener colonias separadas cuyos individuos procedan por división de una única célula. Hay varias técnicas de aislamiento, la más fácil de realizar es la siembra por estrías en paralelo.



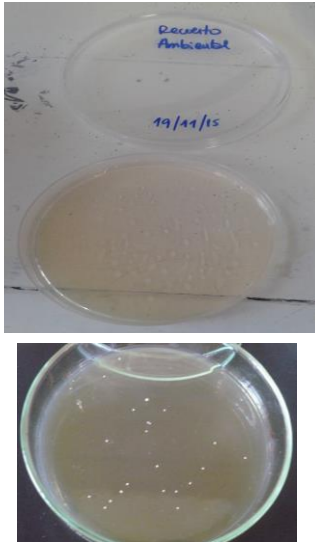
1. Con el ansa acodada previamente flameada tomar muestra de la zona del alimento afectada.
2. Sembrar en una caja de Petri con el medio de cultivo adecuado, abriendo la caja apenas lo necesario, cerca del mechero.
3. Realizar 5 o 6 trazos paralelos en la superficie del medio apoyando toda la superficie acodada en su longitud. El asa queda cada vez más empobrecida en microorganismos y luego de la incubación se formarán colonias separadas por lo menos en el último trazo.
4. Llevar a incubar, con la tapa hacia abajo, para evitar la desecación del medio, el tiempo y a la temperatura conveniente.

- b. *Aislamiento de microorganismos de superficies*: una de las metodologías más sencillas es el empleo de hisopos o esponjas estériles que permiten arrastrar los microorganismos de una determinada área.



1. Colocar la plantilla, por ej. 10cm x 10cm, sobre la superficie a muestrear.
2. Humedecer el hisopo en la solución diluyente y presionar ligeramente en la pared del tubo con un movimiento de rotación para quitar el exceso.
3. Frotar en direcciones opuestas.
4. Sembrar la caja de Petri y llevar a incubar.

c. *Detección de microorganismos del aire*: existen diversas técnicas para evaluar la carga microbiana de un ambiente, la más sencilla es la técnica de sedimentación. Consiste en abrir una placa de Petri con medio nutritivo durante un periodo determinado de tiempo y luego de incubarlo un tiempo y a una temperatura adecuada, realizar el recuento de las unidades formadoras de colonias.

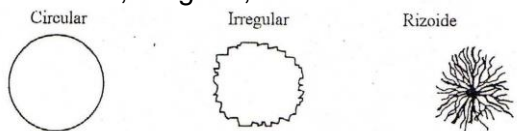


1. Abrir la caja de Petri con el medio de cultivo adecuado en un lugar definido.
2. Dejar 15 minutos y tapar.
3. Llevar a incubar, con la tapa hacia abajo, para evitar la desecación del medio, el tiempo y a la temperatura conveniente.

II. Estudio de los caracteres culturales

Las características culturales son la descripción de las colonias sobre el medio de cultivo sólido. Incluye:

Forma: circular, irregular, rizoide

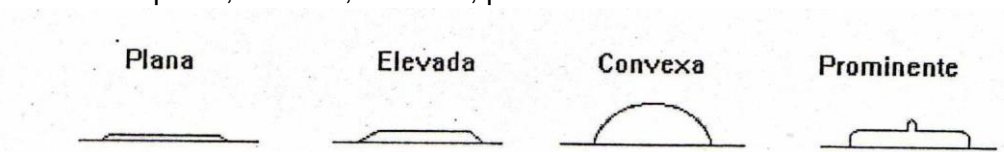


Tamaño: diámetro en milímetros. Si es menor a 1 mm se anota puntiforme

Cromogénesis: coloración de la colonia por producción de pigmento

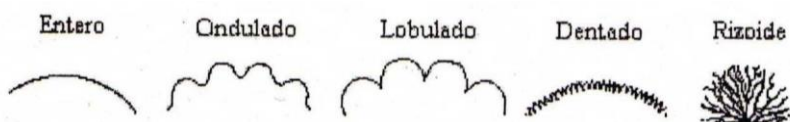
Opacidad: transparente, translúcida, opaca

Elevación: plana, elevada, convexa, prominente



Superficie: lisa, rugosa, mate, brillante

Borde: entero, ondulado, lobulado, dentado, rizoide



Consistencia: mantecosa, viscosa

1. A partir de las colonias aisladas en el punto anterior, elegir al menos 3 y describir sus características culturales.

III. Observación directa

La observación de las células microbianas se realiza con la ayuda de un microscopio aplicando técnicas adecuadas. La observación al microscopio óptico **directa** o en fresco tiene la ventaja de no alterar la morfología celular y puede realizarse entre porta y cubre o por Tinción negativa. Permiten describir las características morfológicas, es decir la forma de las células de un cultivo joven (24 horas). Además puede utilizarse para constatar la existencia y diversidad de microorganismos en un determinado ambiente y determinar si un microorganismo es móvil (sólo entre porta y cubre). La observación directa al microscopio de una muestra procedente de un ambiente natural muestra una gran diversidad microbiana, cuya composición y número depende de las condiciones de dicho ambiente (pH, nutrientes, agua, temperatura, etc.).

a. Entre porta y cubre

Previamente limpiar y desengrasar porta objetos friccionando con algodón impregnado en alcohol y dejar secar.

1. Realizar la suspensión microbiana a partir de una colonia de la caja de Petri sembrada, agregarla a un tubo con agua estéril. En el caso de tener una muestra ambiental diluir con agua estéril para lograr una suspensión.
2. Tomar un ansa de la suspensión microbiana y agregarla al porta.
3. Colocar el cubre objeto.
4. Observar con un objetivo de 40 X.

b. Tinción negativa

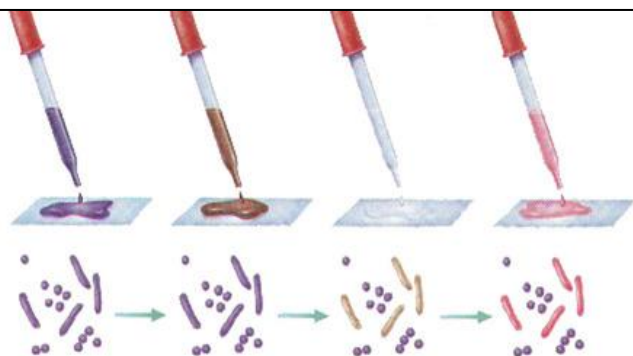
1. Tomar un ansa de la suspensión microbiana y agregarla al porta.
2. Agregar una gotita de nigrosina en un extremo.
3. Con el anza mezclar y extender, hasta color gris oscuro.
4. Dejar secar al aire.
5. Observar con objetivo de inmersión (100X) con una gotita de aceite de inmersión sobre el frotis seco.

IV. Tinción de Gram

La **tinción de Gram** se realiza sólo para bacterias y permite una primera clasificación en Gram positivas o negativas según la composición de su pared celular. En la coloración de Gram se forma un complejo insoluble en agua cristal violeta-iodo en el interior de la pared; este complejo es extraído con alcohol, en el cual es soluble, de las bacterias Gram negativas quedando incoloras, pero no de las Gram positivas que quedan de color violeta. Las bacterias Gram positivas tienen en su pared celular un polisacárido (peptidoglicano) muy grueso que impide la salida del complejo insoluble cristal violeta-iodo, coloreándose de violetas. A diferencia de la pared de las células Gram negativas donde el peptidoglicano es muy delgado y la pared es predominante lipídica y permite la salida del complejo por lo que quedan incoloras y con la safranina, se colorean de rosado.



1. Flamear el ansa
2. Colocar una gota de suspensión en el porta-objeto
3. Hacer el extendido o frotis
4. Dejar secar sobre la mesa
5. Fijar pasándolo sobre la llama 4 o 5 veces, sosteniéndolo con pinza
6. Colorear con cristal violeta (1min), lavar con agua corriente por unos segundos
7. Agregar solución de lugol (1-2 min), lavar
8. Decolorar con alcohol etílico (30 seg.), lavar
9. Colorear con safranina (30seg), lavar con agua, secar y observar con objetivo de inmersión con una gota aceite de inmersión.



RESULTADOS

I. Detección de microorganismos ambientales

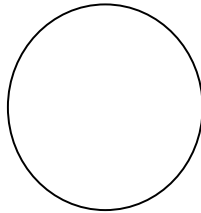
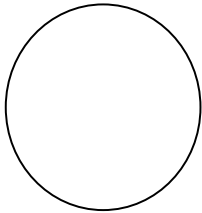
- a. *Aislamiento de microorganismos de alimentos alterados*: registrar y dibujar lo observado en las cajas de Petri.
- b. *Aislamiento de microorganismos de superficies*: registrar y dibujar lo observado en las cajas de Petri.
- c. *Detección de microorganismos del aire*: registrar y dibujar lo observado en las cajas de Petri. Expresar el resultado contando en número de ufc y dividiendo por el tiempo de exposición.

II. Estudio de los caracteres culturales: registrar según los resultados

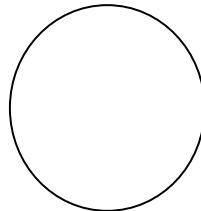
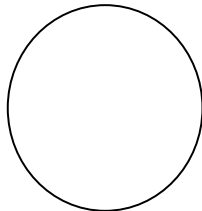
	Forma	Tamaño	Color	Elevación	Superficie	Opacidad	Consistencia
Colonia							
Colonia							
Colonia							

III. Observación directa

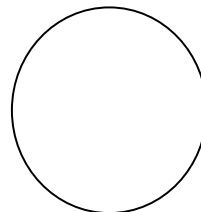
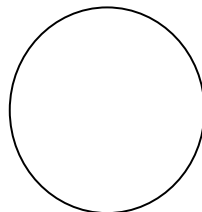
a. *Entre porta y cubre:* dibujar lo observado con el objetivo 40 X



b. *Tinción negativa:* dibujar lo observado con el objetivo 100 X



IV. Tinción de Gram: dibujar lo observado con el objetivo 100 X



MEDIOS Y COLORANTES UTILIZADOS

Cajas de Petri con Agar recuento total (g/l)

Extracto de levadura	2,5
Glucosa	1
Tripteína	5
Agar – agar	15
Agua destilada	1 L

Solución de oxalato de amonio-cristal violeta

Solución A

Cristal violeta (85% de colorante)..... 2 g
Alcohol etílico (95%)..... 20 ml
Solución B
Oxalato de amonio..... 0,8 g
Agua destilada..... 80 ml
Mezclar A y B.

Solución de Lugol

Iodo..... 1 g
Ioduro de potasio..... 2 g
Agua destilada..... 300 ml

Safranina

Safranina O (2,5% solución alcohólica de 95%)..... 10 ml
Agua destilada..... 100 ml

Nigrosina 10% (saturada)

Nigrosina..... 10 g
Agua destilada..... 100 ml