

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



**DETERMINACION DE LA BIOCONSERVACION DE QUESOS FRESCOS DE
METAPAN, UTILIZANDO UNA CEPA PROBIOTICA *Lactobacillus rhamnosus*
HOWARU™ FRENTE A *Listeria monocytogenes* ATCC 19118**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

JANETH CONCEPCION MARTINEZ LOZANO

MARIA FERNANDA TRUJILLO SIFONTES

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

JUNIO 2017

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO CRISTOBAL HERNAN RIOS BENITEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL EVALUADOR

**COORDINADORA DEL AREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS
FARMACEUTICOS Y COSMETICOS**

Lic. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

COORDINADORA DE GESTION AMBIENTAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

DOCENTE ASESORA

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

AGRADECIMIENTOS

Infinitamente agradezco a Dios todopoderoso por la bendición de estudiar y darme salud, fortaleza, paciencia y sabiduría para alcanzar todas las metas en este caminar de la vida, porque desde pequeña me acoges con ternura, con tu amor. ¡Gracias Dios por todo!

Agradezco a mi mamá por ser ese apoyo incondicional en mi vida, por ser mi ejemplo de superación y de amor. Te amo mami. A mi papá por ser ese papá que me ha enseñado la sencillez y la nobleza con los pobres y más desdichados y que a pesar de todo has sido un apoyo en mi formación profesional, mil gracias. Agradezco a mis hermanos que me aman y me apoyan.

A mi abuela por sus oraciones y su amor incondicional que me ha brindado a lo largo de mi vida. A mis tíos, tías y toda la familia que ha estado pendiente de que conchy siga adelante, brindándome siempre sus consejos y palabras de aliento.

Agradezco a mi novio que ha sido un apoyo grande para mí, me has brindado tu amor y tus consejos para ayudarme en este trayecto, siempre tienes esa paciencia y palabras para mí en todo momento. ¡Te amo!

Te agradezco mi amiga y compañera Fer por tu amistad, paciencia, cariño y por tu dedicación indiscutible en cada paso de este proyecto y nuestros días en la U. Mantén tu esencia ¡Eres grande! ¡Te quiero mucho!

Agradezco a nuestra docente asesora por su dedicación, compartir sus conocimientos, su tiempo y entrega, de la misma manera agradecer al jurado calificador por sus aportes a esta investigación.

Agradezco a los compañeros y personal de CENSALUD, en especial a MSc. Amy Morán y Zoilita por su apoyo y colaboración tan grande.

Y finalmente agradecerles a todos los amigos y compañeros que he tenido en la Universidad, en el diplomado y en toda mi vida, a los docentes de la facultad que estuvieron con su apoyo enseñándome y formándome en esta profesión.

Janeth Concepción Martínez Lozano

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi Padre Celestial y mi Virgencita María bajo la advocación de la Medalla Milagrosa por ser mi guía y mi fortaleza durante todos los años de mi estudio académico.

De manera especial agradezco a mi padre por ser mi apoyo en todo momento, por su comprensión, paciencia y dedicación que tuvo conmigo desde que inicie mi formación académica, le agradezco ser mi inspiración de constancia, determinación, disciplina y confianza en Dios durante todo los años de mi vida. A mi madre por sus cuidados, atenciones y consejos que me ayudaron a no desfallecer en los momentos difíciles.

A mi madrina por ser un ángel en mi vida y apoyarme en cada una de las etapas de mi vida siendo muchas veces una amiga, hermana y madre con sus consejos y detalles hacia mí.

Agradezco a mi hermano, mi cuñada y mi sobrinita que amo con todo mi corazón por su comprensión cuando llegaba muy cansada a casa cada fin de semana.

A mi asesora de tesis por todo el conocimiento transmitido durante estos últimos años de mi carrera y cada una de las oportunidades que me brindó para seguir creciendo profesionalmente.

A mi compañera y amiga de tesis por el apoyo y disposición que mostró durante todo el proceso, por sus consejos y cada una de los detalles que me motivaron a seguir adelante a pesar de las adversidades. Lo logramos amiga. Sé más rápida. Te quiero mucho.

A mi mejor amigo por animarme cada día con sus ocurrencias y locuras, agradezco a la vida haberte conocido y que fueras mi motivación para terminar este proyecto.

Agradezco a CENSALUD por la oportunidad de terminar mi servicio social y permitirme realizar la parte experimental de la investigación, especialmente a MSc. Amy Morán por sus consejos y sugerencias para realizar el trabajo y a Zoilita por ser una gran amiga y apoyo para mi compañera y para mí durante todo el proceso.

María Fernanda Trujillo Sifontes

DEDICATORIA

Le dedicamos este triunfo a Dios por bendecirnos siempre a lo largo de nuestra formación académica y espiritual.

A nuestros padres por darnos la vida y brindarnos su amor y apoyo incondicional en todo momento.

A todos nuestros demás familiares y amigos por sus consejos, ayuda y cariño que sirvieron de motivación para finalizar esta etapa en nuestras vidas.

A nuestros docentes asesores, jurados y demás maestros de los cuales recibimos conocimiento y sabiduría para desempeñarnos profesionalmente en nuestro ámbito.

Janeth Lozano y Fernanda Trujillo

INDICE GENERAL

	Pág. N°
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xxvi
Capítulo II	
2.0 Objetivos	28
Capitulo III	
3.0 Marco Teórico	31
3.1 Generalidades del queso	31
3.2 Queso fresco	31
3.3 Composición del queso fresco	32
3.4 Bioconservación de alimentos	32
3.5 Bioconservación de productos lácteos	33
3.6 Bacterias probióticas	34
3.7 Criterios para un probiótico	35
3.8 Mecanismo de acción de los probióticos	35
3.9 Género y especies de bacterias probióticos	36
3.9.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	36
3.10 <i>Listeria monocytogenes</i>	37
3.10.1 Taxonomía	37
3.10.2 Hábitat	38

3.10.3	Patogenicidad de <i>Listeria monocytogenes</i>	39
3.10.4	Población susceptible	40
3.10.5	Dosis infectante	41
3.10.6	Período de incubación	41
3.10.7	Síntomas	41
3.10.8	Características de crecimiento y de supervivencia de <i>Listeria monocytogenes</i>	43
3.10.9	Prevalencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en algunos alimentos.	46
3.10.10	Prevención y control	50

Capítulo IV

4.0	Diseño Metodológico	57
4.1	Tipo de estudio	57
4.2	Investigación bibliográfica	58
4.3	Investigación de campo	58
4.3.1	Universo	58
4.3.2	Muestra	58
4.4	Instrumento de medición	59
4.5	Identificación de la muestra	59
4.6	Transporte de la muestra	60
4.7	Parte de experimental	60
4.7.1	Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118	61

4.7.1.1 Pruebas API para la identificación de <i>Listeria</i>	61
4.7.1.2 Tinción gram de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118	64
4.7.1.3 Prueba de la catalasa	64
4.7.1.4 Prueba de Henry	65
4.7.1.5 Prueba de Camp	65
4.7.1.6 Singlepath® <i>Listeria monocytogenes</i>	65
4.7.1.7 Conservación de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118	67
4.7.2 Identificación de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> HOWARU™	67
4.7.2.1 Tinción gram de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> HOWARU™	68
4.7.3 Criterios Microbiológicos	68
4.7.3.1 Recuento de <i>Escherichia coli</i>	68
4.7.3.2 Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	69
4.7.3.3 Determinación de <i>Salmonella spp</i>	70
4.7.3.4 Determinación de <i>Listeria moncytogenes</i>	73
4.7.4 Estandarización de la bacteria patógena <i>Listeria moncytogenes</i> ATCC 19118	74
4.7.5 Estandarización de la bacteria probiótica <i>Lactobacillus rhamnosus</i> HOWARU™	75
4.7.6 Primer ensayo de Bioconservación <i>Lactobacillus rhamnosus</i> HOWARU™ 10 ⁶ UFC/g frente a <i>Listeria monocytigenes</i>	76
4.7.6.1 Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118	76
4.7.6.2 Recuento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> HOWARU™	78

4.7.7 Segundo ensayo de Bioconservación <i>Lactobacillus rhamnosus</i> HOWARU™ 10 ⁶ UFC/g frente a <i>Listeria monocytigenes</i> ATCC 19118	79
4.7.7.1 Recuento de <i>Listeria monocytigenes</i> ATCC 19118	79
4.7.7.2 Recuento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> HOWARU™	80
4.7.8 Determinación de pH	81
4.7.9 Determinación de color	83
4.7.10 Determinación de olor de la muestra	84
4.7.11 Determinación de la vida de anaquel de los quesos frescos	85
Capítulo V	
5.0 Resultados y discusión de resultados	87
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	114
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	117
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

- 1 Municipio de Metapán departamento de Santa Ana
- 2 Lista de Cheque de Buenas Prácticas Higiénicas adecuadas según el manual de Buenas Prácticas de Manufactura.
- 3 Etiqueta de identificación de muestra.
- 4 Esquema del transporte de muestra
- 5 Flujograma de parte experimental
- 6 Identificación de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 Pruebas API
- 7 Hoja de resultado para API
- 8 Procedimiento para realizar la tinción de Gram de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118
- 9 Prueba de la catalasa para *Listeria monocytogenes* ATCC 19118
- 10 Prueba de Henry
- 11 Prueba de Camp
- 12 Siglepath® de *Listeria monocytogenes*
- 13 Conservación de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118
- 14 Tinción Gram de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™

- 15 Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 para el 1.0 grupo de alimento: leche y Productos Lácteos; 1.9 subgrupo del alimento: quesos frescos, no madurados y requesón.
- 16 Recuento de *Escherichia coli*
- 17 Recuento de *Staphylococcus aureus*
- 18 Determinación de *Salmonella spp.*
- 19 Pruebas bioquímicas de *Salmonella spp.*
- 20 Determinación de *Listeria monocytogenes*
- 21 Estandarización de la bacteria patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19118
- 22 Estandarización de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™
- 23 Primer ensayo *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ 10^6 UFC/g frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 10^3 UFC/g
- 24 *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ 10^7 UFC / g frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 10^5 UFC/g Segundo ensayo
- 25 Determinación de pH
- 26 Resultado de la sobrevivencia de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ en el primer ensayo de Bioconservación.
- 27 Resultado de la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en el primer ensayo de Bioconservación.

- 28 Recuentos promedios de la sobrevivencia de la cepa patógena y cepa probiótica en primer ensayo de Bioconservación.
- 29 Resultado de la sobrevivencia de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ en el segundo ensayo de Bioconservación.
- 30 Resultado de la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en el segundo ensayo de Bioconservación.
- 31 Recuentos promedios de la sobrevivencia de la cepa patógena y cepa probiótica en segundo ensayo de Bioconservación.
- 32 Recuento de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en los dos ensayos de Bioconservación.
- 33 Recuento de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ en los dos ensayos de Bioconservación.
- 34 Valores de pH obtenidos en el primer ensayo de Bioconservación.
- 35 Resultado del color observado en la muestras del primer ensayo de Bioconservación en comparación con un queso patrón.
- 36 Valores de pH obtenidos en el segundo ensayo de Bioconservación.
- 37 Resultado del color observado en la muestras del segundo ensayo de Bioconservación en comparación con un queso patrón.
- 38 Temperaturas de refrigeración en las que se realizaron los ensayos de Bioconservación.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°		Pág. N°
1.	Representación gráfica de la Lista de Chequeo de Buenas Prácticas Higiénicas adecuadas según el Manual de buenas Prácticas de Manufactura.	87
2.	Representación gráfica de los recuentos en los quesos frescos de la cepa probiótica <i>Lactobacillus rhamnosus</i> HOWARU™ en el primer ensayo de Bioconservación	92
3.	Representación gráfica de los recuentos en los quesos frescos de la cepa patógena <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118 en el primer ensayo de Bioconservación	93
4.	Representación gráfica de los recuentos promedios de la sobrevivencia de la cepa patógena y cepa probiótica en el primer ensayo de Bioconservación	94
5.	Representación gráfica de los recuentos en los quesos frescos de la cepa probiótica <i>Lactobacillus rhamnosus</i> HOWARU™ en el segundo ensayo de Bioconservación	95
6.	Representación gráfica de los recuentos en los quesos frescos de la cepa patógena <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118 en el segundo ensayo de Bioconservación	96
7.	Representación gráfica de los recuentos promedios de la sobrevivencia de la cepa patógena y cepa probiótica en	97

el segundo ensayo de Bioconservación

8. Representación gráfica de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en los dos ensayos de Bioconservación 98
9. Representación gráfica de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ en los dos ensayos de Bioconservación 99
10. Representación gráfica de los resultados de pH tomados para la realización del primer ensayo de Bioconservación 100
11. Representación gráfica del porcentaje de color versus el tiempo en días del queso patrón 102
12. Representación gráfica del porcentaje de color versus el tiempo en el primer ensayo de Bioconservación de los quesos frescos 102
13. Representación gráfica de los resultados de pH tomados para la realización del segundo Ensayo de Bioconservación 106
14. Representación gráfica del porcentaje de color versus el tiempo en el segundo ensayo de Bioconservación de los quesos frescos 108

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	Pág N°
1. Composición del queso fresco	32
2. Género y especies de bacterias probióticas	36
3. Diferencias entre <i>Listeria monocytogenes</i> y otras <i>Listeria spp</i>	38
4. Resultados esperados en la identificación de <i>Salmonella spp</i>	73
5. Posibles olores que se puedan percibir en la muestra de queso fresco y la intensidad que presentan.	84
6. Resultados promedios de Calidad Microbiológica inicial de los quesos frescos de la quesería de Metapán	89
7. Estandarización de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118	90
8. Estandarización de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> HOWARU™	91
9. Resultados del olor de los quesos frescos del día cero en el primer Ensayo de Biconservación	103
10. Resultados del olor de los quesos frescos del día tres en el primer Ensayo de Biconservación	103

11. Resultados del olor de los quesos frescos del día cinco en el primer Ensayo de Biconservación	104
12. Resultados del olor de los quesos frescos del día ocho en el primer Ensayo de Biconservación	105
13. Resultados del olor de los quesos frescos del día quince en el primer Ensayo de Biconservación	105
14. Resultados del olor de los quesos frescos del día cero en el segundo Ensayo de Biconservación	109
15. Resultados del olor de los quesos frescos del día tres en el segundo Ensayo de Biconservación	109
16. Resultados del olor de los quesos frescos del día cinco en el segundo Ensayo de Biconservación	110
17. Resultados del olor de los quesos frescos del día ocho en el segundo Ensayo de Biconservación	111
18. Resultados del olor de los quesos frescos del día quince en el segundo Ensayo de Biconservación	111

ABREVIATURAS

AP:	Agua Peptonada
ATCC:	American Type Culture Collection
BAL:	Bacterias Ácido Lácticas
BAM:	Bacteriological Analytical Manual
BHI:	Brain Infusion Heart
BPH:	Buenas Prácticas Higiénicas
BS:	Agar Bismuto Sulfito
CENSALUD:	Centro de Investigación y Desarrollo en Salud
ETAS:	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
FDA:	Food and Drug Administration
HACCP:	Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
HTST:	High Temperature /Short Time
ICMSF:	International Commission on Microbiological Specifications for Foods

LEB:	Caldo Enriquecimiento para <i>Listeria</i>
MIO:	Motility Indole Ornithine
MRS:	Agar Man, Rogosa y Sharpe for <i>Lactobacilli</i>
MRVP:	Medio Rojo de Metilo y Voges Proskauer
SS:	Agar <i>Samonella-Shiguella</i>
TSAYE:	Tripticasa Soya Agar con Extracto de Levadura
TSI:	Triple Sugar Iron Agar
XLD:	Agar Xilosa Lisina Desoxicolato

RESUMEN

La investigación realizada tuvo como objetivo determinar la Bioconservación de queso frescos de Metapán utilizando una cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 19118. Así como la verificación de las Buenas Prácticas de Higiene mediante una lista de chequeo. Se estableció la calidad microbiológica inicial de los quesos frescos según los Criterios microbiológicos del Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.50:08) para el 1.0 Grupo de alimento: Leche y productos lácteos; 1.9 Subgrupo del alimento: Quesos frescos, no madurados y requesón los cuales fueron *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* Posteriormente se inocularon en los quesos frescos las cepas estandarizadas a concentraciones de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ 10^6 y 10^7 UFC/g y *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 10^3 y 10^5 UFC/g comprobando su sobrevivencia a los 0, 3, 5, 8 y 15 días, simultáneamente se determinó el pH, color, olor y mejor tiempo de vida en anaquel de los quesos frescos comparando sus características con un queso patrón.

Se realizaron dos ensayos de Bioconservación, utilizando cinco muestras de quesos frescos para cada uno, determinados en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) en el período de agosto a noviembre de 2016.

En el primer ensayo la bacteria *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 disminuyó seis logaritmos desde su concentración inicial hasta el día tres manteniéndose en este mismo logaritmo hasta el día quince, *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ aumenta cuatro logaritmos hasta el día quince obteniéndose una mejoría en las características organolépticas de las muestras, mientras que en el segundo ensayo *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 mantuvo su mismo

logaritmo y *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ aumento dos hasta el día quince.

En próximos ensayos se recomienda utilizar más de una cepa probiótica para mejorar la inhibición de cepas patógenas y las características del producto.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

Listeria monocytogenes es el agente causante de la listeriosis, una severa enfermedad en los seres humanos y una de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAS), esta bacteria es difícil de controlar en los alimentos, ejemplo de ello son los productos lácteos, y en particular los quesos blandos. (5)

Los quesos frescos contaminados han sido implicados en muchos de los principales brotes de listeriosis reportados en todo el mundo. (5) Esto debido a que los microorganismos presentes en el queso fresco provienen de las malas prácticas higiénicas seguidas en su elaboración y a la utilización de leche contaminada por las malas prácticas de ordeño.

Desde el punto de vista higiénico y sanitario es importante la conservación de los quesos para evitar su deterioro y garantizar que no producirán daños en la salud del consumidor. Hoy en día, se implementa el uso de estrategias adicionales para controlar el crecimiento y supervivencia de *Listeria monocytogenes* en quesos a través de la adición de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) y/o sustancias derivadas de estas. Esto conlleva a la Bioconservación del producto, reduciendo así la necesidad de utilizar productos químicos conservantes. (5)

En la presente investigación se verificaron las buenas prácticas higiénicas utilizadas para la elaboración de los quesos frescos en una quesería de Metapán, a través de una lista de chequeo. Se establecieron en las muestras de quesos frescos, los criterios microbiológicos del Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 (Alimentos, criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos) de quesos madurados y no madurados) para *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp*

Se estandarizó la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ 10^7 UFC/mL y 10^6 UFC/mL procediendo a la adición en los quesos frescos inoculados con la cepa patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 10^5 UFC/mL y 10^3 UFC/mL respectivamente. Se realizaron recuentos de ambas bacterias en los tiempos cero, tres, cinco, ocho y quince días. Las características organolépticas color y olor fueron determinadas a las muestras de queso, a su vez el pH se determinaba también en cada tiempo de análisis. La comparación de los quesos frescos inoculados con ambas bacterias versus un queso fresco sin inoculación (queso patrón) se realizó para determinar la mejor vida en anaquel para el queso fresco.

La competencia de las bacterias implicadas da como resultado que a concentraciones altas de las dos cepas, la probiótica no lograba inhibir el crecimiento de la cepa patógena; en cambio a concentraciones menores de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 el probiótico logra inhibir su crecimiento completamente hasta los tres días del ensayo y no desmejora las características organolépticas del queso fresco.

El fin de esta investigación fue ensayar con base científica en una matriz de alimento la Bioconservación implementando el uso de un probiótico, haciendo al alimento más seguro y evitando la diseminación de enfermedades tan graves como listeriosis.

La parte experimental de la investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, CENSALUD, durante los meses de agosto a noviembre de 2016.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar la Bioconservación de quesos frescos de Metapán, utilizando una cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 19118

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Verificar las buenas prácticas de higiene empleadas en una quesería de Metapán para la elaboración de quesos frescos, por medio de una lista de chequeo.
- 2.2.2 Establecer la calidad microbiológica inicial de los quesos frescos obtenidos de la quesería, según los Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos del Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.50:08) para el 1.0 Grupo de alimento: Leche y productos lácteos; 1.9 Subgrupo del alimento: Quesos frescos, no madurados y requesón.
- 2.2.3 Estandarizar la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ (10^6 UFC/mL y 10^7 UFC/mL) y la cepa patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 (10^3 UFC/mL y 10^5 UFC/mL) y adicionarlas a los quesos frescos, comprobando su sobrevivencia a 0, 3, 5, 8 y 15 días.

2.2.4 Especificar el pH, color, olor y el tiempo de vida en anaquel de los quesos frescos inoculados con los microorganismos a temperaturas de 4.5 a 5.5°C comparándolos con un queso fresco utilizado como patrón.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Generalidades del queso (2) (3)

El queso es un alimento de amplio consumo a nivel mundial, cuyas características nutritivas, funcionales, texturales y sensoriales difieren en cada tipo. Es un producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, cultivos lácticos o enzimáticos, ácidos orgánicos comestibles con o sin tratamiento térmico, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales e ingredientes comestibles opcionales. Por su proceso se da lugar a diferentes variedades de queso: fresco, maduro y procesado.

3.2 Queso fresco (2)

Son los productos higienizados sin madurar, que después de su fabricación están listos para el consumo. Pueden ser blandos o duros, grasos o magros. Su cuajado puede ser enzimático (por cuajo), por acidez (con cultivo láctico o con ácido orgánico). Puede ser prensado o no, molido o sin moler, de pasta cocida o no.

La duración sanitaria de los quesos frescos no pasa de los treinta días y generalmente necesitan refrigeración. Tiene un ligero sabor lácteo, con sabor entre dulce y salado. En su proceso de elaboración, la cuajada se suele moler finamente antes de la salazón, lo que hace que el queso sea desmenuzable. Este tipo de queso tiene un $\text{pH} > 6.1$

3.3 Composición del queso fresco ⁽²⁾

El porcentaje aproximado de cada uno de los componentes del queso fresco son los descritos en la Tabla N°1

Tabla N° 1. Composición del queso fresco.

Componente	Porcentaje
Agua	46-57 %
Materia Grasa	18-29 %
Proteínas	17-21 %
Sal	1-3 %
Minerales	4 %

3.4 Bioconservación de alimentos ^{(13) (22)}

La bioconservación puede definirse como el uso de sistemas biológicos (microorganismos, sus productos metabólicos, enzimas) para mejorar la seguridad alimentaria y para extender la vida útil de alimentos.

Por ejemplo, la leche se conserva por conversión en productos de leche agria y quesos, y la carne se procesa en salchichas estables en almacén por una combinación de fermentación microbiana y secado. Del mismo modo, la alimentación animal puede ser preservada por ensilado. Obviamente, hay productos resultantes que son completamente diferentes de la materia prima original.

En el sentido estricto, el término bioconservación se utiliza para el uso de procesos biológicos que cambian las propiedades sensoriales de un alimento tan poco como sea posible. En la bioconservación de alimentos se incluyen desde

técnicas utilizadas para obtener alimentos más seguros hasta la generación de alimentos mínimamente procesados y sin aditivos.

La implementación de tecnologías modernas en el procesamiento y aseguramiento de la seguridad microbiológica de los alimentos ha disminuido, pero no eliminado los riesgos de las enfermedades relacionadas con el consumo de alimentos contaminados con microorganismos.

3.5 Bioconservación de productos lácteos ⁽¹³⁾

En los últimos años se está realizando un gran esfuerzo investigador para establecer la base científica que demuestre la relación entre los componentes funcionales o los alimentos que los contienen y un determinado efecto positivo sobre la salud.

Los principales patógenos relacionados con la industria de productos lácteos son: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Además, *L. monocytogenes* también es la causante de brotes de listeriosis asociados con el consumo de leche pasteurizada y quesos.

En la larga lista de alimentos funcionales cabe destacar los aportados al mercado por la industria láctea: las leches enriquecidas, a las que se les añaden ácidos grasos omega-3, ácido oleico, ácido fólico, calcio, vitaminas, fósforo, etc; las leches fermentadas suplementadas con calcio, vitaminas y ácidos grasos omega-3, habiendo recibido una especial promoción aquellas que contienen bacterias prebióticas, a las que se les atribuyen funciones sobre la fisiología y ecología intestinal.

Los microorganismos probióticos que se utilizan en la elaboración de productos lácteos pertenecen mayoritariamente a los géneros *Lactobacillus* y

Bifidobacterium, siendo utilizados fundamentalmente en la elaboración de leches fermentadas. Estos productos se consumen normalmente en un plazo breve de tiempo tras su elaboración. Un producto lácteo funcional alternativo, con un período de consumo potencialmente más largo, sería el queso probiótico.

La utilización de un microorganismo probiótico como cultivo adjunto en la elaboración de queso solamente dará lugar a un queso funcional si se mantiene la viabilidad del microorganismo durante el período de maduración del queso, y si las características organolépticas no son afectadas negativamente. Por lo tanto, antes de incorporar una bacteria probiótica en un producto lácteo es necesario hacer ensayos de viabilidad y de funcionalidad durante el proceso de elaboración y el período de vida útil del producto.

El queso ofrece una serie de ventajas con respecto a las leches fermentadas como vehículo de microorganismos probióticos: el pH más elevado, la mayor consistencia, el mayor contenido en grasa y la mayor capacidad tamponante son factores que contribuyen a la protección de los microorganismos probióticos durante el tránsito gastrointestinal, facilitando, por lo tanto, la llegada al intestino de un mayor número de células viables.

3.6 Bacterias probióticas ⁽¹²⁾

El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales.

El término “probiótico” fue inicialmente definido por Parker (1974) como organismos y sustancias que contribuyen a mantener el balance microbiano intestinal, concepto impreciso posteriormente revisado por Fuller (1989) que los

define como suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta beneficiosamente al huésped animal mediante la mejora del equilibrio microbiano intestinal. Años más tarde, Guarner y Schaafsma (1998) definen el término como microorganismos vivos que, al ser ingeridos en un determinado número, ejercen efectos saludables sobre el huésped, más allá del aspecto nutricional. Por último, Salminen et al (1999) ampliaron la definición al considerar probióticos no sólo las preparaciones de células microbianas sino también a los componentes de células microbianas que ejercen un efecto beneficioso sobre la salud humana.

3.7 Criterios para un probiótico ⁽¹⁹⁾

- Seguridad Biológica: Cepa No patógena, preferente origen humano
- Capacidad de resistir ácidos gástricos y las sales biliares
- Capacidad de adhesión a las superficies epiteliales
- Sobrevivir en ecosistema intestinal
- Capacidad de producir componentes antimicrobianos
- Permanecer vivas y estables durante su empleo
- Capaces de un crecimiento rápido en las condiciones del colon
- Capacidad de inmunoestimulación (sin efectos proinflamatorios).

3.8 Mecanismo de acción de los probióticos ⁽⁴⁾

- Producción de ácidos grasos de cadena corta: Disminución pH
pH < 4: no es tolerado por determinados gérmenes
Cambios en la actividad enzimática
- Aumento de Lactasa
- Aumento de Glicosidasa
- Capacidad de adhesión.

- Disminución de Nitroreductasa, B-Glucuronidasa, azoreductasa efecto competitivo con otras bacterias ocupantes (inhibiendo el crecimiento o competición por nutrientes).
- Capacidad de secreción de lactobacilos y bacterias bífidas de antibióticos naturales (lactocinas ,helveticinas, curvacinas , bacteriocinas, nicinas y bifidocinas)
- Inmunomodulador: estimulan el sistema inmune del huésped: estimulan a los macrófagos y modulan la respuesta IG As.

3.9 Género y especies de bacterias probióticas ⁽⁴⁾

Tabla N° 2. Género y especies de bacterias probióticas.

Lactobacilli	Bifidobacteria	Otros géneros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Streptococcus salivaris</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. animalis</i>	<i>therm</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

3.9.1 *Lactobacillus rhamnosus* ⁽³⁾

Lactobacillus rhamnosus es un componente principal de la población de los lactobacilos que habitan naturalmente en el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Este organismo ha sido estudiado extensamente y se ha encontrado que posee un número de propiedades que constituyen las bases para implementar su uso en salud y en investigación clínica. Dentro de las características asociadas a esta bacteria, se encuentra que no posee actividad

antimicrobiana contra otras bacterias ácido lácticas y posee una buena adhesión a las glicoproteínas del íleon humano y a los productos con fibra de la dieta. También, es tolerante al pH bajo y a los fluidos pancreáticos y biliares.

Por otro lado, diversos estudios han demostrado actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, y *Clostridium perfringens in vitro*, así como una actividad antilisteria cuando es aplicada como cultivo iniciador bioprotector de carne de embutidos secos, en etapas iniciales del proceso de maduración.

Esta bacteria es aerotolerante, posee excelente viabilidad, por ejemplo, en el yogurt durante cuatro semanas de almacenamiento a 4°C. Además, es útil en su producción, ya que es capaz de crecer durante la fermentación y además proporciona buenas propiedades organolépticas.

3.10 *Listeria monocytogenes* (11)

3.10.1 Taxonomía

La *Listeria* es un bacilo corto, regular, de 0,4-0,5 µm de diámetro y 0,5-2 µm de largo con los extremos redondos, no tienen cápsula y son asporógenos. Accidentalmente originan formas cocóides o células aisladas de 10 µm de longitud. Son móviles a 25 °C, gracias a unos flagelos peritricos (1 a 4) mostrando una característica movilidad de “volteo”, pero no son móviles a 37°C.

Los cultivos en picadura en medios semi-sólidos para la movilidad, producen una forma típica de “paraguas” o “abeto invertido” aproximadamente a medio centímetro de la superficie, porque es microorganismo microaerófilo.

Las colonias tienen un aspecto característico gris-azulado, que cambia a azul-verde cuando se observan con luz oblicua en la prueba de iluminación de Henry.

Los microorganismos son gram positivos, catalasa-positivos, oxidasa-negativos, y anaeróbios facultativos. Producen citocromos y tienen un metabolismo fermentativo de la glucosa produciendo principalmente L(+) –ácido láctico. Son rojo de metilo positivo y Voges-Proskauer positivo.

No utilizan citrato exógeno y no producen indol. Hidrolizan la esculina pero no la urea. Solo las especies *L. grayi* y *L. murrayi* reducen nitratos a nitritos, lo cual se utiliza en la diferenciación de estas especies.

Fueron identificadas siete especies de *Listeria* todas ellas emparentadas íntimamente, tal como se presentan en la Tabla N°3. Las especies *L. innocua* y *L. murrayi* (Sin. *L. grayi*) son consideradas apatógenas, mientras que *L. seeligeri*, *L. ivanovii* y *L. welshimeri* rara vez causan infección humana, reservando para *L. monocytogenes* la consideración de especie más importante.

Tabla N° 3. Diferencias entre *Listeria monocytogenes* y otras *Listeria spp*

Especie de <i>Listeria</i>	Fermentación de carbohidratos			Prueba de CAMP		Hemolisis β
	M	R	X	SA	RE	
<i>Monocytogenes</i>	-	+	-	+	-	+
<i>innocua</i>	-	±	-	-	-	-
<i>Welshimeri</i>	-	±	+	-	-	-
<i>Seelgeri</i>	-	-	+	+	-	+
<i>Ivanovii</i>	-	-	+	-	+	+
<i>murrayi (grayi)</i>	+	±	-	-	-	-

3.10.2 Hábitat

A pesar de no formar esporas, es capaz de sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados en medios diferentes. Es un organismo psicrótrofo. Por ello, el alimento se puede contaminar en cualquier eslabón de la cadena alimentaria,

y el almacenamiento en frío no inhibe el crecimiento de las listerias.

Ha sido aislada durante décadas en varios ambientes:

- Ensilados
- Vegetación natural en putrefacción y estiércol
- Agua de superficie de canales y lagos, zanjas y terrenos ganados al mar
- En Holanda, efluentes de agua dulce que desaguan en una bahía, y aguas residuales
- Plantas de tratamiento de alimentos
- Adheridos en superficies diversas como: acero inoxidable, vidrio, caucho, pavimentos, etc.
- Alimentos diversos como: leche y productos lácteos, carnes y productos cárnicos, hortalizas, marisco crudo y en productos derivados del pescado, etc.

3.10.3 Patogenicidad de *Listeria monocytogenes*

La listeriosis es caracterizada por una variedad de síndromes. *Listeria monocytogenes* es un patógeno oportunista, capaz de sobrevivir y de multiplicarse fuera de los hospedadores animales y en medios nutritivos simples. Cuando infecta a los animales o a las personas, se multiplica intracelularmente. Como se ha presentado anteriormente, no todas cepas de *Listeria* son patógenas. Pero todas las cepas de *Listeria monocytogenes* son hemolíticas y la producción de hemolisina es una de las propiedades asociadas a la patogenicidad, ya que todas las cepas no hemolíticas son apatógenas. Otros factores asociados con la patogenicidad son la producción de una proteína de 60.000 Da y de una fosfolipasa.

Existen varios esquemas de tipado de *Listeria monocytogenes*. El serotipado diferencia 13 serovariedades, pero sólo tres de ellas (principalmente la 4b y ocasionalmente la 1/2a y la 1/2b) explican la mayoría de los casos de listeriosis humana.

3.10.4 Población susceptible

Aproximadamente una tercera parte de las infecciones humanas por *Listeria monocytogenes* son perinatales, afectando a mujeres gestantes y a sus bebés no nacidos o recién nacidos y las dos terceras partes restantes se presentan en personas no gestantes de todas las edades, mayoritariamente adultas.

Si bien algunos de los casos no relacionados con la gestación no tienen ninguna enfermedad predisponente, la mayoría de las infecciones por *Listeria monocytogenes* se dan en personas cuya inmunidad ha sido menoscabada por la edad, por enfermedades tales como tuberculosis, el cáncer, por el transplante de órganos, por el uso de corticoesteroides o enfermedades como el SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), leucemia, linfoma, o mieloma. Las mujeres gestantes también tienen un estado de inmunidad alterado que probablemente explique su mayor sensibilidad.

La listeriosis es 300 veces más frecuente en pacientes con SIDA que en la población general. Un pequeño porcentaje de pacientes con listeriosis sufre de enfermedades no asociadas habitualmente con la inmunodepresión como es el caso de diabetes, cirrosis, alcoholismo, fallo cardíaco congestivo y lupus eritematoso sistémico.

3.10.5 Dosis infectante

La dosis infectante depende de muchos factores, incluyendo el estado inmunológico del individuo. Los datos publicados indican que el número de *Listeria monocytogenes* en los alimentos contaminados implicados en epidemias y brotes esporádicos fueron superiores a 10^2 UFC/g. Se considera que el número estimado de *Listeria monocytogenes*, necesario para causar la enfermedad en los humanos está entre $10^3 - 10^5$ UFC/g.

3.10.6 Período de incubación

McLauchlin (1994) señala que el período de incubación varía según la forma de transmisión de la enfermedad, aunque en la mayoría de los casos es corto: 1 – 2 días para las lesiones cutáneas, 5 – 12 días para la infección neonatal y 1 día para la de transmisión alimentaria. Pero diversos autores indican que el período de incubación por transmisión alimentaria en algunos individuos es largo, llegando a ser hasta de 90 días. *Listeria monocytogenes* puede ser encontrada en las heces de un porcentaje de la población humana sana, así como en animales, en los que parece ser que es parte integrante de la flora normal.

3.10.7 Síntomas

Los síntomas que causa la infección en los casos perinatales sólo consisten en una fiebre moderada en la madre, acompañada o no de síntomas de ligera gastroenteritis o de tipo gripal, pero con frecuencia las secuelas en el feto o en el recién nacido son importantes o mortales. El feto no siempre resulta afectado gravemente, pero puede manifestar una infección septicémica general abrumadora que afecta a varios órganos y la formación de lesiones granulomatosas (granulomatosis infantiséptica). Muy frecuentemente, la muerte

intrauterina del feto se produce antes del tercer trimestre de gestación. En la última fase de gestación el niño puede nacer muerto o nacer prematuramente y estar gravemente enfermo. En estos casos, la septicemia es muy frecuente y en algunos casos va acompañada de meningitis. Ocasionalmente sólo se observan lesiones cutáneas.

Se cree que la listeriosis “de aparición tardía” es consecuencia de la infección del niño por la madre durante el parto (o por otro niño infectado) y aparece hasta aproximadamente 10 días después del nacimiento.

La infección perinatal de aparición tardía frecuentemente origina meningitis. En los casos que no implican gestación, aproximadamente las dos terceras partes de los enfermos padecen sólo de bacteriemia y aproximadamente una tercera parte padecen meningitis, con o sin bacteriemia (manifiesta). Un pequeño porcentaje tiene lesiones focales, que incluyen endooftalmítis, artritis séptica, osteomielitis, pericarditis y endocarditis, sin bacteriemia manifiesta.

Aunque se cree que la mayoría de los casos de listeriosis son debidos a infección por los medios de los alimentos, en aquellas personas que manejan animales infectados se dan algunas lesiones cutáneas localizadas y algunos empleados de laboratorios contraído accidentalmente infecciones oculares por manipular cultivos de listerias.

La mortalidad suele ser elevada (30 – 40 %) entre individuos inmunodeprimidos, pacientes idosos, y pacientes que sufren infecciones en el sistema nervioso central.

3.10.8 Características de crecimiento y de supervivencia de *Listeria monocytogenes*

3.10.8.1 Temperatura

La temperatura óptima de crecimiento está entre 30 y 37 °C. Supervive a temperaturas de – 0,1 hasta 45 °C. No sobrevive a una temperatura de 60 °C durante 30 minutos.

Uno de los hechos del mayor interés, por su trascendencia en la conservación de determinados tipos de alimentos, resulta en lo que se refiere a la resistencia térmica de este microorganismo. Entre las bacterias vegetativas Gram negativas, *L. monocytogenes* no es insólitamente termorresistente. A no ser que se hallen presentes cifras iniciales muy elevadas (por ej., 10^5 – 10^6 UFC/mL) no debería resistir el tratamiento comercial de la pasteurización normal de la leche (71 °C a 15 seg.).

La resistencia en la nata es parecida a la correspondiente en la leche desnatada, aunque en las carnes, incluyendo el salami, se observan valores más elevados y se indica que la grasa aumenta la resistencia. Presenta un punto de muerte térmica de 10 min. a 58 °C., siendo su valor Z de 6,5 °C, lo que en general supone una resistencia térmica 4 veces superior a la de *Salmonella* por ejemplo, habiéndose señalado la influencia de factores adicionales que exaltan este carácter, como es el caso de la temperatura de crecimiento o la atmósfera de recuperación. En la práctica, el interés por cuanto se refiere a la resistencia térmica de *L. monocytogenes*, se despertó fundamentalmente con ocasión del brote de listeriosis que tuvo lugar en Massachussets en 1983, asociado epidemiológicamente al consumo de leche pasteurizada.

Aunque se han ofrecido datos diversos en relación con la experiencia de los distintos investigadores, parece cierto que por un lado, el número de listerias presente puede condicionar el resultado final (niveles de 10^5 - 10^6 , listerias permiten obtener recuperaciones después de un enriquecimiento a 4 – 6 °C durante 4 días, del orden de 10^1 – 10^2 , tanto después de tratamientos de pasteurización baja (63 °C a 30 min.) como HTST (72 °C 15 seg.), a la vez que la presencia intracelular de *L. monocytogenes* en los fagocitos podría representar una fórmula de protección que permitiera el “escape” del microorganismo a los efectos del calor (en condiciones experimentales se ha demostrado supervivencia intracelular a combinaciones de 72,2 °C durante 16,4 seg., pero no combinaciones de 76,4 – 77,8 °C durante 15,4 seg.), si bien es justo reconocer que el proceso de homogeneización habitual de la leche, previo al tratamiento, liberaría la mayor parte de los agentes, convirtiéndolos en blanco más fácil a los efectos térmicos.

3.10.8.2 pH

Listeria monocytogenes tiene una amplia escala de pH de crecimiento, siendo el límite superior aproximadamente el pH 9,2 y el inferior un pH de 4,6 – 5,0. Esta bacteria es capaz de tolerar pH bajo como 3,5 después de una fase de adaptación a pH 5,5. Este alto grado de adaptabilidad es una razón de la dificultad de controlar el patógeno en un número de productos alimenticios desde que los tratamientos usados en el procesamiento y preservación a menudo utilizan agentes estresantes y parámetros para los cuales *L. monocytogenes* es resistente. *L. monocytogenes* es incapaz de crecer a un pH inferior a 4,5.

Experimentalmente, la presencia de 0,1 % de ácidos acético, cítrico y láctico en caldo de triptosa inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes*, aumentando la inhibición cuando la temperatura disminuye. El grado de disociación del ácido

determina la actividad anti-Listeria. Los ácidos cítrico y láctico tienen un efecto menos inhibitor en su equivalente de pH del ácido acético.

3.10.8.3 Actividad de agua

L. monocytogenes puede sobrevivir a una variedad de situaciones de estrés como 10 % NaCl, sobreviviendo a valores de 20-30 % de NaCl y puede ser detectada en sal pura después de 150 días a 22 °C. Asimismo puede sobrevivir en las concentraciones de nitritos permitidas en los alimentos.

Está siendo demostrado que el microorganismo responde a elevada osmolaridad por la acumulación intracelular de solutos compatibles, llamados osmolitos, por activación osmótica de su transporte desde el medio en vez de a través de nueva síntesis. Los solutos comúnmente acumulados incluyen los iones potasio, aminoácidos, compuestos de amonio cuaternarios y carbohidratos. Entre los solutos compatibles, la glicina betaína y la carnitina son los más efectivos, particularmente contra el estrés osmótico. Estos osmolitos actúan en el citosol para contrarrestar la osmolaridad externa, lo cual previene que el agua salga de la célula y la plasmólisis no afectando adversamente su estructura macromolecular y función.

3.10.8.4 Refrigeración

A temperaturas de refrigeración, la resistencia de *L. monocytogenes* a pH ácido resulta incrementada, aunque a este respecto parecen influir factores como la composición del substrato o el tipo de ácido.

La congelación de los alimentos y la conservación a – 18 °C, y también la congelación repetida, ejercen poco efecto y es más probable que en estas condiciones dañen a *Listeria monocytogenes* en vez de inactivarle.

Bajas temperaturas tienen profundo efecto en el crecimiento de la bacteria por influencia en los ribosomas, membrana citoplasmática y alteraciones en la síntesis de proteínas y captación de solutos. Se ha dedicado un mayor énfasis a los recientes estudios sobre el incremento de la expresión de las proteínas bacterianas de choque al frío en respuesta a las temperaturas reducidas.

3.10.8.5 Atmósfera

Se indica que *Listeria monocytogenes* resulta poco afectada por la atmósfera gaseosa. En condiciones aeróbicas, microaerófilicas y anaeróbicas, se han observado tiempos de generación parecidos, sin que existan indicios de que las elevadas concentraciones de CO₂ ejerzan un efecto inhibitorio.

El crecimiento óptimo se produce en una atmósfera constituida por 5 % de O₂ y 5-10 % de CO₂. A presiones comprendidas entre 3.000 y 4.000 atmósferas (1 atm = 14,7 lb/pulg² = 1,033 kg/cm²), se han hallado valores D comprendidos entre 100 y 10 minutos.

3.10.9 Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en algunos alimentos

L. monocytogenes se aísla en numerosos alimentos crudos y se encuentra con frecuencia en los ambientes de producción y procesamiento de los alimentos, por lo que parece difícil, sino imposible, su total eliminación en este tipo de alimentos. En estas condiciones la presencia de niveles bajos de *L. monocytogenes* en los alimentos frescos probablemente ha de ser tolerada, a pesar de que la contaminación cruzada y un insuficiente cocinado puedan representar un posible riesgo. En alimentos elaborados que están listos para el consumo, pero que no constituyen un sustrato adecuado para el crecimiento de *L. monocytogenes*, la tolerancia de bajos niveles sería discutible, en tanto no se conozca con exactitud

la dosis infectiva del microorganismo. Por el contrario, los alimentos de este tipo que permiten la multiplicación de *L. monocytogenes* y que además pueden conservarse durante largos períodos a temperatura de refrigeración, no habrán de presentar contaminación por *L. monocytogenes*, incluso cuando el recuento inicial sea bajo. La clasificación de los alimentos según sus características y tecnología por una parte, y según la evidencia epidemiológica de transmitir la listeriosis por otra, puede ser muy útil en el establecimiento en cada tipo de alimento de un criterio de aceptabilidad para el consumo respecto a la presencia de *L. monocytogenes*.

Por las características del género *Listeria*, en particular por su amplia ubicuidad, y su capacidad de sobrevivir durante semanas, incluso meses, tanto en ambientes húmedos como secos, es posible la contaminación de alimentos por este microorganismo.

La capacidad de supervivencia o multiplicación de *L. monocytogenes* en los alimentos depende de diversos factores, que en muchas ocasiones actúan de manera interrelacionada. Las características físico-químicas del propio alimento (pH, contenido en sal, actividad de agua, etc.) su microflora natural, presencia de sustancias inhibitoras, temperatura de conservación, o el proceso tecnológico a que somete el alimento durante su elaboración (tratamientos térmicos, fermentación, aditivos, radiaciones, etc.) son factores que van a influenciar en la capacidad de supervivencia y multiplicación de *L. monocytogenes* en estos productos.

Brotos de listeriosis suelen ser asociados con la leche, queso, vegetales y saladas, y productos cárnicos. La leche y los productos lácteos fueron los primeros alimentos investigados y se encuentran entre los alimentos estudiados más extensivamente. Su riqueza en proteínas, grasa y carbohidratos hace de la

leche un medio favorable al crecimiento de muchos microorganismos. La contaminación de la leche puede tener origen endógeno (mamitis, septicemias, abortos, e incluso encefalitis), o exógena a partir de los piensos contaminados, eliminación fecal de vacas sanas portadoras, y del ambiente de la granja, debido a las precarias condiciones higiénicas y tecnológicas de algunas explotaciones.

En caso de infección de la ubre por *Listeria monocytogenes*, este microorganismo puede encontrarse en la leche en dos estados: libremente suspendida dentro del líquido o en el interior de los leucocitos bovinos, comúnmente presentes en la leche cruda.

Al ser un parásito intracelular facultativo hace que pueda sobrevivir en el interior de los monocitos presentes en leches de vacas mamíticas. De esta forma la leche cruda contaminada constituye un vehículo de la bacteria para los productos lácteos.

Pueden estar contaminados una gran variedad de quesos, pero son de máximo interés los quesos blandos debido a su pH (> 5,5) y a la ausencia de bacterias iniciadoras del cultivo. Por ello, con frecuencia la contaminación suele ser entre 2 al 10 % y en los cuales las poblaciones de *Listeria monocytogenes* varían de 10 a 10⁷ UFC/g

El helado no es frecuentemente contaminado por *Listeria monocytogenes* (0,3 – 2 % de las muestras analizadas), pero cuando se hallan presentes, las poblaciones son generalmente bajas (< 1 a 10 UFC/ml). De modo parecido, el yogurt y la mantequilla rara vez aparecen contaminados, una vez que los cultivos lácticos termófilos inhiben el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Ha sido relacionada con la contaminación por *Listeria monocytogenes* una variedad considerable de carnes y productos cárnicos, que incluyen la carne de

vaca, carne de cerdo, carne picada, el jamón, los embutidos ahumados y fermentados, el salami, y el paté. La mayor parte de contaminación es de superficie. El predominio de contaminación de la carne cruda y de los productos cárnicos tratados puede ser alta (desde el 1 hasta el 70 %). Las aves de corral (pollo de tipo broiler, listo para comer, precocinado, refrigerado o congelado) también están contaminadas, con una incidencia del 60 % de las muestras positivas en algunas investigaciones.

Es frecuente la contaminación de hortalizas frescas (pepinos, rábanos, col, patatas), pero las cifras son bajas. Las hortalizas para ensaladas de acidez baja, los tomates y las zanahorias no son sustrato adecuado para el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Las fuentes de contaminación incluyen la tierra, el agua, el estiércol de los animales, la vegetación en putrefacción y los efluentes de aguas residuales de plantas de tratamiento.

Una serie de productos de la pesca, particularmente los productos levemente conservados (< 6 % de concentración de sal, pH>5) tal como los productos de pescado ahumados (ahumados por frío o calor), productos ligeramente salados (gambas salmueradas cocinadas) o productos marinados, son capaces de permitir el crecimiento de *L. monocytogenes*. Es importante notar que el ahumado a frío se hace a temperaturas debajo de 30 °C, más frecuentemente entre 19-22 °C, durante 2 a 3 horas, lo cual provee un posible ambiente para el crecimiento bacteriano.

Aunque *Listeria* se encuentre en algunos animales, la mayoría de los autores están de acuerdo en que probablemente la contaminación de la carne y productos cárnicos se produce en las plantas de elaboración durante el procesado, siendo el matadero la fuente primaria de la contaminación con *Listeria* de los productos cárnicos, ya que además, *L. monocytogenes* tiene una gran resistencia a las

condiciones ambientales, pudiendo sobrevivir hasta 30 días en la superficie de las baldosas secas.

Listeria fue aislada en desagües, suelos, agua estancada, residuos y superficie de contacto de los alimentos de los equipos de plantas de producción de alimentos. Además, se encontró *Listeria* en la zona de aturdido de un matadero de bovinos y porcinos y las cámaras de refrigeración a una temperatura de 5°C, cintas transportadoras y superficies de las tablas de una sala de despiece de pollos.

La presencia de *Listeria monocytogenes* en las plantas de procesamiento de alimentos ocurre a través de la suela de los zapatos y del vestuario de los trabajadores, a través de los equipamientos de transporte, animales que excretan bacterias o hayan contaminado piel o superficies, vegetales crudos, alimentos crudos de origen animal y posiblemente portadores humanos sanos.

3.10.10 Prevención y control

El control de *L. monocytogenes* es difícil por dos razones. La primera es su naturaleza ubiquitaria. Es comúnmente encontrada en las plantas, en el suelo, muestras de agua superficiales y también se suele aislar en las heces del ganado en mataderos y medios de procesamiento de alimentos y en los hogares. La contaminación de más del 60 % de carne fresca, pollo y un tercio de los productos cárnicos preparados para el consumo. La segunda razón es su habilidad de tolerar difíciles de crecimiento, es decir su osmo y criotolerancias y la capacidad de supervivir a pH relativamente bajos.

Un grupo de trabajo informal de la Organización Mundial de la Salud concluyó que la pasteurización es un método seguro que reduce el número de *L.*

monocytogenes en la leche cruda a niveles que no ponen en riesgo apreciable para la salud humana.

Difícilmente puede ser totalmente eliminada de los mataderos, siendo en muchos casos técnicamente imposible garantizar la ausencia total de dicha bacteria. Durante el faenado es posible que se produzca fácilmente una recontaminación de las canales, tanto por el ambiente del matadero como por los útiles, ropa y manos de los trabajadores. Por tanto, la mejora en medidas preventivas al nivel de matadero estableciendo un adecuado sistema HACCP constituye una posibilidad concreta para minimizar la incidencia de *Listeria* en el producto acabado.

Los productos alimenticios constituyen el principal vehículo en la transmisión de listeriosis al hombre, por tanto un adecuado plan de control de listeriosis desde la producción de alimentos de origen animal es fundamental para disminuir el riesgo de diseminación hacia las siguientes etapas de la elaboración de alimentos.

Por ejemplo para prevenir la infección por listerias en la crianza de ganado ovino y caprino, se recomiendan algunas medidas elementales como la elaboración de ensilados de buena calidad, la ejecución de estrictas desinfecciones luego después de casos de abortos o mastitis y la oportuna eliminación de animales excretores de *Listeria monocytogenes* (Dijkstra, 1989). La acidificación rápida del ensilado hasta un pH < 4.0, impide el desarrollo de cantidades elevadas de *Listeria monocytogenes*.

Este control es especialmente importante con respecto al ensilado que se debe dar al ganado vacuno lechero, porque la leche producida puede posteriormente ser utilizada sin pasteurizar en la fabricación de quesos. Asimismo, las

recomendaciones para la conservación de leche en granja a temperaturas no deben ser superiores a 5 °C mientras no se transporte a la planta de productos lácteos.

De acuerdo con estas características, las medidas de control deben comenzar en el origen de los alimentos, pasando por los puntos intermedios hasta llegar al producto terminado. Estas medidas podrían ser, principalmente:

- Utilizar materia prima mínimamente contaminada.
- Obtener los productos de granja en las mejores condiciones higiénicas.
- No emplear aguas contaminadas para el riego.
- Evitar el empleo de abonos animales.
- Mantener una higiene perfecta en granjas, establos y animales.
- Utilizar piensos de buena calidad bacteriológica.
- Controlar las mastitis animales.
- Transportar higiénicamente los productos.
- Planificar correctamente las plantas de procesado
- Instaurar programas de control de calidad en las fases de procesamiento y ambiente, así como del personal.
- Investigar la posible presencia de *L. monocytogenes* en el ambiente y en el producto terminado.
- Vigilar y controlar los acondicionadores de aire
- Controlar y limpiar la maquinaria (válvulas, placas, etc.), desmontándola para la comprobación de sus condiciones físicas y limpieza.

El control de listeriosis humana es un caso clásico en el que se debe aplicar el HACCP desde la granja hasta el consumidor con el fin de reducir al mínimo el riesgo de la enfermedad transmitida por alimentos.

El ICMSF (1998) recomienda que las plantas de tratamiento en sus programas HACCP y deben perseguir tres objetivos principales:

– Primero. Reducir al mínimo la multiplicación de *Listeria monocytogenes* en las materias primas, especialmente antes y durante el tratamiento de los alimentos crudos elaborados no sometidos a tratamiento listericida por calentamiento. Se aplica a alimentos como ensalada de col, los embutidos fermentados, los quesos fabricados con leche no tratada.

– Segundo. Utilizar tratamientos listericidas por calentamiento que garanticen la destrucción de *Listeria monocytogenes* en alimentos expuestos a posible recontaminación durante la subsiguiente manipulación. Se aplica a alimentos como determinados quesos y las carnes tratadas a escala comercial que se cortan en tajos o se alteran después del tratamiento térmico; también se aplica a alimentos tratados dentro de un envoltorio íntegro como por ejemplo el jamón cocido, o alimentos que son envasados asépticamente inmediatamente después del tratamiento listericida, como es el caso de algunos productos lácteos

– Tercero. Reducir el riesgo de recontaminación de los alimentos listos para comer que después se elaboran tras recibir un tratamiento listericida.

Teniendo en cuenta que el riesgo es mayor en personas con inmunidad reducida (mujeres gestantes, personas con enfermedades malignas o con el SIDA) y con enfermedades subyacentes (por ejemplo, la enfermedad cardíaca, la diabetes, la enfermedad renal. Para estas poblaciones el ICMSF (1998) recomienda las

siguientes normas a tener en cuenta en la selección y manipulación de los alimentos:

1. No comer alimentos de origen animal crudos o insuficientemente cocidos.
2. Evitar la contaminación cruzada entre los alimentos crudos y los cocidos durante la preparación y conservación de los alimentos.
3. Calentar las sobras hasta que estén excesivamente calientes para tocarlas. A los alimentos que se calientan al microondas se les debe conceder el tiempo suficiente para que el calor se equilibre en todo el alimento antes de comerlos.
4. No comer paté ni quesos blandos madurados (por ej., el de Camembert, el de Brie, el queso rojo para extender) ni tampoco los quesos no madurados (por ej., quesos al estilo mexicano). Los quesos duros, el queso fresco (por ej., el requesón) y los quesos elaborados (por ej., el queso de nata al estilo de Filadelfia) se pueden comer sin la preocupación del riesgo de listeriosis.
5. Las hortalizas crudas se deben lavar abundantemente antes de comerlas.
6. Los alimentos se deben preparar y manipular de acuerdo con las normas recomendadas por su elaborador.
7. Se deben comprar y utilizar alimentos en cuyo envase conste la fecha de “consumo preferentemente antes de”, de “venta antes de” o de “utilización antes de”.
8. Mantener la nevera limpia.
9. Conservar los alimentos perecederos en la zona más fría de la nevera, preferentemente a 5 °C o a una temperatura inferior.
10. No guardar alimentos perecederos en la nevera durante más de 1–3 días.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el problema de las

Listeria no está en impedir su presencia, sino en controlar su supervivencia y crecimiento, con el fin de reducir las cantidades en que se encuentran en los alimentos.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

-DE CAMPO: Se recolectaron las muestras de quesos frescos en una quesería de Metapán, evaluándose a través de la observación directa las Buenas Prácticas Higiénicas (BPH) empleadas en la elaboración de los quesos frescos, mediante el llenado de una lista de chequeo.

-EXPERIMENTAL: Se verificaron los criterios microbiológicos en las muestras de quesos frescos según Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.50:08) para el 1.0 Grupo de alimento: Leche y productos lácteos; 1.9 Subgrupo del alimento: Quesos frescos, no madurados y requesón, los cuales son: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*. Se estandarizó la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ 10^7 UFC/mL y 10^6 UFC/mL adicionándolas a los quesos frescos inoculados con la cepa patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 10^5 UFC/mL y 10^3 UFC/mL respectivamente. Realizándose recuentos de ambas bacterias en los tiempos cero, tres, cinco, ocho y quince días.

Las características organolépticas color y olor fueron determinadas mediante la observación directa al queso y la percepción del olor a través del sentido del olfato de los analistas. El pH para cada tiempo de análisis fue determinado mediante un pHmetro Crison GLP 22. Finalmente se compararon los quesos frescos inoculados con ambas bacterias, con el queso fresco sin inoculación para determinar el mejor tiempo de vida en anaquel para el queso fresco.

-PROSPECTIVO: La investigación será un antecedente para futuros estudios de Bioconservación en matrices de alimentos.

4.2 Investigación Bibliográfica

Se realizaron consultas en las siguientes Bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador (UES).
- Central de la Universidad de El Salvador (UES).
- Universidad Dr. José Matías Delgado.
- Universidad Alberto Masferrer.
- Internet.

4.3 Investigación de campo

Las muestras de quesos frescos utilizadas para llevar a cabo los ensayos de Bioconservación, se recolectaron en una quesería del Municipio de Metapán, Departamento de Santa Ana (Ver Anexo N° 1, Figura N° 15).

4.3.1 Universo

Todos los quesos frescos elaborados el día de muestreo (ciento ochenta unidades) por la quesería de Metapán, departamento de Santa Ana

4.3.2 Muestra

Se realizó un muestreo dirigido y puntual a la quesería de Metapán. Se consideró a criterio de los autores el muestreo de dieciséis quesos frescos tomados al azar de un mismo lote, distribuidos de la siguiente manera:

- Cinco quesos frescos fueron utilizados para realizar la evaluación de los Criterios Microbiológicos según el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA

67.04.50:08 para el 1.0 Grupo de Alimento: Leche y productos lácteos; 1.9 Subgrupo del alimento: Quesos frescos, no madurados y requesón (Ver Anexo N° 15, Figura N°29).

-Se seleccionaron cinco quesos frescos para la realización del Primer Ensayo de Bioconservación *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ 10^6 UFC/mL frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 10^3 UFC/mL.

-Se tomaron otros cinco quesos frescos para la realización del Segundo Ensayo de Bioconservación *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ 10^7 UFC/mL frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 10^5 UFC/mL.

-El queso fresco restante fue utilizado para comparar los ensayos de Bioconservación y determinar el mejor tiempo de vida en anaquel.

4.4 Instrumento de medición

Se utilizó una lista de chequeo para evaluar las Buenas Prácticas Higiénicas empleadas en la quesería de Metapán para la elaboración de los quesos frescos, tomando en cuenta seis aspectos, los cuales tienen una nota asignada de acuerdo al cumplimiento o no del aspecto, posteriormente se le asignó el porcentaje de acorde a cada nota expresada (Ver Anexo N°2).

4.5 Identificación de la muestra

Se identificaron las muestras con: Número de grupo, código de la muestra, tipo de muestra, fecha y hora de recolección de la muestra, persona que toma la muestra y testigo (Ver Anexo N°3, Figura N°16).

4.6 Transporte de la muestra ⁽¹⁰⁾

Se Colocaron los quesos frescos en bolsas estériles y fueron transportados en hieleras a una Temperatura aproximada de 2°C y llevados al Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD). Se Refrigeraron a Temperaturas de 5 - 8°C y fueron analizados inmediatamente, no sobrepasando 24 horas después de ser colocadas en refrigeración (Ver Anexo N°4, Figura N°17).

4.7 Parte experimental

Los análisis se realizaron, en el Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador (Ver Anexo N°5, Figura N°18).

Se realizaron los siguientes análisis:

-Establecer los Criterios Microbiológicos según Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.50:08) para el 1.0 Grupo de alimento: Leche y productos lácteos; 1.9 Subgrupo del alimento: Quesos frescos, no madurados y requesón, los cuales fueron: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*.

-Primer Ensayo de Bioconservación *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ 10⁶ UFC/mL frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 10³ UFC/mL.

-Segundo Ensayo de Bioconservación *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ 10⁷ UFC/mL frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 10⁵ UFC/mL

-Determinación de pH, olor y color en las muestras de quesos frescos y en el queso patrón para obtener la vida en anaquel para las muestras.

4.7.1 Identificación de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 ⁽⁹⁾

La cepa patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19118, fue proporcionada por una Institución de Mantenimiento de cepas en medio *Listeria* Cromogénico (Medio selectivo para el aislamiento e identificación presuntiva de *Listeria spp* y *Listeria monocytogenes* recomendado en la ISO 11290-1 para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* en alimentos). Está perfectamente identificada, caracterizada, estandarizada y guardada en crioviales para luego ser utilizada en los dos ensayos de Bioconservación.

4.7.1.1 Pruebas API para la Identificación de *Listeria* ⁽¹⁶⁾

- Preparación de la galería API *Listeria*

La galería API *Listeria* consta de 10 microtubos que contienen substratos deshidratados y permiten la realización de ensayos enzimáticos o de fermentación de azúcares. Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, bien espontáneos o bien provocados mediante la adición de reactivos. La lectura de estas reacciones se realiza con la ayuda de la Tabla de identificación y la interpretación se realiza tras consultar la lista de perfiles de la ficha técnica o con la ayuda de un software de identificación. Pasos para su preparación:

-Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 mL de agua destilada o desmineralizada en los alveolos, para crear la atmósfera húmeda.

- Escribir la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara.
- Sacar la galería API *Listeria* de su envase individual.
- Colocar la galería API *Listeria* en la cámara de incubación.

- **Preparación del inóculo**

- Transferir colonias aisladas de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en agar TSAYE a un tubo que contenga 10 mL de solución salina estéril.
- Realizar una suspensión de turbidez igual a 1 de McFarland. Debe utilizarse de inmediato.
- Observar el tipo de hemólisis y anotarlo en la hoja de resultados, ya que esta característica constituye un ensayo adicional.

- **Inoculación de la galería API *Listeria***

Cada microtubo de la galería API *Listeria* consta de un tubo (parte inferior) y una cúpula (parte superior).

- Repartir la suspensión bacteriana precedente en los tubos, evitando la formación de burbujas (para ello inclinar la cámara de incubación hacia adelante y colocar la pipeta en un lado de la cúpula)
- Llenar el tubo y la cúpula del ensayo DIM (100µL aproximadamente), cuidando que no se produzca un menisco convexo.
- Llenar solamente la parte de los ensayos ESC a TAG (50 µL aproximadamente).
NOTA: La calidad de llenado es muy importante: Los tubos excesiva o insuficientemente llenos originan de resultados falsos positivos o negativos.
- Cerrar la cámara de incubación
- Incubar de 18-24 horas a $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en atmósfera aerobia (Ver Anexo N°6, Figura N°19).

- **Lectura de la galería API *Listeria***

- Agregar una gota de reactivo ZYM B al ensayo DIM
- Pasados 3 minutos leer todas las reacciones haciendo referencia a la Tabla de identificación de la ficha técnica.
- Anotar las reacciones de positivo – negativo en la hoja de resultados (Ver Anexo N°7, Figura N°20)
- Anotar igualmente el tipo de hemólisis. El resultado de este ensayo no se tiene en cuenta en la interpretación de la galería API *Listeria*.

- **Interpretación**

- La identificación se obtiene a partir del perfil numérico.
- Determinación del perfil numérico:
 - En la hoja de resultados, los tests están separados en grupos de 3 y se asigna para cada uno valor 1, 2 ó 4.
 - Sumando en el inferior de cada grupo los números que corresponden a reacciones positivas, se obtienen 4 cifras que constituye el perfil numérico

- **Identificación**

Se realiza a partir de la base de datos. Con la ayuda del perfil numérico:

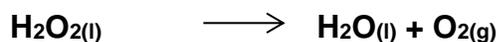
- Localizar el perfil numérico en la lista de la ficha técnica; esta lista no es exhaustiva, en caso de un perfil inexistente, consultar en el programa informático citados o con la Asistencia Técnica de bioMérieux.
- Por medio del software de identificación apiweb™: Introducir manualmente por teclado el perfil numérico de 4 cifras.

4.7.1.2 Tinción gram de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 ⁽¹⁶⁾

- Tomar una colonia aislada de una placa de TSAYE inoculada con *Listeria monocytogenes* ATCC 19118.
- Suspender la colonia de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118, en un portaobjetos que contiene una gota de solución salina y flamear en mechero para fijar la bacteria.
- Agregar suficiente cristal violeta en el frotis y esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Adicionar suficiente lugol en el frotis y esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Agregar suficiente alcohol - cetona en el frotis y lavar con agua destilada inmediatamente.
- Adicionar suficiente safranina en el frotis y esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100X). *Listeria monocytogenes* ATCC 19118, es un bacilo corto gram (+) (Ver Anexo N°8, Figura N°21).

4.7.1.3 Prueba de la catalasa ⁽¹⁶⁾

- Seleccionar una colonia típica de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 de la placa de TSAYE con un palillo estéril.
- Colocar una gota de Peróxido de Hidrógeno al 3% en un portaobjeto y suspender la colonia típica de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118. Un burbujeo en los primeros segundos indica reacción positiva, como se puede ver a continuación (Ver Anexo N°9, Figura N°22).



4.7.1.4 Prueba de Henry (21)

- Colocar la placa de TSAYE inoculada con *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 sobre un aro metálico sostenido en un soporte.
- Colocar debajo de la placa un espejo.
- Alumbrar con una lámpara blanca hacia el espejo y permitir por refracción de la luz la iluminación de la placa.
- Una coloración de verde a azul indica prueba positiva para género *Listeria* (Ver Anexo N°10, Figura N°23).

4.7.1.5 Prueba de Camp (21)

- Estriar en placas de agar sangre *Staphylococcus aureus* β -hemolítico y *Rhodococcus equi*, en forma paralela (opuesto el uno del otro).
- Luego estriar el inóculo de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en forma paralela una de la otra pero en ángulo recto entre las estrías del *Staphylococcus aureus* y *Rhodococcus equi*.
- Incubar las placas de agar sangre inoculadas durante 24 – 48 horas a 35°C.
- Examinar las placas de agar sangre incubadas y observar la formación de flecha de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 al interaccionar con *Staphylococcus aureus* (Ver Anexo N°11, Figura N°24).

4.7.1.6 Singlepath® *Listeria monocytogenes* (24)

Singlepath® *Listeria monocytogenes*, es un test rápido inmunocromatográfico con anticuerpos marcados con oro. La unidad de test contiene una abertura redonda para cargar la muestra y un campo rectangular para el test (T) y el control (C). El fundamento del método es el siguiente:

- La muestra se aplica a través del orificio redondo sobre el papel cromatográfico.
- El contenido de la muestra es succionado a través del acolchado de papel hasta la zona de reacción sobre la que se han aplicado anticuerpos coloidales marcados con oro dirigidos contra *Listeria monocytogenes*.
- El antígeno de *Listeria monocytogenes* presente forma un complejo antígeno-anticuerpo. Éste migra desde la abertura a la zona del test (T).
- En la zona del test (T) se ha aplicado linealmente un segundo antígenoanticuerpo anti-*Listeria monocytogenes*. Éste fija el complejo antígeno-anticuerpo. Debido al marcado con oro se origina una línea recta coloreada de rojo.
- El resto de la muestra migra a una segunda zona de fijación en la zona de control (C) y forma allí una segunda línea coloreada de rojo (control positivo). Independientemente de la presencia de antígeno de *Listeria monocytogenes* se forma esta línea siempre en la zona de control (C) y muestra el correcto funcionamiento del test.

El procedimiento se detalla a continuación:

- De las placas de TSAYE inoculadas con *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 provenientes de los quesos frescos inoculados en los ensayos.
- Seleccionar las colonias aisladas *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 de y suspenderlas en 10 mL de solución salina estéril.
- Tomar de la suspensión de anterior 150µL y depositarlos en el orificio redondo sobre el papel cromatográfico. Observar que se marque la línea de color rosado del Control.
- Incubar las pruebas Singlepath® *Listeria monocytogenes* durante 24 horas a 35-37°C.

-Después del tiempo de incubación, observar la línea rosada de Prueba positiva para *Listeria monocytogenes* (Ver Anexo 12, Figura N°25).

4.7.1.7 Conservación de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 ^(1,8)

Para la conservación de la cepa patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19118, utilizar un sistema estéril de 2 mL de volumen. Este sistema es fabricado de polipropileno de rosca externa que resiste hasta -190°C, denominado criovial. El procedimiento es el siguiente.

- Agregar en el criovial 0.15 mL de glicerina estéril.
- Adicionar al criovial 1.5 mL de Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI).
- Seleccionar colonias típicas de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 de la placa de TSAYE suspenderla en el criovial.
- Congelar las células en suspensión con el Caldo BHI y el agente crioprotector guardando a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento. Cuando se quiere trabajar con las células así conservadas, se recuperan subiendo la temperatura (Ver Anexo N°13, Figura N°26).

4.7.2 Identificación de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU TM ⁽¹⁵⁾

La cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU TM fue proporcionada a partir de un cultivo liofilizado, el cual fue reanimado, caracterizado y estandarizado para posteriormente utilizarlo en los dos ensayos de Bioconservación.

4.7.2.1 Tinción gram de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™

- Tomar una colonia aislada de una placa de MRS inoculada con *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™
- Suspende la colonia de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ en un portaobjetos que contiene una gota de solución salina y flamear en mechero para fijar la bacteria (frotis).
- Agregar suficiente cristal violeta en el frotis y esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Adicionar suficiente lugol en el frotis y esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Agregar suficiente alcohol - cetona en el frotis y lavar con agua destilada inmediatamente.
- Adicionar suficiente safranina en el frotis y esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100X). *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ es un bacilo corto gram (+) (Ver Anexo N°14, Figura N°27).

4.7.3 Criterios Microbiológicos ⁽¹⁹⁾

Se verificaron los parámetros microbiológicos que establece el Reglamento Técnico Centroamericano para quesos frescos, con la finalidad de conocer la carga microbiana inicial que presentaban las muestras. (Ver Anexo N°15, Figura N°28)

4.7.3.1 Recuento de *Escherichia coli* ⁽¹⁹⁾

- Pesar 10 g de muestra en una bolsa estéril y agregar 90 mL de Agua Peptonada, agitar por 1 min 30 seg en un Stomacher (Dilución 10⁻¹).

- Devolver la dilución 10^{-1} al frasco y pipetear 1 mL y añadirlo a un tubo que contiene 90mL de agua peptonada y agitar (Dilución 10^{-2})
- Pipetear 1 mL de la dilución anterior y agregarlo a un tubo que contenga 90mL de agua peptonada y agitar (Dilución 10^{-3}).
- Inocular 1 mL de cada dilución en placas de Petri estériles. Por duplicado.
- Cubrir con 12 a 15 mL de agar Chromocult Coliformes.
- Mezclar con rotación en forma de ocho el contenido de las placas. Dejar solidificar.
- Cubrir con 3 – 4 mL del mismo agar la superficie de la placa para inhibir el crecimiento de las colonias en la superficie.
- Incubar las placas durante 24 horas a 35 – 37°C.
- Contar las colonias de color morado (Ver Anexo N°16, Figura N°30).

4.7.3.2 Recuento de *Staphylococcus aureus* (19)

- Pesar 10 g de queso fresco en una bolsa estéril y agregar 90 mL de Agua Peptonada (AP) contenida en un frasco y agitar por 1 minuto 30 segundos en un Stomacher (Dilución 10^{-1}).
- Adicionar 0.3, 0.3 y 0.4 mL de esta suspensión en tres diferentes placas que contienen agar Baird Parker
- Esparcir con un rastrillo y dejar secar durante unos minutos
- Incubar las placas durante 24 – 48 horas a 35 – 37°C.
- Observar el desarrollo de colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* de aspecto negro, brillante o gris oscuro, con formación de halo alrededor de las colonias. Contar las colonias utilizando un cuenta colonias.
- Seleccionar 5 colonias sospechosas y sembrar en Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI). Incubar durante 24 horas a 35 – 37°C.

- Después de la incubación sembrar en tubos con plasma e incubar durante 24 horas a 35 – 37°C.
- Observar la formación de un coagulo, que no se deshace al invertir el tubo. Esto indica prueba positiva para *Staphylococcus aureus* (Ver Anexo N°17, Figura N°31).

4.7.3.3 Determinación de *Salmonella spp* (19)

- Pesar 25 g de queso fresco en una bolsa estéril y adicionar aproximadamente 100 mL de 225 mL de caldo lactosado y agitar en Stomacher durante 1 min 30 seg. Transferir la muestra al erlenmeyer que contiene el resto de caldo lactosado y agitar (Dilución 10^{-1}).
- Incubar durante 24 horas a 35 – 37°C.
- De la dilución 10^{-1} pipetear 1 mL por duplicado y colocarlo uno en caldo Tetrionato y otro en Caldo Rapapport. Incubar durante 24 horas a 35°C.
- Tomar una asada y estriar en medios Salmonella-Shigella (SS), Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y Bismuto Sulfito (BS).
- Incubar las placas inoculadas durante 24 – 48 horas a 35°C. Observar la presencia de colonias de *Salmonella*: SS: Colonias traslúcidas, de color naranja claro con centro negro, XLD: Colonias rojas o traslúcidas con centro negro y BS: Colonias negras con brillo metálico
- Sembrar las colonias sospechosas en agar MacConkey e incubar durante 24 horas a 35°C. Observar colonias traslucidas (Ver Anexo N°18, Figura 32).
- Sembrar en pruebas Bioquímicas:

- TSI (TRIPLE SUGAR IRON)

-De las placas de TSA inoculadas con *Salmonella spp*, seleccionar colonias

aisladas con una asa en punta e introducirla en un tubo que contenga agar inclinado TSI, llevar el asa con inóculo hasta el fondo y luego estriar en la superficie del bisel.

-Incubar el tubo inoculado durante 24 horas a 35°C

-Una reacción positiva se observa cuando el medio cambia de color rojo a amarillo. Este cambio se observa por la fermentación de azúcares que produce la bacteria en el medio. El agar TSI permite evidenciar la producción de gas y H₂S (coloración negra).

- **CITRATO**

-De las placas de TSA inoculadas con *Salmonella spp* seleccionar las colonias aisladas con una asa en punta e introducirla en un tubo que contenga agar inclinado Citrato, llevar el asa con inóculo hasta el fondo y luego estriar en la superficie del bisel.

-Incubar el tubo inoculado durante 24 horas a 35°C

-Una reacción positiva se observa cuando el medio cambia de verde a azul. Este cambio ocurre cuando la bacteria utiliza el Citrato como única fuente de carbono y el amonio como única fuente de Nitrógeno.

- **MOTILIDAD**

-De las placas de TSA inoculadas con *Salmonella spp*, seleccionar colonias aisladas con una asa en punta e introducirla en un tubo que contenga el agar sólido MIO llevar el asa con inóculo hasta el fondo de manera suave y recta evitando mover el asa dentro del medio.

-Incubar el tubo inoculado durante 24 horas a 35°C

-Observar el desplazamiento en todo el agar y la coloración negra en el medio

- ROJO DE METILO

- De las placas de TSA inoculadas con *Salmonella spp*, seleccionar colonias aisladas con una asa redonda e introducirla en un tubo que contenga el medio MRVP llevar el asa con inóculo hasta el fondo de manera de depositar la bacteria.
- Incubar el tubo inoculado durante 24 horas a 35°C
- Agregar al tubo con la bacteria de 4-5 gotas del reactivo rojo de metilo
- Una coloración roja en el medio indica prueba positiva para *Salmonella spp*, una coloración amarilla en el medio indica prueba negativa.

- VOGES – PROSKAUER

- De las placas de TSA inoculadas con *Salmonella spp*, seleccionar colonias aisladas con una asa redonda e introducirla en un tubo que contenga el medio MRVP, llevar el asa con inóculo hasta el fondo de manera de depositar la bacteria.
- Incubar el tubo inoculado durante 24 horas a 35°C
- Agregar al tubo con la bacteria 10 gotas de α -naftol y 5 gotas de solución de Hidróxido de Potasio, agitando por un minuto.
- Una coloración roja (que aparece lentamente) indica un resultado positivo para *Salmonella spp.*

- INDOL

- De las placas de TSA inoculadas con *Salmonella spp*, seleccionar colonias aisladas con una asa redonda e introducirla en un tubo que contenga el medio Triptona-peptona, llevar el asa con inóculo hasta el fondo de manera de depositar la bacteria.

- Incubar el tubo con bacteria durante 24 horas a 35°C
- Agregar de 2-3 gotas del reactivo de Kovac
- La formación de un anillo de color rosado en la interfase indica prueba positiva (Ver Anexo N°19, Figura N°33).

Tabla N° 4. Resultados esperados en la identificación de *Salmonella spp.*

Prueba Bioquímicas	Resultado para <i>Salmonella spp</i>
TSI	Bisel de color rojo y fondo amarillo con H ₂ S
Citrato	Coloración verde o azul
Motilidad	Crecimiento en todo el medio coloración negra
Rojo de Metilo	Coloración roja en el medio
Voges- Proskauer	Coloración amarilla en el medio
Indol	Sin formación del anillo rosado en la interfase

4.7.3.4 Determinación de *Listeria monocytogenes* (19)

- Pesar 25 g de queso fresco en una bolsa estéril y adicionar aproximadamente 100 mL de 225 mL de Caldo de Enriquecimiento de *Listeria* (LEB) y agitar en Stomacher durante 1 minuto 30 segundos 230 rpm. Transferir la muestra al erlenmeyer que contiene el resto de caldo LEB y agitar (Dilución 10⁻¹).
- Incubar durante 24 – 48 horas a 30°C.
- Sembrar por duplicado en agar Oxford y Palcam por método de estría y agotamiento. Incubar las placas inoculadas durante 24 horas a 35°C y luego refrigerar las placas a 5 – 8°C por 24 horas más para óptimo crecimiento.
- Examinar macroscópicamente las colonias que crecieron en los medios selectivos Oxford y Palcam, y que representaron las características

principales como degradar la esculina, ser pequeñas y presentar borde entero y depresión central

- Sembrar las colonias sospechosas en agar TSAEY e incubar durante 24 horas a 35°C. Refrigerar durante 24 horas más para óptimo crecimiento.
- Realizar Tinción Gram y luego pruebas API *Listeria* (Ver Anexo N°20, Figura N°34).

4.7.4 Estandarización de la bacteria patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 ⁽¹⁵⁾

Realizar la estandarización de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 por método espectrofotométrico, en donde la turbidez de la suspensión bacteriana estará determinada por los valores de absorbancias a una longitud de onda de 620 nm. Utilizar solución salina estéril 0.5% con peptona de caseína 0.1% para la realización de las diluciones.

- A partir de un criovial de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118. Sembrar por método de estrías y agotamiento en Agar TSAYE e incubar la placa durante 24 horas a 37°C. Luego colocar la placa en refrigeración (5°C por 24 horas) para óptimo crecimiento.
- Preparar una solución madre, arrastrando las colonias presentes en el Agar TSAYE y suspenderlas con 10 mL solución salina estéril 0.5% con peptona de caseína 0.1%.
- Adicionar a un tubo con 10 mL de solución salina estéril 0.5% con peptona de caseína 0.1%, 1000 µL de solución madre y realizar respectiva lectura de la absorbancia, seguir agregando suspensión del microorganismo o diluyendo con solución salina estéril 0.5% con peptona de caseína 0.1%, según sea el caso, hasta obtener una absorbancia entre 0.3 a 0.4 (rango para gram

positivas) asumiendo que se obtiene en un rango de concentración de 0.5×10^8 a 1.5×10^8 .

- A partir de la concentración de 10^8 realizar 7 diferentes diluciones, se inocula con 1.0 mL de las siguientes diluciones 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , en cada una de dos placas de Petri, luego agregar 20.0 mL de agar TSAEY y homogenizar en forma de ocho, dejar solidificar. Incubar las placas a 35°C por 48 horas y posteriormente se realizar el recuento de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118.
- Se tomaran para el experimento las concentraciones 10^6 UFC/mL y 10^4 UFC/mL equivalentes en el queso fresco a 10^5 UFC/mL y 10^3 UFC/mL respectivamente de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 (Ver Anexo N°21, Figura N°35).

4.7.5 Estandarización de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™⁽¹⁵⁾

Realizar la estandarización de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ por método espectrofotométrico, en donde la turbidez de la suspensión bacteriana determinará los valores de absorbancia a una longitud de onda de 620 nm.

Procedimiento:

- Pesar 0.1 g de *Lactobacillus rhamnosus* (HOWARU™) y adicionarlo a un tubo (A) que contenga 10 ml de Caldo MRS y agitar vigorosamente.
- A partir del tubo anterior(A), tomar 1 ml de la suspensión de *Lactobacillus rhamnosus* (HOWARU™) y agregarlo a un tubo (B) que contenga 10 ml de solución salina estéril y agitarlo.
- Leer en un espectrofotómetro Ultravioleta visible la solución anterior a una longitud de onda de 620 nm, adicionando 1000 μl en la celda. Agregar suspensión de microorganismo (Tubo A) al Tubo B o solución salina estéril

para diluir según sea necesario para obtener valores de absorbancias para gram (+) entre 0.3-0.4 considerándose que la concentración de la solución es de 0.5×10^8 a 1.5×10^8 .

- Al obtener una concentración de 10^8 (Tubo B) realizar 8 diferentes diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}). Tomar de 1 ml de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y colocarlos en placas estériles haciéndolo por duplicado para cada dilución. Verter 20 ml de Agar MRS en cada placa y homogenizar en forma de ocho y dejar solidificar. Incubar las placas a 37°C , 5% CO_2 durante 48-72 horas. Realizar conteos de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ (Ver Anexo N°22, Figura N°36).
- Se tomaran para el experimento las concentraciones 10^9 UFC/mL y 10^8 UFC/mL equivalentes en el queso fresco a 10^7 UFC/mL y 10^6 UFC/mL respectivamente de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ (Ver Anexo N°22, Figura N°36).

4.7.6 Primer ensayo de Bioconservación *Lactobacillus rhamnosus*

**HOWARU™ 10^6 UFC/g frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 19118
 10^3 UFC/g ⁽¹⁵⁾**

La bioconservación puede definirse como el uso de sistemas biológicos (microorganismos, sus productos metabólicos, enzimas) para mejorar la seguridad alimentaria y para extender la vida útil de alimentos.

En este ensayo se utilizó una bacteria probiótica frente a una cepa patógena con la finalidad de inhibir el crecimiento de esta última y al mismo tiempo lograr una conservación en los quesos frescos.

4.7.6.1 Recuento de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 ⁽¹⁹⁾

- Seleccionar 5 quesos frescos.

- Pesar 5 veces 5 g de queso fresco en diferentes bolsas estériles para cada tiempo de análisis (día 0, 3, 5, 8 y 15). Realizar este mismo procedimiento para cada muestra.
- Inocular todas las bolsas con las muestras de queso fresco con 0.2 mL de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 10^4 UFC/mL equivalente a 10^3 UFC/g y 0.2 mL de *Lactobacillus rhamnosus* (HOWARU™) 10^8 UFC/mL equivalente a 10^6 UFC/g en los quesos frescos (Ver Anexo N°23, Figura N°37).
- Seleccionar las bolsas rotuladas como día 0 para cada queso fresco y adicionar aproximadamente 25 mL de un Erlenmeyer que contiene 50 mL de Caldo LEB y agitar durante 1 minuto 30 segundos a 230 rpm en un Stomacher.
- Devolver el contenido de cada bolsa al Erlenmeyer que contiene el resto de Caldo LEB y agitar.
- Incubar el Caldo LEB con la muestra durante 1 hora a 35°C.
- Pipetear 0.1mL de cada muestra y agregarla a una placa que contiene agar Oxford y esparcir el inóculo con un rastrillo estéril por toda la placa.
- Incubar las placas inoculadas durante 24 horas a 35°C. Transcurrido este tiempo refrigerar las placas por 24 horas más a 5 – 8°C.
- Examinar macroscópicamente las colonias que crecieron en el medio selectivos Oxford , y que presentaron las características principales como degradar la esculina, ser pequeñas y presentar borde entero y depresión central; Sembrar las colonias aisladas en TSAYE (agar tripticasa soya-extracto de levadura) para la realización de las pruebas de identificación de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118.
- Realizar este mismo procedimiento para el recuento de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 para los días 3, 5, 8 y 15 (Ver Anexo N°23, Figura N°38).

4.7.6.2 Recuento de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ (15)

- Utilizar los mismos quesos del recuento de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118.
- Pesar 5 veces 10 g de queso fresco en diferentes bolsas estériles para cada tiempo de análisis (día 0, 3, 5, 8 y 15). Realizar este mismo procedimiento para cada muestra.
- Inocular todas las bolsas con las muestras de queso fresco con 0.4 mL de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 10^4 UFC/mL equivalente a 10^3 UFC/g y 0.4 mL de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ 10^8 UFC/mL equivalente a 10^6 UFC/g en los quesos frescos.
- Seleccionar las bolsas rotuladas como día 0 para cada queso fresco y adicionar 90 mL de Agua Peptonada (AP) contenida en un frasco y agitar durante 1 minuto 30 segundos a 230 rpm en un Stomacher.
- Devolver el contenido de cada bolsa al frasco (Dilución 10^{-1}). Homogenizar.
- Pipetear de la Dilución 10^{-1} 1 mL y agregarlo a un tubo que contiene 9 mL de AP (Dilución 10^{-2}). Homogenizar.
- De la Dilución 10^{-2} pipetear 1 mL y agregarlo a un tubo que contiene 9 mL de AP (Dilución 10^{-3}). Homogenizar.
- De la Dilución 10^{-3} pipetear 1 mL y agregarlo a un tubo que contiene 9 mL de AP (Dilución 10^{-4}). Homogenizar.
- De la Dilución 10^{-4} pipetear 1 mL y agregarlo a un tubo que contiene 9 mL de AP (Dilución 10^{-5}). Homogenizar.
- Transferir 1 mL de cada dilución a dos placas Petri y agregar 20 mL aproximadamente de agar MRS en cada placa. Homogenizar en forma de ocho y dejar solidificar. Incubar en anaerobiosis atmósfera de CO_2 al 5% por 48 a 72 horas.

- Realizar este mismo procedimiento en los días 3, 5, 8 y 15 (Ver Anexo N°23, Figura N°39)

4.7.7 Segundo ensayo de Bioconservación *Lactobacillus rhamnosus*

**HOWARU™ 10⁷ UFC/g frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 19118
10⁵ UFC/g⁽¹⁵⁾**

En este ensayo se utilizó una bacteria probiótica frente a una cepa patógena con la finalidad de inhibir el crecimiento de esta última y al mismo tiempo lograr una conservación en los quesos frescos.

4.7.7.1 Recuento de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118⁽¹⁹⁾

- Seleccionar 5 quesos frescos.
- Pesar 5 veces 5 g de queso fresco en diferentes bolsas estériles para cada tiempo de análisis (día 0, 3, 5, 8 y 15). Realizar este mismo procedimiento para cada muestra.
- Inocular todas las bolsas con las muestras de queso fresco con 0.2 mL de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 10⁶ UFC/mL equivalente a 10⁵ UFC/g y 0.2 mL de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ 10⁹ UFC/mL equivalente a 10⁷ UFC/g en los quesos frescos (Ver Anexo N°24, Figura N°40).
- Seleccionar las bolsas rotuladas como día 0 para cada queso fresco y adicionar aproximadamente 25 mL de un Erlenmeyer que contiene 50 mL de Caldo LEB y agitar en durante 1 minuto 30 segundos a 230 rpm en un Stomacher.
- Devolver el contenido de cada bolsa al Erlenmeyer que contiene el resto de Caldo LEB y agitar.

- Incubar el Caldo LEB con la muestra durante 1 hora a 35°C.
- Pipetear 0.1mL de cada muestra y agregarla a una placa que contiene agar Oxford y esparcir el inóculo con un rastrillo estéril por toda la placa.
- Incubar las placas inoculadas durante 24 horas a 35°C. Transcurrido este tiempo refrigerar las placas por 24 horas más a 5 – 8°C.
- Examinar macroscópicamente las colonias que crecieron en el medio selectivo Oxford, y que representaron las características principales como degradar la esculina, ser pequeñas y presentar borde entero y depresión central; Sembrar las colonias aisladas en TSAYE (agar tripticasa soya-extracto de levadura) para la realización de las pruebas de identificación de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118.
- Realizar este mismo procedimiento para el recuento de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 para los días 3, 5, 8 y 15 (Ver Anexo N°24, Figura N°41).

4.7.7.2 Recuento de *Lactobacillus rhamnosus* (HOWARU™) (15)

- Utilizar los mismos quesos del recuento de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118.
- Pesar 5 veces 10 g de queso fresco en diferentes bolsas estériles para cada tiempo de análisis (día 0, 3, 5, 8 y 15). Realizar este mismo procedimiento para cada muestra.
- Inocular todas las bolsas con las muestras de queso fresco con 0.4 mL de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 10^6 UFC/mL equivalente a 10^5 UFC/g y 0.4mL de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ 10^9 UFC/mL equivalente a 10^7 UFC/g
- Seleccionar las bosas rotuladas como día 0 para cada queso fresco y adicionar 90mL de Agua Peptonada (AP) contenida en un frasco y agitar durante 1 minuto 30 segundos a 230 rpm en un Stomacher.

- Devolver el contenido de cada bolsa al frasco (Dilución 10^{-1}). Homogenizar.
- Pipetear de la Dilución 10^{-1} 1 mL y agregarlo a un tubo que contiene 9mL de AP (Dilución 10^{-2}). Homogenizar.
- De la Dilución 10^{-2} pipetear 1 mL y agregarlo a un tubo que contiene 9mL de AP (Dilución 10^{-3}). Homogenizar.
- De la Dilución 10^{-3} pipetear 1 mL y agregarlo a un tubo que contiene 9mL de AP (Dilución 10^{-4}). Homogenizar.
- De la Dilución 10^{-4} pipetear 1 mL y agregarlo a un tubo que contiene 9mL de AP (Dilución 10^{-5}). Homogenizar.
- De la Dilución 10^{-5} pipetear 1 mL y agregarlo a un tubo que contiene 9mL de AP (Dilución 10^{-6}). Homogenizar.
- Transferir 1 mL de cada dilución a dos placas Petri y agregar 20 mL aproximadamente de agar MRS en cada placa. Homogenizar en forma de ocho y dejar solidificar. Incubar en anaerobiosis atmósfera de CO_2 al 5% por 48 a 72 horas.
- Realizar este mismo procedimiento en los días 3, 5, 8 y 15 (Ver Anexo N°24, Figura N°42).

4.7.8 Determinación de pH ⁽¹⁸⁾

La determinación del pH se realizó para los ensayos de Bioconservación en los periodos de tiempo 0, 3, 5, 8 y 15 días.

4.7.8.1 Preparación de la muestra

- Pesar 1 g de queso fresco y adicionar 0.04 mL de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 10^4 UFC/mL y *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 10^6

UFC/mL, simultáneamente agregar 0.04 mL de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ 10⁸ UFC/mL y *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ 10⁹ UFC/mL para el primer (Ver Anexo N° 22, Figura N° 35) y segundo ensayo (Ver Anexo N° 23, Figura N° 38) respectivamente. Realizar este procedimiento para cada una de las muestras y para todos los tiempos de análisis 0, 3, 5, 8 y 15 días.

- Agregar la muestra de queso fresco correspondiente al día de análisis 5 mL de agua destilada libre de CO₂, contenida en un beaker y homogenizar (Ver Anexo N°25, Figura N°43).

4.7.8.2 Limpieza del equipo pH-metro Crison GLP 22

- Liberar el electrodo de la solución de almacenamiento.
- Lavar el electrodo con agua destilada con ayuda de una pizeta, recolectando el agua en un Beacker de plástico que servirá como descarte.
- Secar el electrodo con papel absorbente.

4.7.8.3 Calibrar el equipo

- Encender el equipo.
- Colocar el electrodo limpio dentro del frasco que contiene la solución buffer de pH 4 (4.01) hasta cubrir el diafragma que se observa en la parte inferior del electrodo.
- Presionar Ent. y esperar a que aparezca la lectura en la pantalla.
- Verificar que la lectura sea la correcta.
- Limpiar el electrodo según pasos del 4.7.8.2.
- Realizar los mismos pasos del procedimiento del buffer pH 4 para el buffer pH 7.
- Verificar en la pantalla que el procedimiento se realizó correctamente.

- Si no se obtienen los datos esperados repetir el procedimiento o es muy probable que se necesite un cambio de soluciones buffer.

Nota: La calibración tiene una duración de 24 horas, al haber transcurrido este tiempo será necesario llevar a cabo el proceso nuevamente.

4.7.8.4 Medir pH

- Con el equipo ya calibrado aparecerá en la pantalla la leyenda "MEDIR pH".
- Colocar el electrodo limpio dentro del frasco que contenga la muestra a analizar verificando que cubra el diafragma que se observa en la parte inferior del electrodo.
- Presionar Ent. y esperar a que aparezca la lectura en la pantalla.
- Presionar Ent. nuevamente para cambiar de muestra.
- Limpiar el electrodo según paso 4.7.8.2.

4.7.9 Determinación de color ⁽¹⁵⁾

El color es el atributo de la respuesta a la luz percibida de un observador real al estímulo de un sistema visual por la energía radiante.

4.7.9.1 Técnica de color percibido ⁽¹⁵⁾

- Tomar 25 g de muestra y queso patrón, colocándolos en un vidrio de reloj.
- Llevar la muestra a un espacio con suficiente luz.
- Observar el color y anotar lo percibido a las 0, 3, 5, 8 y 15 días.

4.7.10 Determinación del olor de la muestra ⁽¹⁴⁾

Realizar a través de la identificación de todos los olores constitutivos del efluvia liberado por el queso y se le atribuirá un nivel de intensidad de los olores preestablecidos según el Manual del Instituto Nacional de Tecnología Industrial de la Unión Europea basado en la evaluación sensorial de quesos de oveja y cabra. La determinación del olor se realizará para los ensayos de Bioconservación en los periodos de tiempo 0, 3, 5, 8 y 15 días.

- **Técnica de evaluación** ⁽¹⁴⁾
- Oler varias veces la muestra de queso con mucha atención, una vez abierta la bolsa que lo contiene.
- Marcar como máximo 2 categorías para clasificar mentalmente los olores sensoriales identificados por la memoria, simultáneamente atribuir una intensidad a cada olor percibido, marcando una de las tres categorías: débil, media, elevada.

Tabla N° 5. Posibles olores que se puedan percibir en la muestra de queso fresco y la intensidad que presentan.

Olor	Marcar (x)	Categoría (x)		
		Débil	Media	Elevada
Láctico fresco				
Láctico cocido				
Láctico acidificado				

4.7.11 Determinación de la vida de anaquel de los quesos frescos

Comparar el queso fresco patrón con los quesos frescos utilizados en los ensayos, evaluando los criterios de pH, color y olor para determinar la mejor vida en anaquel del producto.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Lista de chequeo para verificar las buenas prácticas de higiene empleadas en una quesería de Metapán en la elaboración de los quesos frescos (Ver Anexo N°2)

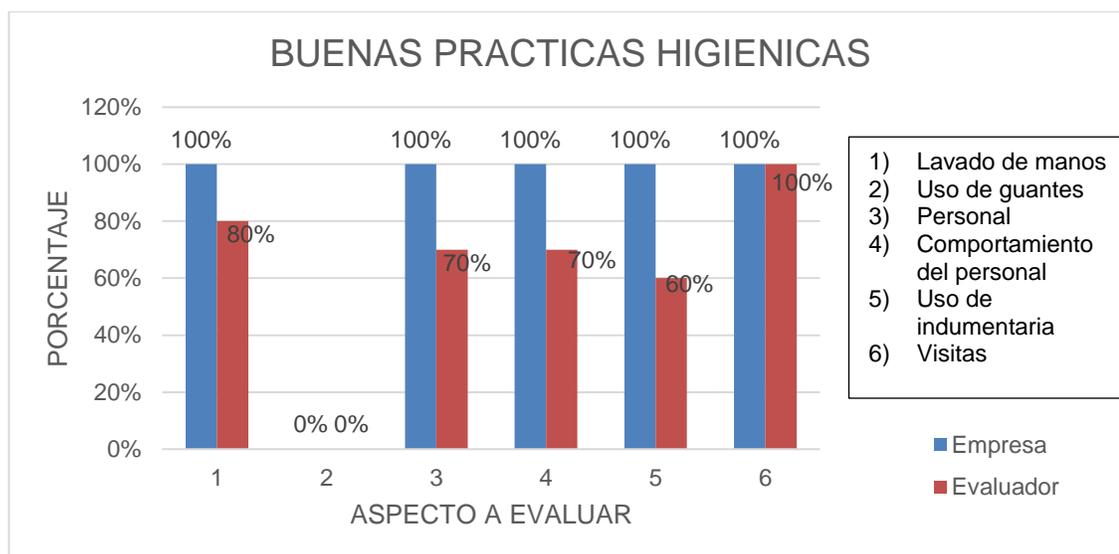


Figura N°1. Representación gráfica de la Lista de Chequeo de Buenas Prácticas Higiénicas adecuadas según el Manual de Buenas Prácticas de Manufactura.

La figura N°1 representa los resultados de la evaluación realizada en la quesería de Metapán (Ver Anexo N°2) muestra una comparación de la observación realizada por la propietaria de la quesería según su criterio cómo ve el cumplimiento, nivel de exigencia de Buenas Prácticas Higiénica; por otra parte está el criterio de las responsables de la investigación.

Aspecto N°1: Nivel de exigencia del correcto lavado de manos con jabón antibacterial al ingresar al área de procesamiento, antes y después de manipular las materias primas crudas utilizadas para la elaboración del queso fresco y

después de llevar a cabo cualquier actividad no laboral (beber, comer, ir al servicio sanitario, etc.). Para la propietaria la quesería cumple en un 100% dicho aspecto; mientras que, los analistas observaron que se cumple en un 80% este requerimiento.

Aspecto N°2: La utilización de guantes desechables y no desechables en la planta de procesamiento. Este aspecto se reporta en un 0% debido a que no se usan ningún tipo de guantes para la elaboración de los quesos frescos.

Aspecto N°3: Evaluación de los Hábitos Higiénicos del personal que labora en la planta que debe cumplir requerimientos como: mantener uñas de las manos cortas, limpias y sin esmalte, no portar prendas como anillos, aretes, relojes o cualquier otro objeto que pueda tener contacto con el producto que se elabora, los operarios deben mantener bigotes y barbas recortadas y cubiertas con cubre bocas, cabello recogido y cubierto con gorro y el uso prohibido de maquillaje, uñas y pestañas postizas. La propietaria consideró en un 100% el cumplimiento de este aspecto; en cambio los analistas determinaron que se cumple en un 70%.

Aspecto N°4: Los empleados no realizan actividades como: fumar, escupir, masticar goma, comer, estornudar y toser, al momento de la elaboración de los quesos frescos. La propietaria afirma que en un 100% los empleados evitan este comportamiento dentro del área de manufactura; mientras que, los evaluadores observaron que una de las operarias mascaba goma en su área de trabajo, por lo que se asigna un 70% de cumplimiento de este aspecto.

Aspecto N°5: Utilización de uniforme y calzado adecuado, gorro, ropa protectora y mascarilla. La propietaria de la quesería manifestó que cumplen en un 100% con este requerimiento; en cambio, los evaluadores consideraron que en 60% cumplen con este aspecto.

Aspecto N°6: Cumplimiento de las normas de comportamiento y disposiciones establecidas por la quesería en cuanto a la entrada de visitas al área de procesamiento, con el fin de evitar la contaminación de los alimentos. La propietaria no permite la entrada de visitas al área, por lo que cumple en un 100% las disposiciones establecidas por la quesería. Los evaluadores consideraron que este aspecto se cumple en un 100%.

5.2 Determinación de la calidad microbiológica inicial de los quesos frescos obtenidos de la quesería, según los Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos del Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.50:08) para el 1.0 Grupo de alimento: Leche y productos lácteos; 1.9 Subgrupo del alimento: Quesos frescos, no madurados y requesón.

Tabla N°6. Resultados promedios de Calidad Microbiológica inicial de los quesos frescos de la quesería de Metapán.

Parámetro	Límite máximo permitido	Resultado promedio de los quesos frescos	Observación
<i>Escherichia coli</i>	<10 UFC/g	>590,000 UFC/g	Presencia de Coliformes Totales.
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ³ UFC/g	>590,000 UFC/g	Coagulasa positiva.
<i>Listeria monocytogenes/25g</i>	Ausencia	Ausencia	-
<i>Salmonella spp/25g</i>	Ausencia	Presencia	Pruebas Bioquímicas positivas

La tabla N°6 refleja los resultados iniciales promedio, obtenidos de la evaluación de los criterios microbiológicos realizados a los quesos frescos; los cuales muestran para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* un valor mayor a 590,000 UFC/g, observándose además el crecimiento de coliformes totales y

coagulasa positiva en la prueba confirmatoria para *Staphylococcus aureus*. Asimismo, se determinó la presencia de *Salmonella spp* comprobándose esta con la realización de las pruebas bioquímicas en las muestras. Por lo tanto, los quesos frescos analizados sobrepasan los límites máximos permitidos para dicha bacteria según RTCA 67.04.50:08. Sin embargo, no se encontró la presencia de *Listeria monocytogenes* en los quesos frescos analizados

5.3 Estandarización de la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* (10^6 UFC/mL y 10^7 UFC/mL) y la cepa patógena *Listeria monocytogenes* (10^3 UFC/mL y 10^5 UFC/mL) adicionadas a los quesos frescos, comprobando su sobrevivencia a 0, 3,5, 8 y 15 días.

5.3.1 Resultados de la estandarización de la cepa patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19118

Tabla N°7. Estandarización de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118

Concentración	Promedio de Unidades Formadoras de Colonias(UFC)	Factor dilución	Concentración Real (UFC/mL)
10^1	1.1×10^2	1×10^6	1×10^8
10^2	7.2×10^2	1×10^7	7.2×10^9
10^3	2.2×10^3	1×10^8	2.2×10^{11}
		Promedio de la concentración de la solución madre	7.6×10^{10}

La Tabla N° 7 refleja los resultados de la estandarización de la bacteria patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 a una longitud de onda de 620 nm en un Espectrofotómetro ultravioleta visible, obteniéndose un valor de absorbancia de

0.370 correspondiente a la primera dilución de la bacteria. A través de los recuentos en las ultimas diluciones, se determinó el valor de concentración de 7.6×10^{10} UFC/mL para la suspensión madre. A partir de esta suspensión se realizaron una serie de diluciones hasta obtener las concentraciones equivalentes a 7.6×10^5 UFC/mL equivalente a 7.6×10^3 UFC/mL y 7.6×10^7 UFC/mL equivalente a 7.6×10^5 UFC/mL las cuales fueron inoculadas en los quesos frescos del primer y segundo ensayo de Bioconservación. (Ver Anexo N°21, Figura N°35).

5.3.2 Resultado de la Estandarización de la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™

Tabla N°8. Estandarización de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™

Concentración	Promedio de Unidades Formadoras de Colonias(UFC)	Factor dilución	Concentración Real
10^1	8	1×10^6	8×10^6
10^2	8.1×10^2	1×10^7	8.1×10^9
10^3	2.5×10^2	1×10^8	2.5×10^{10}
-	-	Promedio de la concentración de la solución madre	1.1×10^{10}

La Tabla N°8 refleja los resultados de la estandarización de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ a una longitud de onda de 620 nm en un Espectrofotómetro ultravioleta visible, obteniéndose un valor de absorbancia de 0.328 correspondiente a la primera dilución de la bacteria. A través de los recuentos en las ultimas diluciones, se determinó el valor de concentración de

1.1×10^{10} UFC/mL para la suspensión madre. A partir de esta suspensión se realizaron una serie de diluciones hasta obtener las concentraciones de 1.1×10^8 UFC/mL equivalente a 1.1×10^6 UFC/mL y 1.1×10^9 UFC/mL equivalente a 1.1×10^7 UFC/mL, las cuales fueron inoculadas en los quesos frescos para el primer y segundo ensayo de Bioconservación respectivamente (Ver Anexo N°22, Figura N°36)

5.3.3 Sobrevivencia de *Lactobacillus rhamnosus* y *Listeria monocytogenes* a los 0,3,5,8 y 15 días en los quesos frescos inoculados en el primer ensayo de Bioconservación.

5.3.3.1 Recuentos de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ en los días 0,3, 5, 8 y 15 días

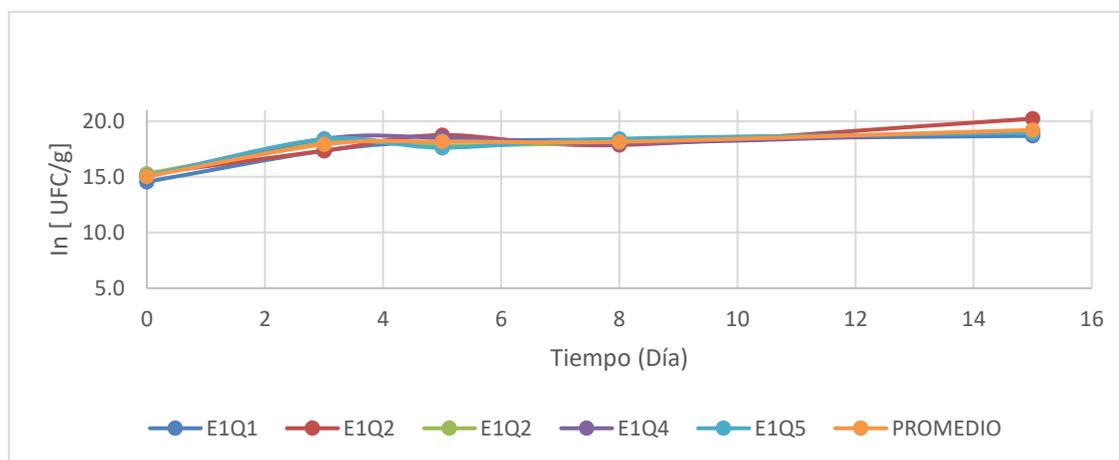


Figura N°2. Representación gráfica de los recuentos en los quesos frescos de la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ en el primer ensayo de Bioconservación.

La figura N°2 representa la sobrevivencia de la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ durante los días 0, 3, 5, 8 y 15 de muestreo. La gráfica refleja que para el queso fresco E1Q1, la bacteria aumento dos logaritmos de su

concentración inicial hasta el día tres, uno, en el día cinco, manteniéndose este mismo hasta el día ocho, en el día quince aumento un logaritmo más. En el queso fresco E1Q2 aumento dos logaritmos de su concentración inicial hasta el día tres y dos más hasta el día cinco, pero disminuyo uno para el día ocho y aumento nuevamente dos hasta el día quince. En el caso de E1Q4 la cepa probiótica incremento tres logaritmos desde su concentración inicial hasta el día tres, en el día cinco aumenta un logaritmo más, pero, para el día ocho disminuye uno y aumenta nuevamente uno hasta el día quince. Por otro lado, los quesos frescos E1Q3 y E1Q5 muestran un comportamiento parecido, puesto que aumentan tres logaritmos desde su concentración inicial hasta el día tres, se mantienen en el mismo logaritmo los días cinco y ocho y aumentan uno en el día quince (Ver Anexo N°25, Tabla N°19).

5.3.3.2 Recuento de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en los días 0, 3, 5, 8 y 15 días

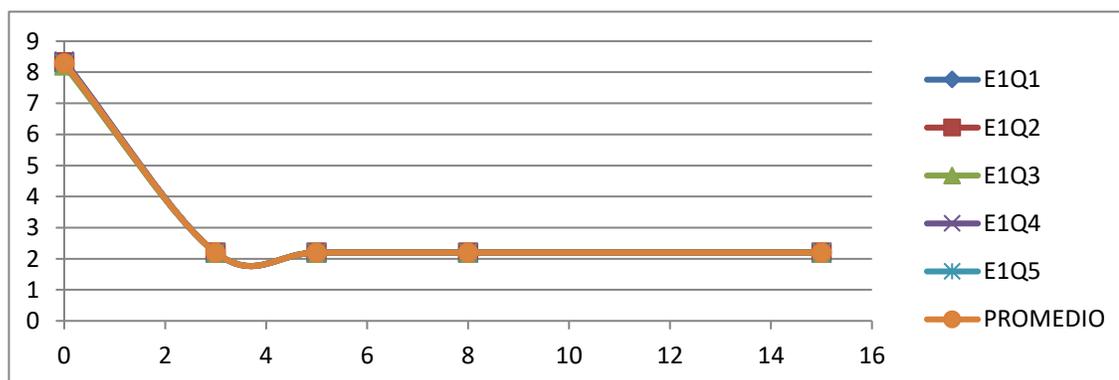


Figura N°3. Representación gráfica de los recuentos en los quesos frescos de la cepa patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en el primer ensayo de Bioconservación

La figura N° 3 representa la sobrevivencia de la cepa patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en los días 0, 3, 5, 8 y 15 días. La gráfica refleja

que la bacteria disminuyó seis logaritmos desde su concentración inicial hasta el día tres, en los días cinco, ocho y quince no se determinó un recuento significativo para ninguno de los quesos frescos, puesto que, este fue menor a 10 UFC/ g (Ver Anexo N°27, Tabla N°20)

5.3.3.3 Recuentos promedios de la sobrevivencia de la cepa patógena y cepa probiótica en el primer ensayo de Bioconservación.

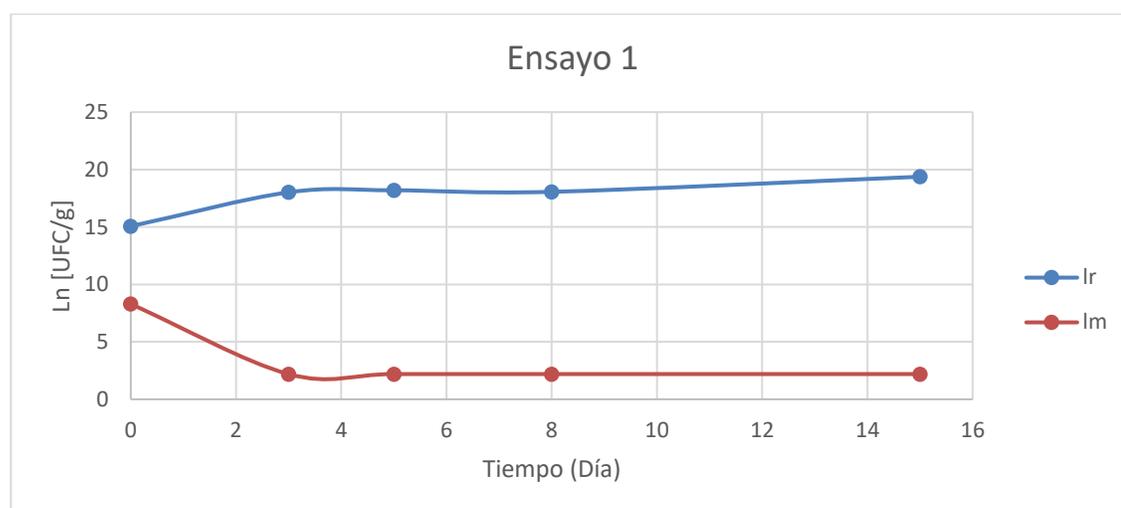


Figura N°4. Representación gráfica de los recuentos promedios de la sobrevivencia de la cepa patógena y cepa probiótica en el primer Ensayo de Bioconservación

La figura N°4 representa los recuentos promedios de los cinco quesos frescos inoculados con la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ y la cepa patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en el primer ensayo de Bioconservación. Como se puede observar la bacteria *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 disminuye seis logaritmos desde su concentración inicial en el tercer día, consecuentemente en los días 3, 5, 8 y 15 la bacteria no presenta crecimiento; por otro lado, *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ aumenta tres

logaritmos desde su concentración inicial en el día tres, manteniéndose en este mismo el día cinco y ocho, en el día quince aumenta un logaritmo más (Ver Anexo N°28, Tabla N°21)

5.3.4 Sobrevivencia de *Lactobacillus rhamnosus* y *Listeria monocytogenes* a los 0, 3, 5, 8 y 15 días en los quesos frescos inoculados en el segundo ensayo de Bioconservación

5.3.4.1 Recuentos de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ en los días 0, 3, 5, 8 y 15 días

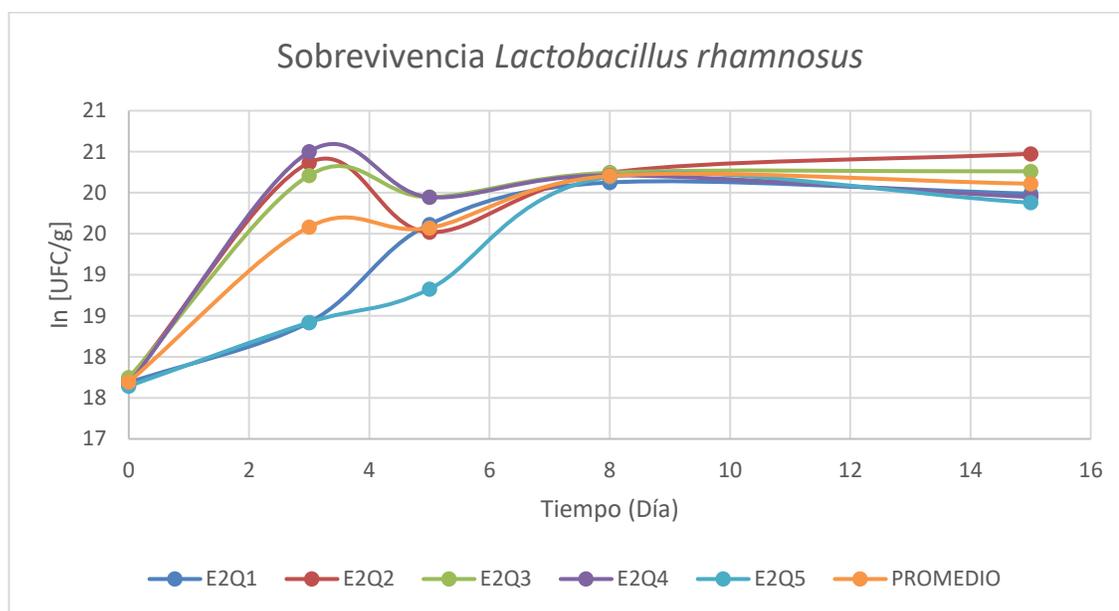


Figura N°5. Representación gráfica de los recuentos en los quesos frescos de la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ en el segundo ensayo de Bioconservación.

La figura N°5 representa la sobrevivencia de la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus*, HOWARU™ durante los días 0, 3, 5, 8 y 15 de análisis. La gráfica

refleja que para el queso fresco E2Q1, la bacteria aumento dos logaritmos de su concentración inicial hasta el día tres, luego incrementa dos logaritmos más el día cinco, manteniéndose en este mismo el día ocho y quince. En el caso de los quesos E2Q2 y E2Q3 aumentaron dos logaritmos desde su concentración inicial, manteniéndose en el mismo, el día cinco, ocho y quince. El queso fresco E2Q4 aumenta tres logaritmos en el día tres, pero, disminuye uno en el día cinco, manteniéndose en este mismo el día ocho y quince. Finalmente el queso fresco E2Q5 mantiene su logaritmo en el día tres, aumentando uno en el día cinco y uno más en el día ocho, conservando este último hasta el día quince (Ver Anexo N°29, Tabla N°22).

5.3.4.2 Recuento de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en los días 0, 3, 5, 8 y 15 días

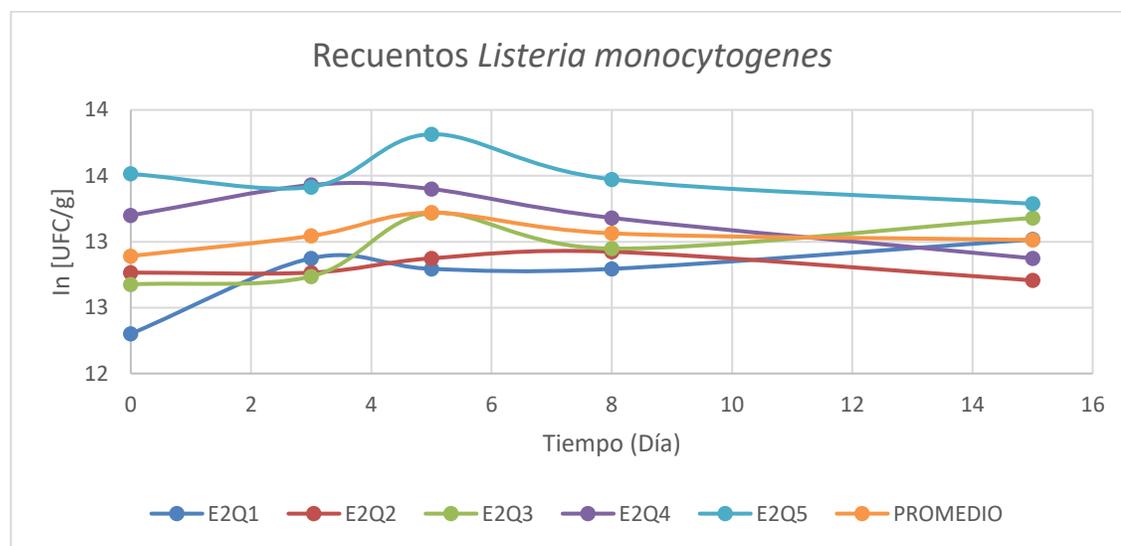


Figura N° 6. Representación gráfica de los recuentos en los quesos frescos de la cepa patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en el segundo ensayo de Bioconservación.

La figura N°6 representa la sobrevivencia de la cepa patógena *Listeria monocytogenes* en los días 0, 3, 5, 8 y 15 días para los cinco queso frescos. La gráfica refleja que para el queso fresco E2Q1 la bacteria aumento un logaritmo desde su concentración inicial, conservando este mismo en los siguientes días de análisis cinco, ocho y quince. Para los quesos frescos E2Q2, E2Q3 y E2Q4, la bacteria patógena mantuvo su logaritmo inicial desde el día cero hasta el día quince. Por otro lado el queso fresco E2Q5 disminuye un logaritmo en el día tres, pero lo aumenta nuevamente en el día cinco, conservando este mismo en el día ocho y quince (Ver Anexo N°30, Tabla N°23).

5.3.4.3 Recuentos promedios de la sobrevivencia de la cepa patógena y cepa probiótica en el segundo ensayo de Bioconservación.

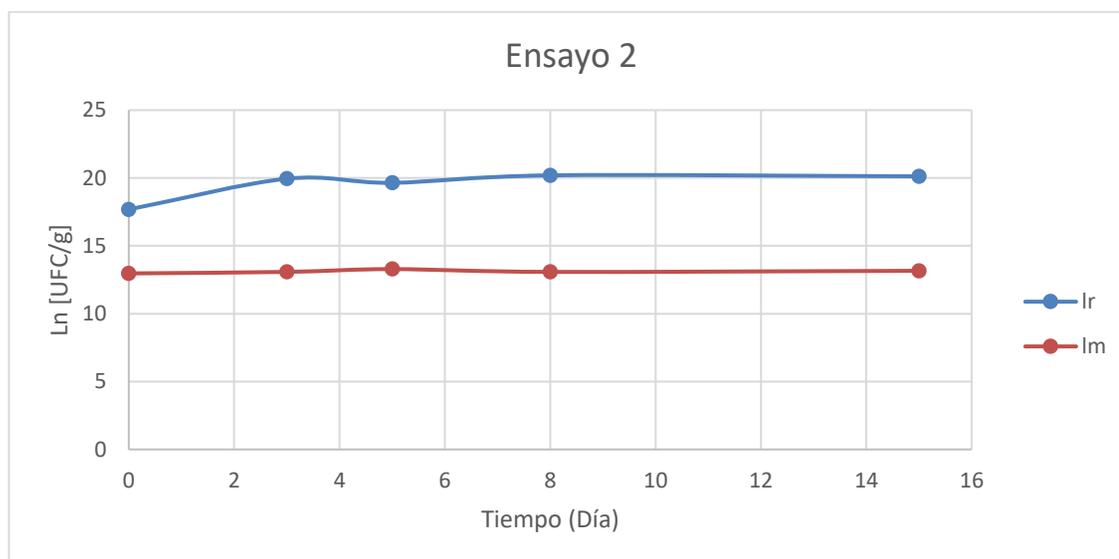


Figura N°7. Representación gráfica de los recuentos promedios de la sobrevivencia de la cepa patógena y cepa probiótica en el segundo Ensayo de Bioconservación

La figura N°7 representa los recuentos promedios de los cinco quesos frescos

inoculados con la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ y la cepa patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en el segundo ensayo de Bioconservación. Como se puede observar la bacteria *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 mantiene su logaritmo durante todos los tiempos de análisis, mientras que *Lactobacillus rhamnosus* aumento dos logaritmos desde el día cero hasta el tres, manteniendo este último los días cinco, ocho y quince (Ver Anexo N°31, Tabla N°24).

5.3.5 Recuentos promedios de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en los dos ensayos de Bioconservación

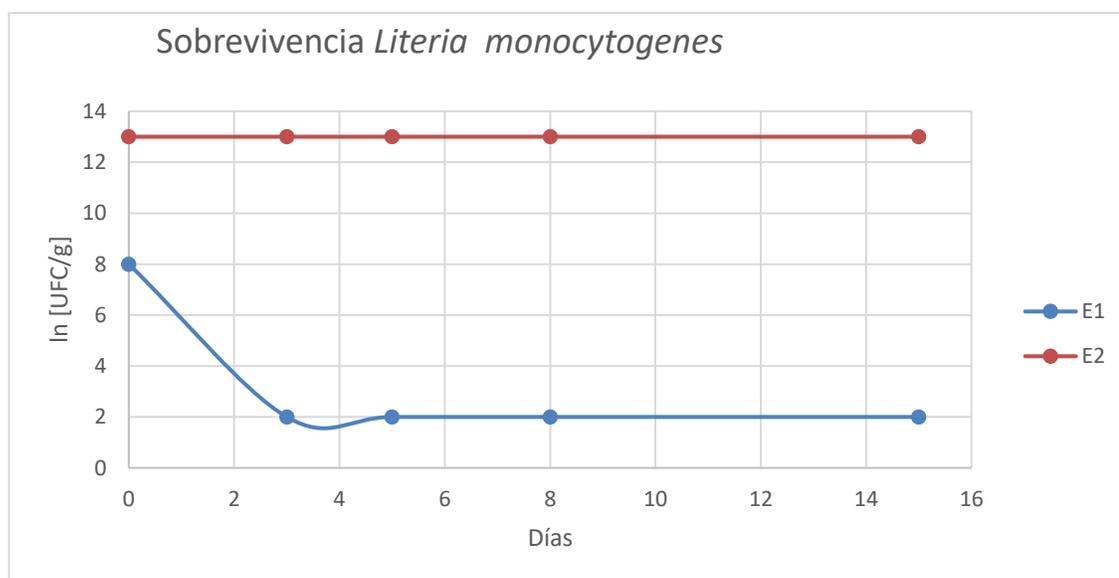


Figura N°8. Representación gráfica de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en los dos ensayos de Bioconservación.

La figura N°8 representa los promedios de los recuentos de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en los cinco quesos frescos de cada uno de los ensayos realizados. La gráfica refleja que para el ensayo uno la bacteria patógena disminuye seis logaritmos desde el día cero hasta el tres, los demás

días de muestreo tres, cinco, ocho y quince su crecimiento fue inferior a 10 UFC/g, lo que significa que *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ con una concentración de 1.1×10^6 UFC/g inhibe a *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 con concentración de 7.6×10^3 UFC/g. Por otro lado en el ensayo número dos la bacteria *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 con concentración de 7.6×10^5 UFC/g mantuvo su logaritmo durante todos los días de análisis por lo que *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ con una concentración de 1.1×10^7 UFC/g no es capaz de inhibirla (Ver Anexo N°32, Tabla N°25).

5.3.6 Recuentos promedios de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ en los dos ensayos de Bioconservación

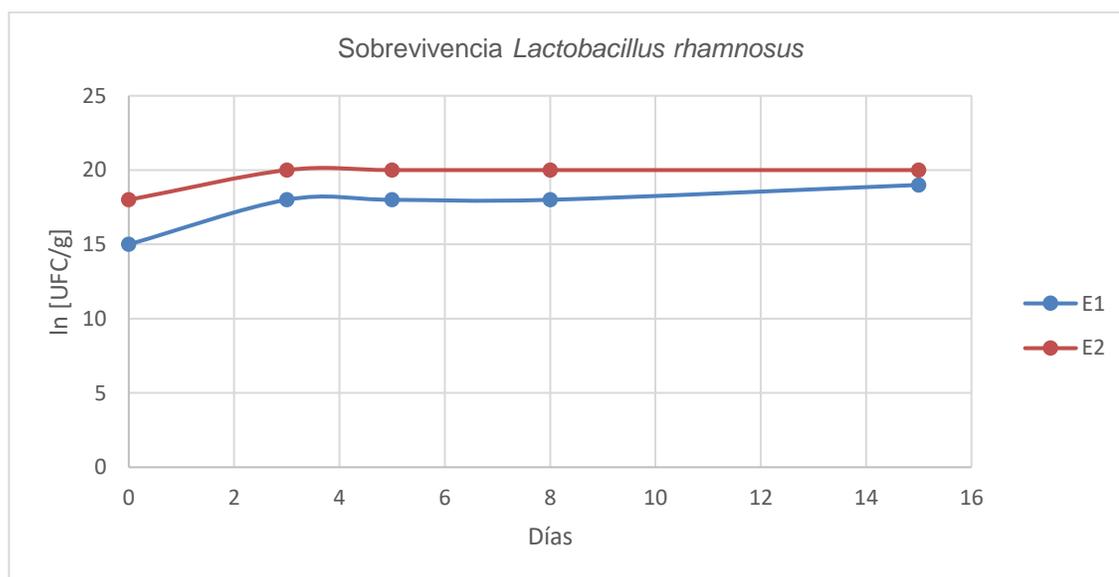


Figura N°9. Representación gráfica de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ en los dos ensayos de Bioconservación

La figura N°9 representa los promedios de los recuentos de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ en los cinco quesos frescos de cada uno de los ensayos realizados. La gráfica refleja que para el ensayo uno la bacteria

probiótica aumenta tres logaritmos desde el día cero hasta el día tres, manteniéndose en este mismo el día cinco y ocho, para el día quince aumenta un logaritmo más. Simultáneamente se realizó el recuento de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ para el ensayo dos, observándose que la bacteria incrementa dos logaritmos desde el día cero hasta el día tres y se mantiene en este mismo los días cinco, ocho y quince (Ver Anexo N°33, Tabla N°26).

5.4 Determinación de pH, color, olor y el tiempo de vida en anaquel de los quesos frescos, tratados con los microorganismos a temperaturas de refrigeración.

5.4.1 Resultados de la determinación de pH en el primer ensayo de Bioconservación

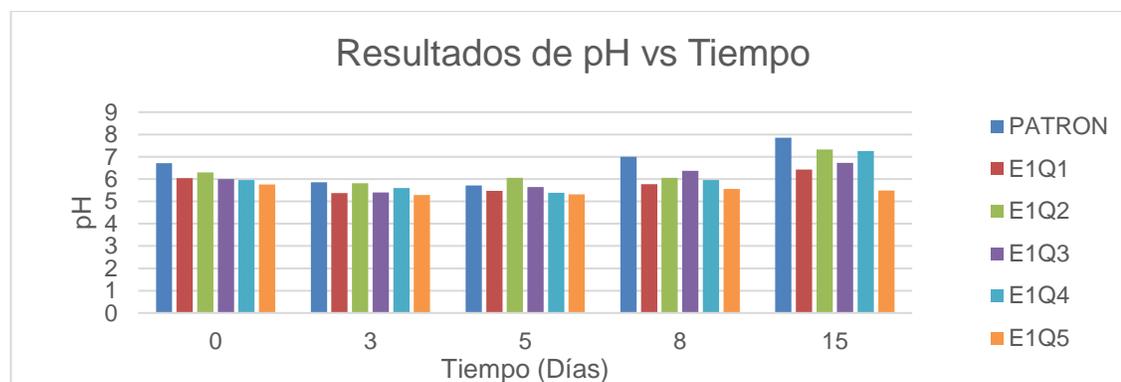


Figura N°10. Representación gráfica de los resultados de pH tomados para la realización del primer ensayo de Bioconservación.

En la figura N° 10 se reflejan los resultados de los pH determinados en los días de análisis en cada muestra de queso fresco del primer ensayo de Bioconservación, simultáneamente, se realizó la determinación del pH al queso fresco patrón.

La muestra E1Q1 presentó un pH de 6.04 en el día cero, desciende a 5.37 el día tres, a los cinco días se registra un valor de 5.47, a los ocho días 5.77, y a los quince días aumentó a 6.43 (Ver Anexo N°34, Tabla N°27)

La muestra E1Q2 presentó un pH de 6.30 en el día cero, desciende a 5.81 el día tres, a los cinco días se registra un valor de 6.05, a los ocho días 6.05, y a los quince días aumentó a 7.32 Ver Anexo N°34, Tabla N°27)

La muestra E1Q3 presentó un pH de 6.00 en el día cero, desciende a 5.40 el día tres, a los cinco días se registra un valor de 5.65, a los ocho días 6.37, y a los quince días aumentó a 6.73 Ver Anexo N°34, Tabla N°27)

La muestra E1Q4 presentó un pH de 5.96 en el día cero, desciende a 5.40 el día tres, a los cinco días se registra un valor de 5.65, a los ocho días 6.37, y a los quince días aumentó a 6.73 Ver Anexo N°34, Tabla N°27)

La muestra E1Q5 presentó un pH de 5.76 en el día cero, desciende a 5.28 el día tres, a los cinco días se registra un valor de 5.31, a los ocho días 5.56, y a los quince días aumentó a 5.49 Ver Anexo N°34, Tabla N°27)

De manera general la mayoría de las muestras de quesos frescos analizadas en el ensayo uno de Bioconservación estaban en el rango de 5 a 7 de pH, manteniéndose por más tiempo (hasta 8 días) en el rango de pH normal de queso (5.6-6.4), en comparación del queso patrón desde los 8 días incumplía el rango normal del queso fresco para pH.

5.4.2 Resultados de la determinación de color en el primer ensayo de Bioconservación

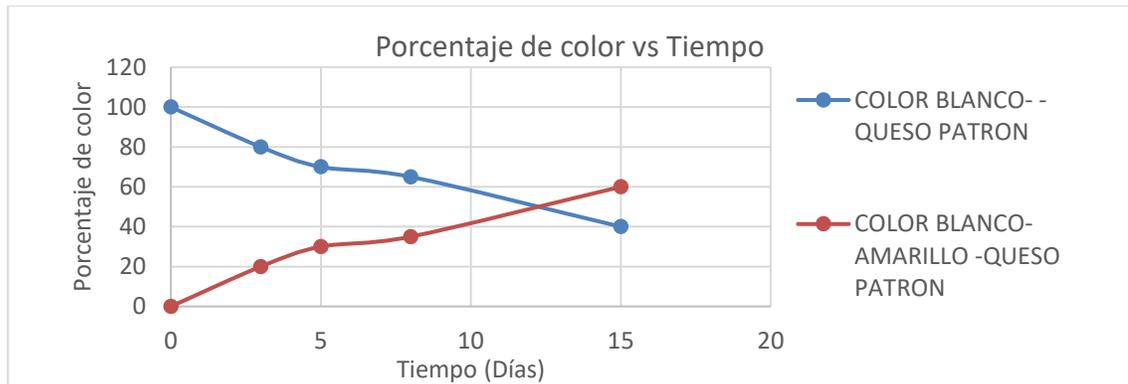


Figura N°11. Representación gráfica del porcentaje de color versus el tiempo en días del queso patrón.

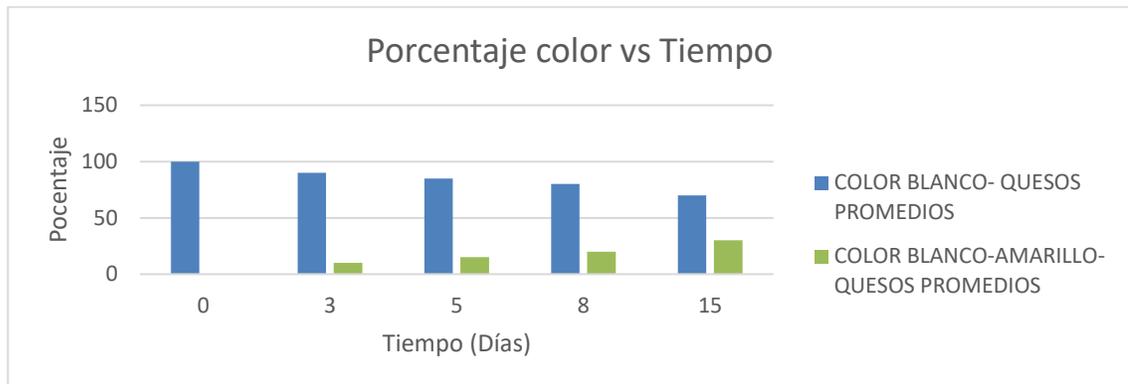


Figura N°12. Representación gráfica del porcentaje de color versus el tiempo en el primer ensayo de los quesos frescos.

Según la figura N°11 (Patrón) y N°12 (quesos muestras) son el resultado (Ver Anexo N°35, Tabla N°28) del color en el queso patrón y quesos muestras. En la figura N°11 se puede observar que el color blanco fue descendiendo hasta los 15 días, en cambio en las muestras de queso fresco inoculadas para el ensayo (Ver Figura N° 12) si se percibió el color blanco la mayoría del tiempo.

5.4.3 Resultados de la determinación del olor en el primer ensayo de Bioconservación

Tabla N°9. Resultados del olor de los quesos frescos del día cero en el primer ensayo de Bioconservación.

Código muestra	OLOR			CATEGORIA		
	Láctico fresco	Láctico cocido	Láctico acidificado	Débil	Media	Elevada
QUESO PATRÓN	X					X
E1Q1	X					X
E1Q2	X					X
E1Q3	X					X
E1Q4	X					X
E1Q5	X					X

La tabla N°9 hace mención de una de las características organolépticas (olor) determinadas para los quesos frescos y queso patrón como la metodología lo describe para el ensayo de Bioconservación uno. Como se puede observar todas las muestras de queso fresco el día cero tenían olor láctico fresco de categoría elevada.

Tabla N°10. Resultados del olor de los quesos frescos del día tres en el primer ensayo de Bioconservación.

Código muestra	OLOR			CATEGORIA		
	Láctico fresco	Láctico cocido	Láctico acidificado	Débil	Media	Elevada
QUESO PATRÓN	X				x	
E1Q1	X					x
E1Q2	X					x
E1Q3	X					x
E1Q4	X					x
E1Q5	X					x

La tabla N°10 hace mención de una de las características organolépticas (olor) determinadas para los quesos frescos y queso patrón como la metodología lo describe para el ensayo de Bioconservación uno. Como se puede observar todas las muestras de queso fresco ensayadas, al día tres, tenían olor láctico fresco de categoría elevada, a excepción del queso patrón que, si olía a láctico fresco, pero con categoría media en comparación a los demás.

Tabla N°11. Resultados del olor de los quesos frescos del día cinco en el primer ensayo de Bioconservación.

Código muestra	OLOR			CATEGORIA		
	Láctico fresco	Láctico cocido	Láctico acidificado	Débil	Media	Elevada
QUESO PATRÓN	X			x		
E1Q1	X					X
E1Q2	X					X
E1Q3	X					X
E1Q4	X					X
E1Q5	X					X

La tabla N°11 hace mención de una de las características organolépticas (olor) determinadas para los quesos frescos y queso patrón como la metodología lo describe para el ensayo de Bioconservación uno, como se puede observar todas las muestras de queso fresco ensayadas, a los cinco días, tenían olor láctico fresco de categoría elevada, a excepción del queso patrón que, olía a láctico fresco de categoría débil, lo que quiere decir que el queso patrón iba bajando su frescura.

Tabla N°12. Resultados del olor de los quesos frescos del día ocho en el primer ensayo de Bioconservación.

Código muestra	OLOR			CATEGORIA		
	Láctico fresco	Láctico cocido	Láctico acidificado	Débil	Media	Elevada
QUESO PATRÓN			x	X		
E1Q1	x			X		
E1Q2	x			X		
E1Q3	x			X		
E1Q4	x			X		
E1Q5	x			X		

La tabla N°12 hace mención de una de las características organolépticas (olor) determinadas para los quesos frescos y queso patrón como la metodología lo describe para el ensayo de Bioconservación uno. Como se puede observar todas las muestras de queso fresco ensayadas, a los ocho días, tenían olor láctico fresco de categoría débil, a excepción del queso patrón que, olía a láctico acidificado de categoría débil, lo que indica que el queso patrón sin bacterias inoculadas estaba descomponiéndose.

Tabla N°13. Resultados del olor de los quesos frescos del día quince en el primer ensayo de Bioconservación

Código muestra	OLOR			CATEGORIA		
	Láctico fresco	Láctico cocido	Láctico acidificado	Débil	Media	Elevada
QUESO PATRÓN			x			X
E1Q1	x			X		
E1Q2	x			X		
E1Q3	x			X		
E1Q4	x			X		
E1Q5	x			X		

La tabla N°13 hace mención de una de las características organolépticas (olor) determinadas para los quesos frescos y queso patrón como la metodología lo describe para el ensayo de Bioconservación uno, como se puede observar todas las muestras de queso fresco ensayadas, a los quince días, tenían olor láctico fresco de categoría débil, el queso patrón olía a láctico acidificado de categoría elevada, lo que indica que este último estaba bastante descompuesto.

5.4.4 Resultados de la determinación de pH en el segundo ensayo de Bioconservación

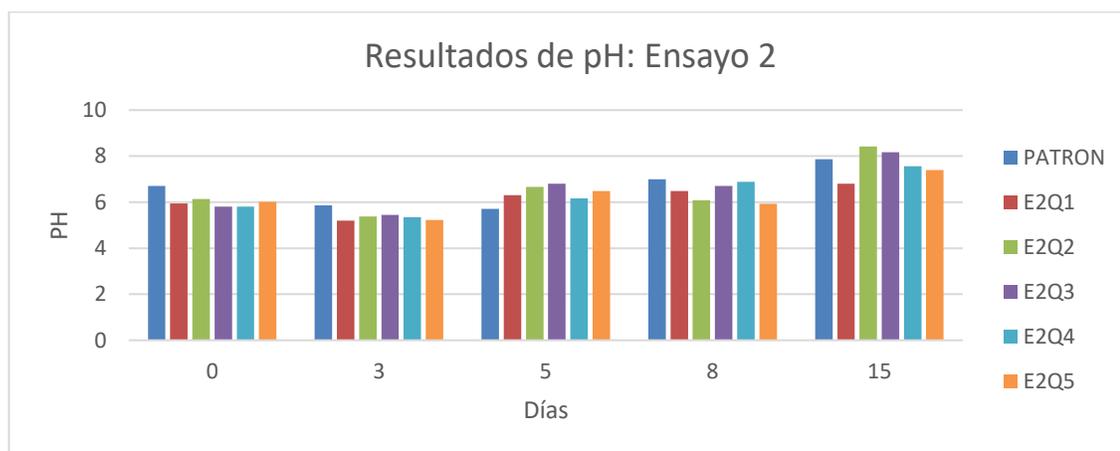


Figura N°13. Representación gráfica de los resultados de pH tomados para la realización del segundo ensayo de Bioconservación.

En la figura N°13 se refleja los resultados (Ver Anexo N°36, Tabla N°29) donde demuestra los pH determinados en los días de análisis en cada muestra de queso fresco del Ensayo dos de Bioconservación, junto a estos, comparando el dato de pH del queso fresco patrón.

La muestra E2Q1 presentó un pH de 5.95 en el día cero, 5.72 el día tres, a los cinco días se registra un valor de 6.31, a los ocho días 6.49, y a los quince días

aumentó a 6.8. Esta muestra se mantuvo entre 5 y 7 de rango de pH (Ver Anexo N°36, Tabla N°29)

La muestra E2Q2 presentó un pH de 6.14 en el día cero, desciende a 5.38 el día tres, a los cinco días se registra un valor de 6.67, a los ocho días 6.08 y a los quince días aumentó a 8.42. En esta muestra obtuvo un rango más amplio de pH 5-8.5 (Ver Anexo N°36, Tabla N°29)

La muestra E2Q3 presentó un pH de 5.8 en el día cero, desciende a 5.45 el día tres, a los cinco días se registra un valor de 6.8, a los ocho días 6.71, y a los quince días aumentó a 8.17. A partir del día tres este queso fresco aumentaba paulatinamente el pH (Ver Anexo N°36, Tabla N°29)

La muestra E2Q4 presentó un pH de 5.8 en el día cero, desciende a 5.35 el día tres, a los cinco días se registra un valor de 6.16, a los ocho días 6.89, y a los quince días aumentó a 7.56 (Ver Anexo N°36, Tabla N°29)

La muestra E2Q5 presentó un pH de 6.02 en el día cero, desciende a 5.23 el día tres, a los cinco días se registra un valor de 6.49, a los ocho días 5.93, y a los quince días aumentó a 7.4 (Ver Anexo N°36, Tabla N°29)

De manera general la mayoría de las muestras de quesos frescos ensayados estaban en el rango de 5 a 8 de pH, hasta los ocho días se había mantenido el pH normal del queso fresco (5.6-6.6), en contraste con el queso patrón, este último a los ocho días tenía 7 de pH, incumpliendo así el rango normal de pH para quesos frescos.

Por tanto, se determina que el ensayo dos de Bioconservación logró mantener el pH en muestras de queso fresco.

5.4.5 Resultados de la determinación de color en el segundo ensayo de Bioconservación

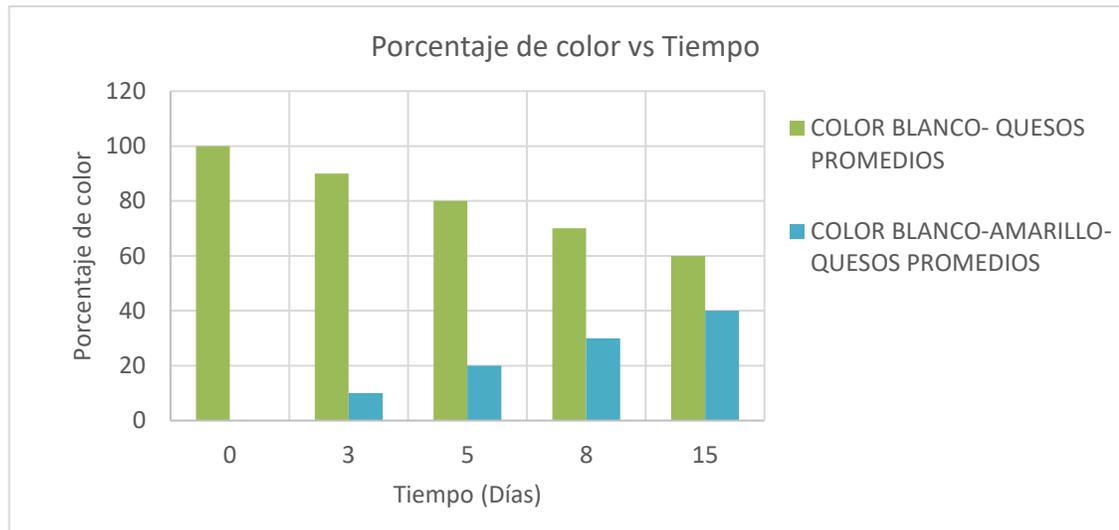


Figura N°14. Representación gráfica del porcentaje de color versus el tiempo en el segundo ensayo de Bioconservación.

La figura N°11 y N°14 reflejan el resultado (Ver Anexo N°37, Tabla N°30) en la cual se ilustra el porcentaje de color en el período de tiempo de 15 días del estudio del Ensayo dos de Bioconservación con *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™.

Se observó que las muestras de queso fresco mantuvieron un 60% el color blanco natural del queso y un 40% el color blanco-amarillo.

El caso contrario fue con el queso patrón que no posee *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ desmejoró el color obteniendo en un 40% el color blanco y un 60% el color blanco-amarillo.

5.4.6. Resultados de la determinación del olor segundo ensayo de Bioconservación.

Tabla N°14. Resultados del olor de los quesos frescos del día cero en el segundo ensayo de Bioconservación

Código muestra	OLOR			CATEGORIA		
	Láctico fresco	Láctico cocido	Láctico acidificado	Débil	Media	Elevada
QUESO PATRÓN	X					X
E2Q1	X					X
E2Q2	X					X
E2Q3	X					X
E2Q4	X					X
E2Q5	X					X

La tabla N°14 hace mención de una de las características organolépticas (olor) determinadas para los quesos frescos y queso patrón como la metodología lo describe para el ensayo de Bioconservación dos, como se puede observar todas las muestras de queso fresco el día cero tenían olor láctico fresco de categoría elevada.

Tabla N°15. Resultados del olor de los quesos frescos del día tres en el segundo ensayo de Bioconservación.

Código muestra	OLOR			CATEGORIA		
	Láctico fresco	Láctico cocido	Láctico acidificado	Débil	Media	Elevada
QUESO PATRÓN	X				X	
E2Q1	X					X
E2Q2	X					X
E2Q3	X					X
E2Q4	X					X
E2Q5	X					X

La tabla N°15 muestra los resultados de una de las características organolépticas (olor) determinadas para los quesos frescos y queso patrón como la metodología lo describe para el ensayo de Bioconservación dos. Como se puede observar todas las muestras de queso fresco ensayadas, el día tres, tenían olor láctico fresco de categoría elevada, el queso patrón olía a láctico fresco, pero con categoría media en comparación a los demás.

Tabla N°16. Resultados del olor de los quesos frescos del día cinco en el segundo ensayo de Bioconservación

Código muestra	OLOR			CATEGORIA		
	Láctico fresco	Láctico cocido	Láctico acidificado	Débil	Media	Elevada
QUESO PATRÓN	X			X		
E2Q1	X				X	
E2Q2	X				X	
E2Q3	X				X	
E2Q4	X				X	
E2Q5	X				X	

La tabla N°16 muestra los resultados de una de las características organolépticas (olor) determinadas para los quesos frescos y queso patrón como la metodología para el ensayo de Bioconservación dos, como se puede observar todas las muestras de queso fresco ensayadas, a los cinco días, tenían olor láctico fresco de categoría media, el queso patrón olía a láctico fresco, pero con categoría débil en comparación a los demás, lo que el queso patrón todavía estaba en buenas condiciones, pero perdía la frescura.

Tabla N°17. Resultados del olor de los quesos frescos del día ocho en el segundo ensayo de Bioconservación.

Código muestra	OLOR			CATEGORIA		
	Láctico fresco	Láctico cocido	Láctico acidificado	Débil	Media	Elevada
QUESO PATRÓN			X	X		
E2Q1	X			X		
E2Q2	X			X		
E2Q3	X			X		
E2Q4	X			X		
E2Q5	X			X		

La tabla N°17 muestra los resultados de una de las características organolépticas (olor) determinadas para los quesos frescos y queso patrón como la metodología lo describe para el ensayo de Bioconservación dos. Como se puede observar todas las muestras de queso fresco ensayadas, a los ocho días, tenían olor láctico fresco de categoría débil, el queso patrón olía a láctico acidificado, pero con categoría débil en comparación a los demás.

Tabla N°18. Resultados del olor de los quesos frescos del día quince en el segundo ensayo de Bioconservación

Código muestra	OLOR			CATEGORIA		
	Láctico fresco	Láctico cocido	Láctico acidificado	Débil	Media	Elevada
QUESO PATRÓN			X			X
E22Q1	X			X		
E2Q2	X			X		
E2Q3	X			X		
E2Q4	X			X		
E2Q5	X			X		

La tabla N°18 muestra los resultados de una de las características organolépticas

(olor) determinadas para los quesos frescos y queso patrón como la metodología lo describe para el ensayo de Bioconservación dos. Como se puede observar todas las muestras de queso fresco ensayadas, a los quince días, tenían olor láctico fresco de categoría débil, el queso patrón olía a láctico acidificado, pero con categoría elevada en comparación a los demás, por lo que ya estaba descompuesto.

En general la vida en anaquel de los quesos frescos de la quesería de Metapán mejoró con la inoculación de la bacteria probiótica puesto que estos mantuvieron sus características organolépticas hasta los ocho días a diferencia del queso patrón que las comenzó a perder sus características iniciales desde el día tres realizando los ensayos a la misma temperatura en que se trató el queso patrón (Ver Anexo N°38, Tabla N°31).

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Con la evaluación de los aspectos citados en la lista de chequeo se determinó la diferencia de criterio entre la propietaria y las responsables de la investigación en cuanto a la observación del cumplimiento de la Buenas Prácticas Higiénicas empleadas en la quesería de Metapán.
2. Los resultados de la Bioconservación de quesos frescos, utilizando la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 19118, permitieron mantener las características organolépticas, logrando una disminución en el crecimiento de la bacteria patógena y al mismo tiempo mejorar la conservación de las muestras ensayadas.
3. Las muestras de quesos frescos cumplieron con el parámetro de ausencia para *Listeria monocytogenes* de acuerdo al Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.50:08) para el 1.0 Grupo de alimento: Leche y productos lácteos; 1.9 Subgrupo del alimento: Quesos frescos, no madurados y requesón.
4. Los resultados de la determinación de los parámetros microbiológicos en las muestras de quesos frescos de un mismo lote no cumplieron con los recuentos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, así como para la presencia de *Salmonella spp* según lo establecido por el reglamento.
5. La concentraciones que se obtuvieron por medio de la estandarización para posteriormente ser inoculadas a los quesos frescos fueron de 7.6×10^3 UFC/g y 7.6×10^5 UFC/g de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 y de 1.1×10^6

UFC/g y 1.1×10^7 UFC/g de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ para primer y segundo ensayo respectivamente.

6. La concentración de 1.1×10^6 UFC/g para *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ logra inhibir a la bacteria patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 de concentración 7.6×10^3 UFC/g y al mismo tiempo ejerce su efecto bioconservador en su totalidad en los quesos frescos hasta los ocho días, manteniendo sus características organolépticas como color y olor; al mismo tiempo se mantiene el pH dentro del rango normal para quesos frescos de 5.6 a 6.4.
7. La concentración de 1.1×10^7 UFC/g de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ no logra inhibir a la bacteria patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 de concentración 7.6×10^5 UFC/g. Consecuentemente las características organolépticas se mantuvieron normales hasta el día cinco y el pH hasta el día tres.
8. Comparando la vida en anaquel de los quesos frescos inoculados con la cepa probiótica y el queso patrón se observó que las características organolépticas de los primeros se mantienen hasta los ocho días mientras que el queso patrón las pierde desde el tercer día ambos almacenados a una temperatura de 4.8 a 5.1°C.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Realizar los ensayos de Bioconservación en muestras de quesos frescos elaborados bajo una fórmula definida de ingredientes y aplicando las Buenas Prácticas Higiénicas para evitar la contaminación con otras bacterias que podrían interferir en los ensayos.
2. Comparar quesos frescos elaborados con conservantes químicos y bioconservadores para determinar cuál de ellos proporciona mayor tiempo de vida en anaquel.
3. Ensayar comportamiento de otras bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* con la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* en quesos frescos.
4. Realizar ensayos de Bioconservación de alimentos utilizando más de una cepa probiótica, para potenciar el efecto inhibitorio hacia las bacterias patógenas y al mismo tiempo mejorar las características organolépticas del producto alimenticio.
5. Evaluar el comportamiento de las bacterias patógenas y probiótica durante intervalos de tiempo de 20, 25 y 30 días para determinar su período de muerte con mayor exactitud.
6. Para evitar contaminaciones cruzadas del ambiente o entre las muestras de quesos frescos, utilizar otro tipo de empaque para llevar a cabo los Ensayos de Bioconservación

7. Conservar los quesos frescos a temperaturas de 2°C, 3°C y 4°C observando la sobrevivencia de la cepa probiótica y patógena bajo estas condiciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arencibia Arrebola, D. F. Gámez Menéndez, R. Rosario Fernández L. A. (2008). (2017, Enero 12). Métodos Generales de Conservación de Microorganismos. [Online]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262724715_Metodos_generales_de_conservacion_de_microorganismos
2. Buendía Monreal M., González Rodríguez V., Mendoza Márquez A. M., Muñoz Hernández J. E., Reyes Díaz C. A. Queso Fresco. [Presentación de Power Point] [Acceso el 3 de abril de 2016] Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TEMA3.QUESO_2832.pdf
3. Calderón, Oscar, Padilla, Carolina, Chaves, Carolina, Villalobos, Laura, & Laura Arias, María. (2007). Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(1), 51-56. Recuperado en 12 de abril de 2016, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000100007&lng=es&tlng=es
4. Castejón Ponce E. Probióticos. [Presentación de Power Point] [Acceso el 2 de abril de 2016] Disponible en: <http://www.scpediatrica.cat/primaria/wp-content/uploads/PROBIOTICOS.pdf>.
5. Coelho M.C., Silva C.C.G., Ribeiro S.C., Dapkevicius M.L.N.E., Rosa H.J.D. (2014) Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 191,

- 17 November 2014, Pages 53-59. Portugal. [En línea] Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160514004334> [2016, noviembre 03].
6. COMIECO. (2014) Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.70:14 Productos Lácteos. Quesos. Especificaciones. Centroamérica. [En línea] Disponible en: http://www.mineco.gob.gt/sites/default/files/productos_lacteos_quesos.pdf [2016, noviembre 02]
 7. Cortez H. M. C., Sánchez G. A. E. (2015) Determinación de *Listeria monocytogenes* en dos variedades de queso artesanales, comercializados en los mercados La Tiendona, Central y San Miguelito. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. [En línea] Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/10395/1/16103675.pdf> [2016, 02 noviembre]
 8. Crioperlas Cryoinstant™ para conservación de cepas. (2017, Enero 12). [Online]. Disponible en: <http://www.ictsl.net/productos/plastico/crioperlascryoinstantparaconservaciondecepas.html>
 9. Cultimed. (2016, Noviembre 10). Manual Básico de Microbiología Listeria, Agar Cromogénico (ISO 11290-1:2004). [Online]. Disponible en: www.ictsl.net/downloads/ultimasmonografias.pdf
 10. Dirección General de Investigación en Salud Pública, S. S. A. (1977). Muestreo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. México: Autor.
 11. Dos Santos Eduardo, Agatângelo Joaquim. (2008). Estudio del Comportamiento Cinético de Microorganismos de Interés en Seguridad

Alimentaria con Modelos Matemáticos. Universidad Autónoma de Barcelona [Acceso el 1 de abril del 2016]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10803/5691>.

12. Fernández F., Covadonga B. (2004). Queso artesanal probiótico: un ejemplo de queso funcional. [Revista en internet] [Acceso el 8 de abril de 2016] Disponible en: http://digital.csic.es/bitstream/10261/5777/1/Queso_probiotico_AGROCSIC.pdf
13. Fuente Salcido, Norma Margarita de la; Barboza Corona, José Eleazar Inocuidad y Bioconservación de alimentos Acta Universitaria, vol. 20, núm. 1, enero-abril, 2010, pp. 43-52 Universidad de Guanajuato Guanajuato, México. [Revista en internet] 2010 [Acceso el 1 de abril del 2016] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41613084005>
14. Galván R. Luis (2007). Evaluación sensorial: quesos de oveja y cabra. Cuaderno Tecnológico N°5 Lácteos. Instituto Nacional de Tecnología Industrial.
15. García Hernández M. R. Sandoval Bonilla R.V. (2015) Determinación de la Bioconservación del *Lactobacillus acidophilus* sobre *Salmonella spp.* Utilizando sustrato de carne de res.
16. Gobierno de Chile Instituto de Salud Pública. (2009) (2016. Noviembre 10). Procedimiento para Identificación Bioquímica de Cepas de *Listeria monocytogenes* Aisladas en Alimentos y Ambiente. [Online]. Disponible en: www.ispch.cl/lab_amb/met_analitico/2_6_09/microbiologia/PRT086

17. González Martínez, B. E. Jiménez Salas Z., Heredia Rojas, N. L., Villarreal Treviño, L., García Díaz G. Gómez Treviño, M. (2006) *Efecto de microorganismos probióticos sobre el crecimiento de salmonella enteritidis var. Typhimurium*. Ciencia UANL, 9 (4). ISSN 1405-9177 [Acceso el 8 de marzo de 2016]. Disponible en: <http://eprints.Uanl.mx/1717/1/SALMONELLA.pdf>
18. Hércules de Melara A. D. (2014). Evaluación del efecto de empaque y temperatura de almacenamiento en la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en salchichas artesanales. (Trabajo de graduación de maestría) Universidad de El Salvador.
19. Hitchins D. Anthony (ret.) and Karen Jinneman and Yi Chen. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods.(2016). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10. [Acceso el 25 de marzo de 2016]. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>
20. Ibañez C. F., Torre P., Irigoyen A. (2003) ADITIVOS ALIMENTARIOS. Universidad Pública de Navarra. Área de Nutrición y Bromatología. España. [En línea] Disponible en: http://www.nutricionorg/publicaciones/revista_agosto_03/Funcionales/aditivos.pdf [2016, noviembre 03].
21. Instituto de Salud Pública. (2010) (2016. Noviembre 10). Procedimiento Enumeración *Listeria monocytogenes* en Alimentos ISO 11290-2. Modificado. [Online]. Disponible en: www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/10/PRT712.02093%20V0%20Rto%20placa%20L.%20monocytogenes

%20ISO%2011290-2%20V0.pdf

22. Motarjemi Y., Moy G., Todd CD E. (2014). ENCYCLOPEDIA OF FOOD SAFETY. Volume 1. First edition. USA. Editorial Simon Holt, Rashmi Phadnis.
23. Ryser T. E. y Marth H. E. (2007). Listeria, Listeriosis, and Food Safety. Third Edition United States of America. Taylor & Francis Group. Pág. 85
24. Singlepath® Listeria (2016. Noviembre 11). For the rapid detection of Listeria in food and environmental samples. [Online]. Disponible en: www.amco-instruments.com/index_files/pdf/singlepath-listeria.pdf

ANEXOS

ANEXO N° 1



Figura N° 15. Municipio de Metapán, departamento de Santa Ana.

ANEXO N°2.
LISTA DE CHEQUEO Y REGISTRO DE BUENAS PRACTICAS HIGIENICAS
ADECUADAS SEGUN EL MANUAL DE BUENAS PRACTICAS DE
MANUFACTURA



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



TRABAJO DE GRADUACION: "DETERMINACION DE LA
BIOCONSERVACION DE QUESOS FRESCOS DE UNA QUESERIA DE
METAPAN UTILIZANDO UNA CEPA PROBIOTICA *Lactobacillus rhamnosus*
HOWARU™ FRENTE A *Listeria monocytogenes* ATCC 19118

**LISTA DE CHEQUEO DE BUENAS PRACTICAS HIGIENICAS ADECUADAS
SEGÚN EL MANUAL DE BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA**

ASPECTO	REQUERIMIENTOS	PUNTAJE EMPRESA	PUNTAJE EVALUADOS	OBSERVACIONES
A) LAVADO DE MANOS: Se exige que los operarios se laven cuidadosamente las manos con jabón líquido antibacterial:	- Al ingresar al área de proceso.	10	9	
	- Después de manipular cualquier alimento crudo y /o antes de manipular cocidos que ya no sufrirán tratamiento térmico antes de su consumo.	10	8	
	- Después de llevar a cabo cualquier actividad no laboral como comer, beber, fumar, sonarse la nariz o ir al servicio sanitario, y otras.	10	8	
SUBTOTAL		30	25	
PROMEDIO		10	8	
B) USO DE GUANTES	No desechables:			
	-Se utilizan en buen estado.	-	-	No utilizan guantes no desechables.
	-Se utilizan de un material impermeable.	-	-	

	-Se cambian diariamente, lavados y desinfectados antes de ser usados nuevamente.	-	-	
	Desechables:			
	-Se cambian cada vez que se ensucien o rompan.	-	-	No utilizan guantes desechables
	-Se desechan diariamente.	-	-	-
C) PERSONAL	- Los operarios mantienen uñas de manos cortas, limpias y sin esmalte.	10	9	
	- Los operarios no usan anillos, aretes, relojes, pulseras o cualquier adorno u otro objeto que pueda tener contacto con el producto que se manipule.	10	9	
	- Los operarios mantienen bigote y barba bien recortados y cubiertos con cubre bocas.	10	10	
	- El cabello de los operarios está recogido y cubierto por completo por un cubre cabezas.	10	9	
	- No utilizar maquillaje, uñas y pestañas postizas.	9	8	Poco maquillaje
SUBTOTAL		49	45	

PROMEDIO		10	9	
D)COMPORTAMIENTO DEL PERSONAL	Los empleados en actividades de manipulación de alimentos evitan comportamientos que puedan contaminarlos, tales como: fumar, escupir, masticar goma, comer, estornudar, o toser; y otras.	10	8	Masticaba chicle una empleada.
E) USO DE INDUMENTARIA	Utilizan uniforme y calzado adecuados, cubrecabezas y cuando proceda ropa protectora y mascarilla.	10	10	
F) VISITAS	Cuando hay visitantes en las zonas de procesamiento o manipulación de alimentos, se siguen las normas de comportamiento y disposiciones que se han establecido en la organización con el fin de evitar la contaminación de los alimentos.	10	8	

ASIGNACION DE PUNTAJE

A) LAVADO DE MANOS

Nivel de exigencia y cumplimiento.

0 a 4 puntos, si no se exige y cumple el requerimiento.

5 a 8 puntos si se exige poco y cumple regularmente este requerimiento

9 a 10 puntos si se exige mucho y se cumple el requerimiento.

B) USO DE GUANTES

0 a 4 puntos si no se utilizan como establece el requerimiento

5 a 8 puntos si utilizan regularmente como establece el requerimiento.

9 a 10 puntos si utilizan como establece el requerimiento.

C) PERSONAL

0 a 4 puntos si no cumple con el requerimiento

5 a 8 puntos si cumple regularmente el requerimiento.

9 a 10 puntos si cumple con el requerimiento.

D) COMPORTAMIENTO DE PERSONAL

E) USO DE INDUMENTARIA

F) VISITAS

0 a 4 puntos si no se cumple con el requerimiento

5 a 8 puntos si cumple regularmente el requerimiento.

9 a 10 puntos si cumple con el requerimiento.

ANEXO N° 3

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
ETIQUETA PARA EL MUESTREO

N° DE GRUPO: _____
CODIGO DE LA MUESTRA: _____
TIPO DE MUESTRA: _____
FECHA DE RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA: _____
HORA DE RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA: _____
MUESTRA TOMADA POR: _____
TESTIGO: _____

Figura N° 16. Etiqueta de identificación de muestra.

ANEXO N° 4

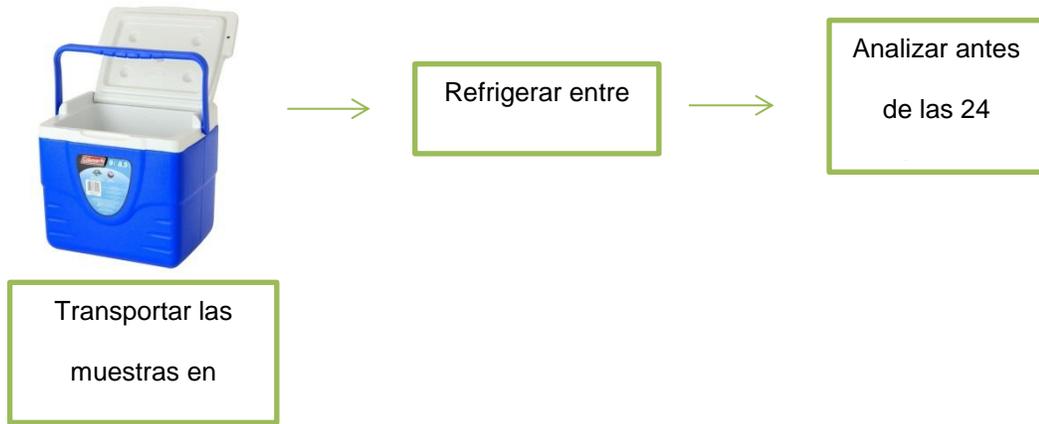


Figura N° 17. Esquema del Transporte de Muestra

ANEXO N°5.

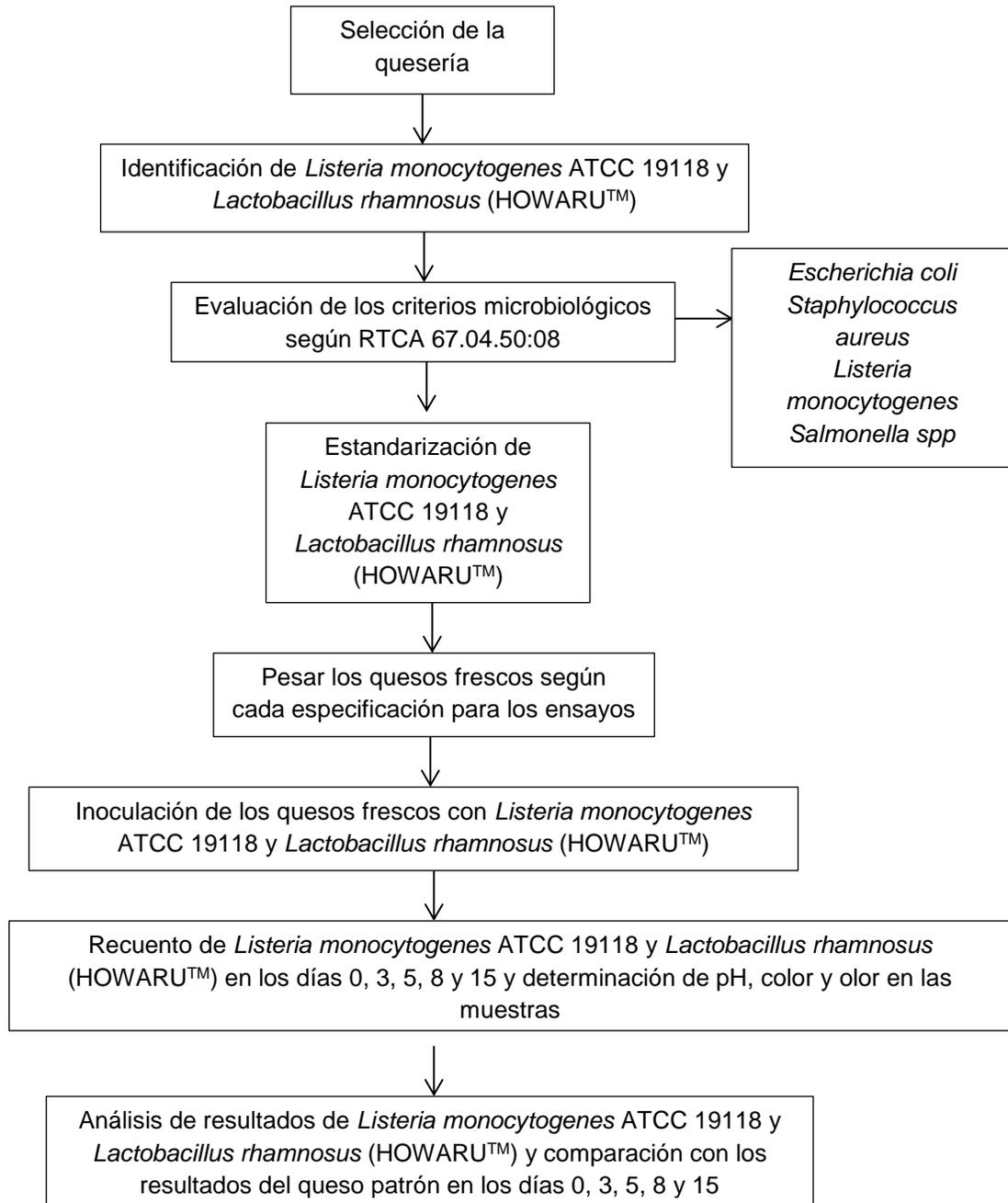


Figura N° 18. Flujograma de parte experimental

ANEXO N° 6
IDENTIFICACIÓN DE *Listeria monocytogenes* ATCC 19118
PRUEBAS API

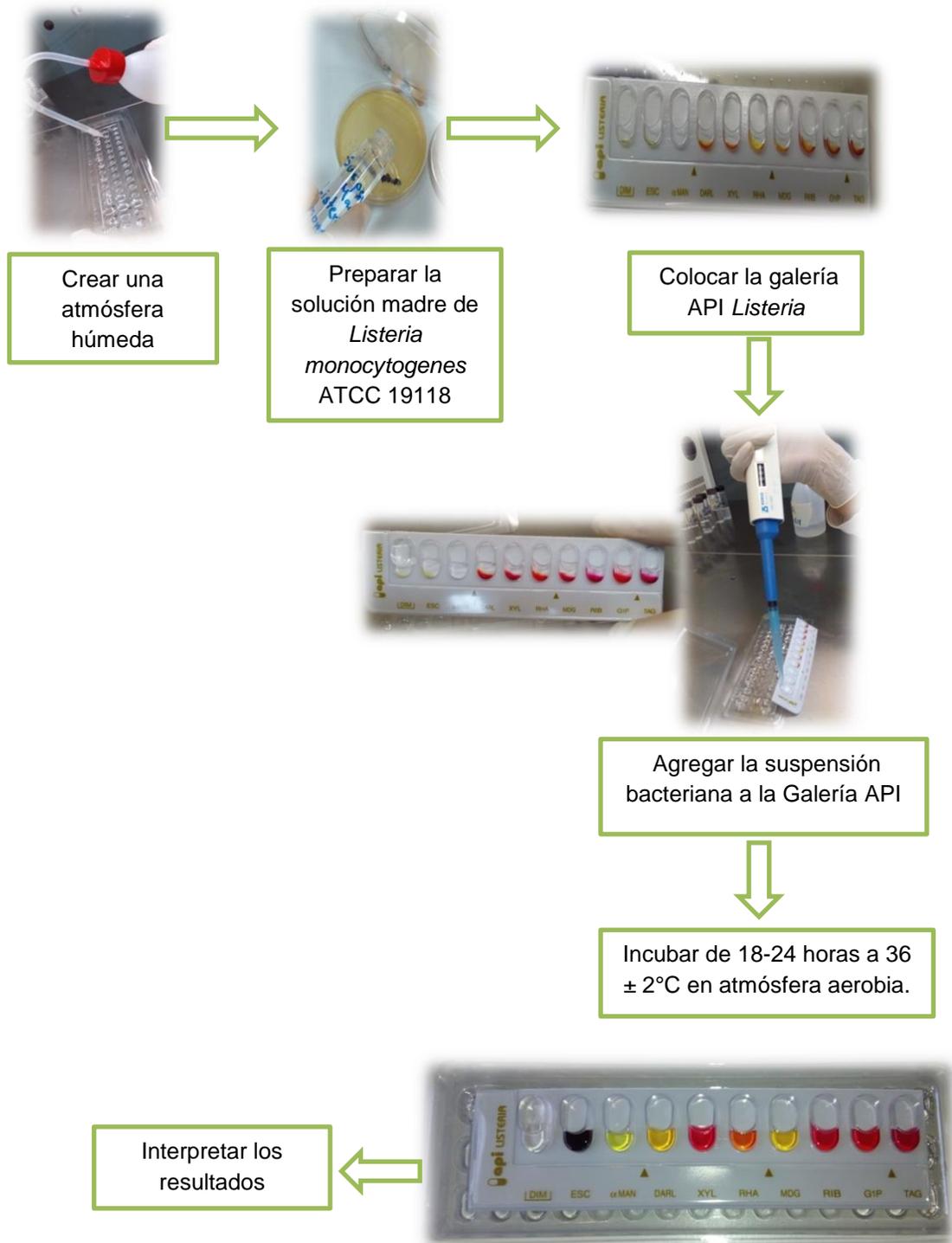
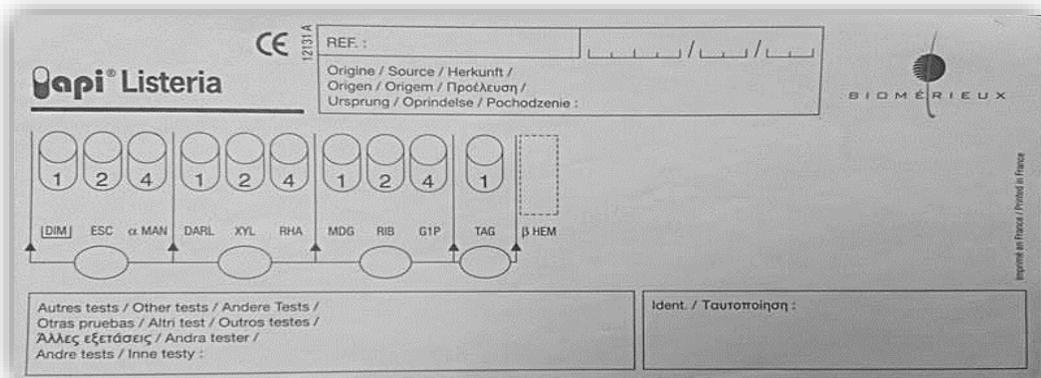


Figura N° 19. Pruebas API para *Listeria monocytogenes* ATCC 19118

ANEXO N° 7



Cepa	<u>DIM</u>	ESC	αMAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	GIP	TAG
<i>L. innocua</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	+	-	+	+	-	V	-	+	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-

Resultados esperados para *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en Prueba API

Figura N° 20. Hoja de Resultados para API *Listeria*.

ANEXO N° 8

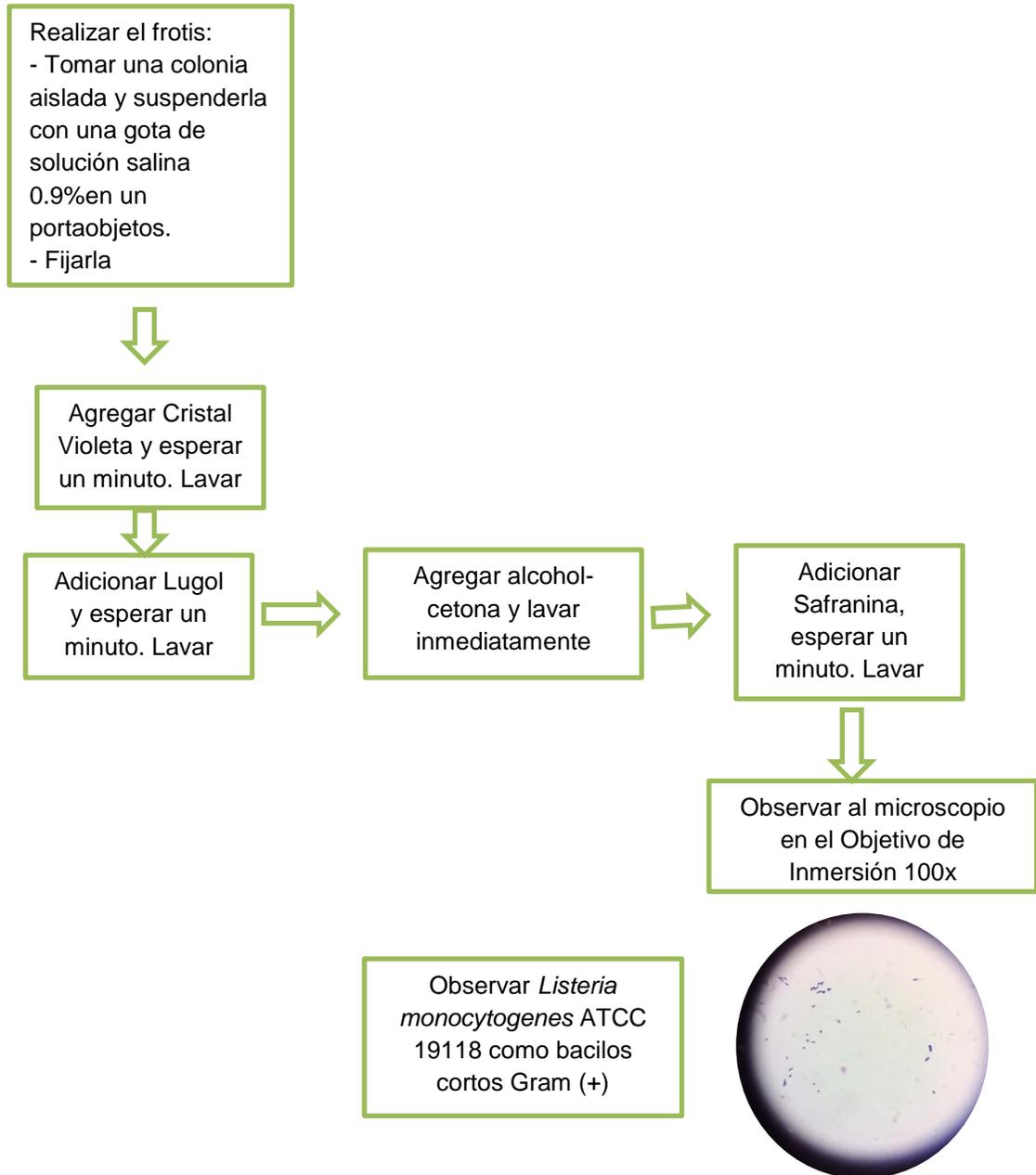


Figura N° 21. Procedimiento para realizar la Tinción Gram de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118.

ANEXO N° 9

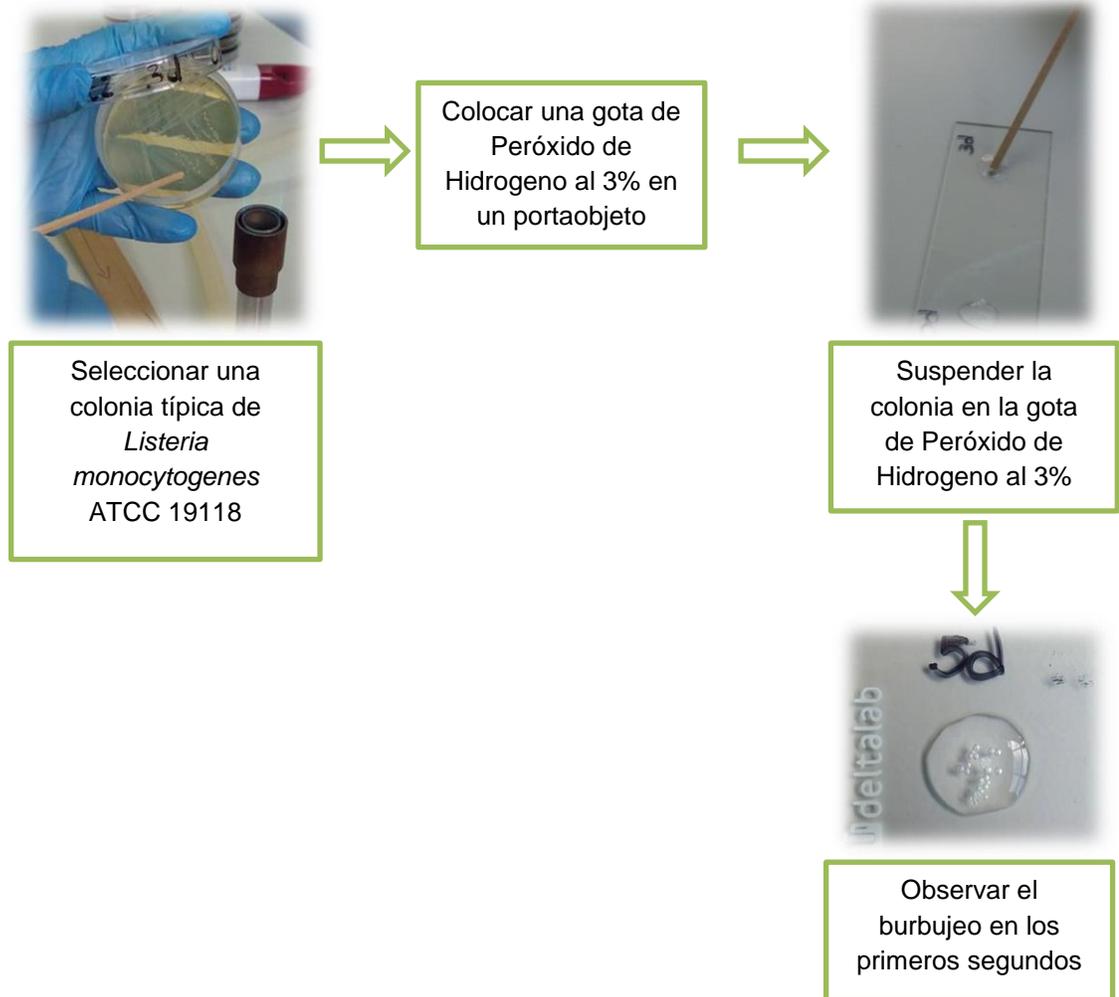


Figura N° 22. Prueba de la Catalasa para *Listeria monocytogenes* ATCC 19118

ANEXO N° 10

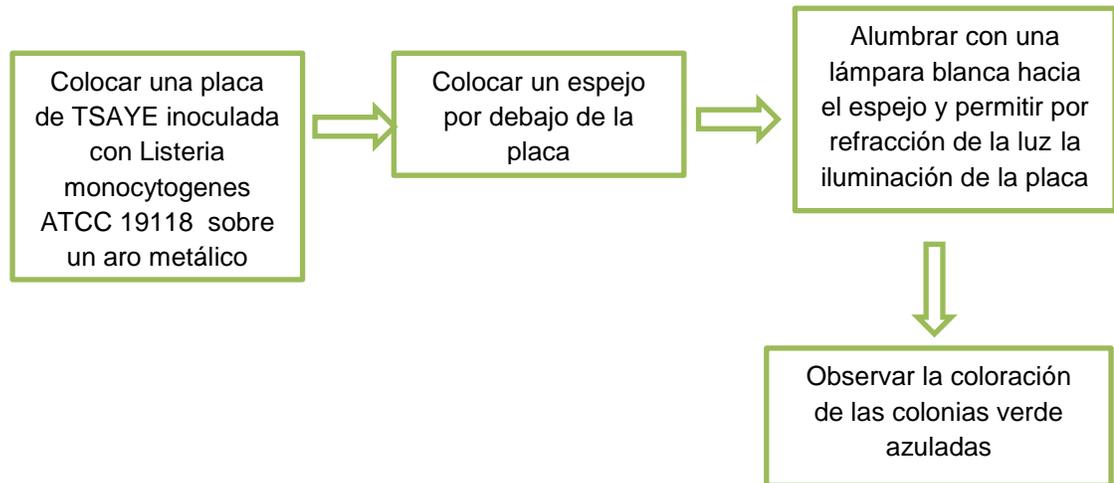


Figura N° 23. Prueba de Henry

ANEXO N°11

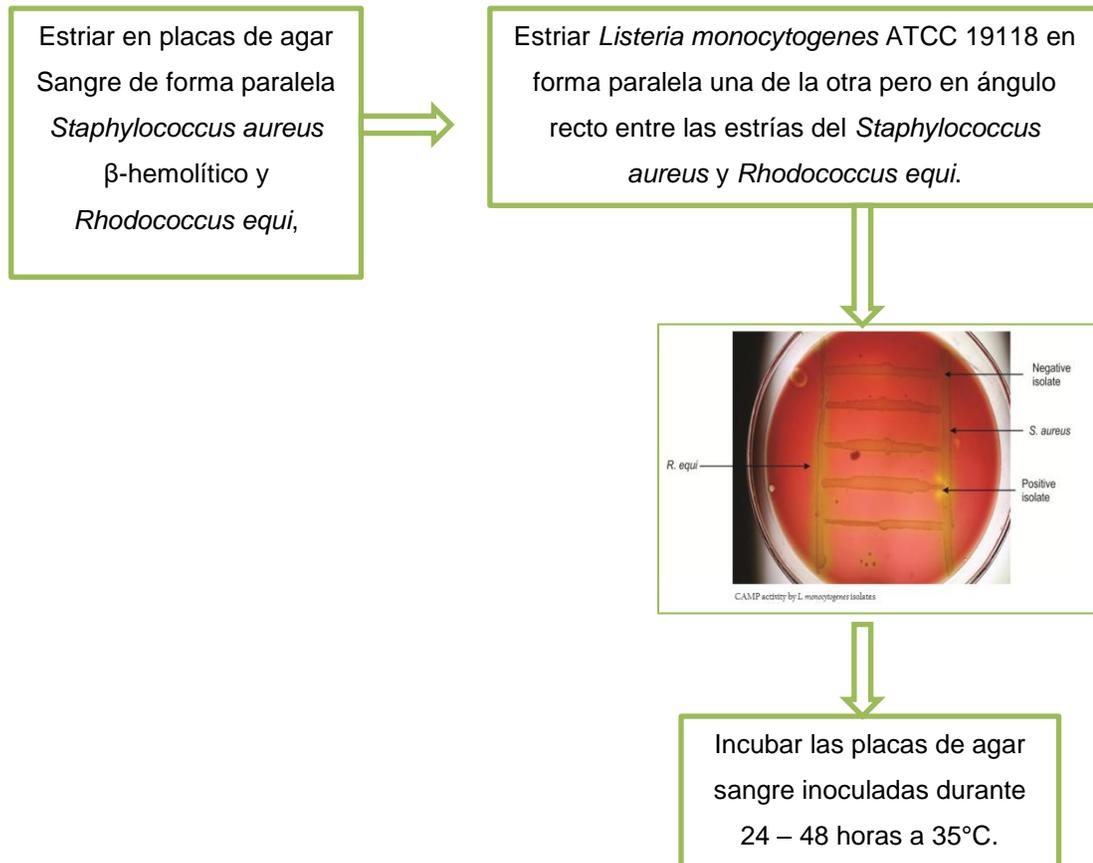


Figura N° 24. Prueba de Camp

ANEXO N° 12

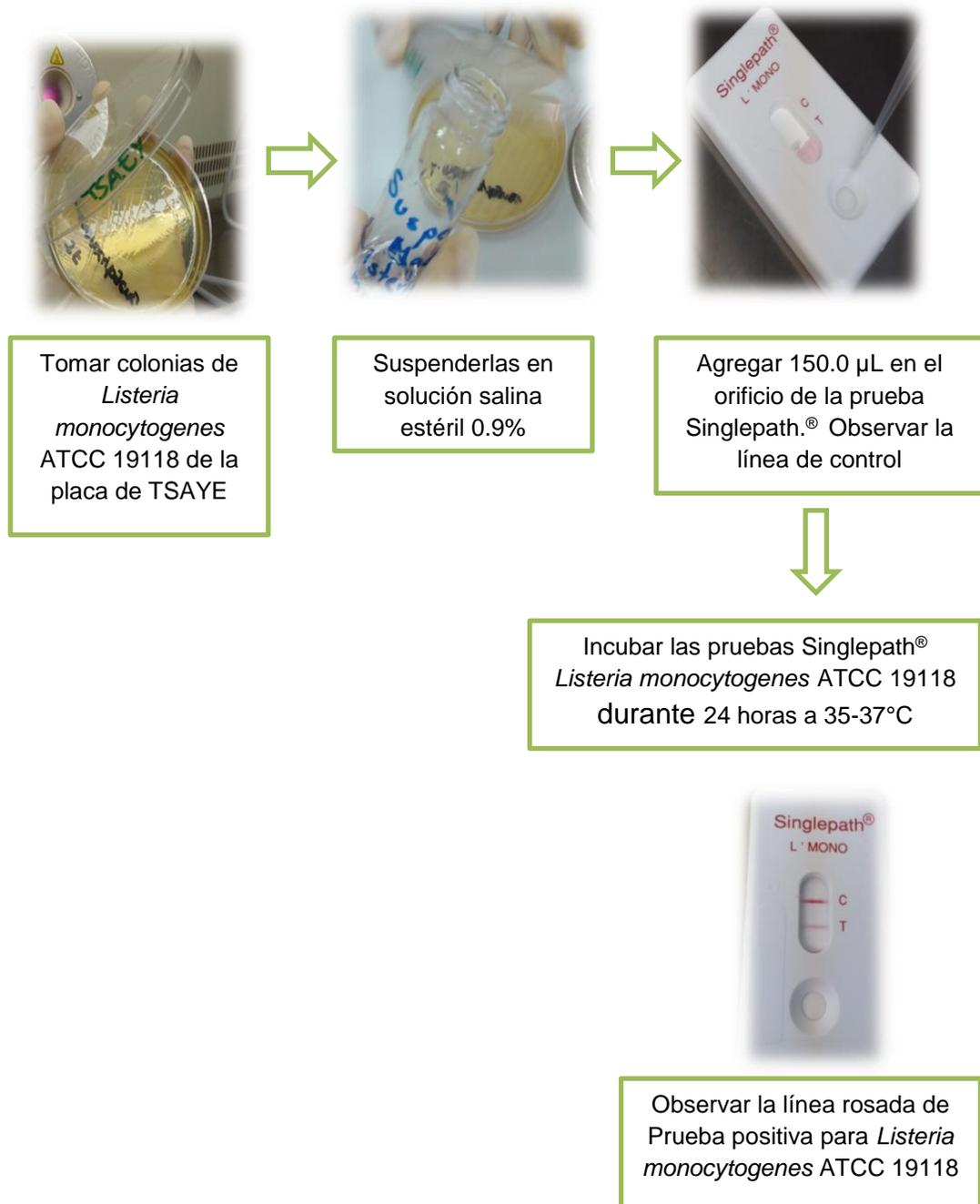


Figura N° 25. Singlepath® *Listeria monocytogenes*

ANEXO N° 13

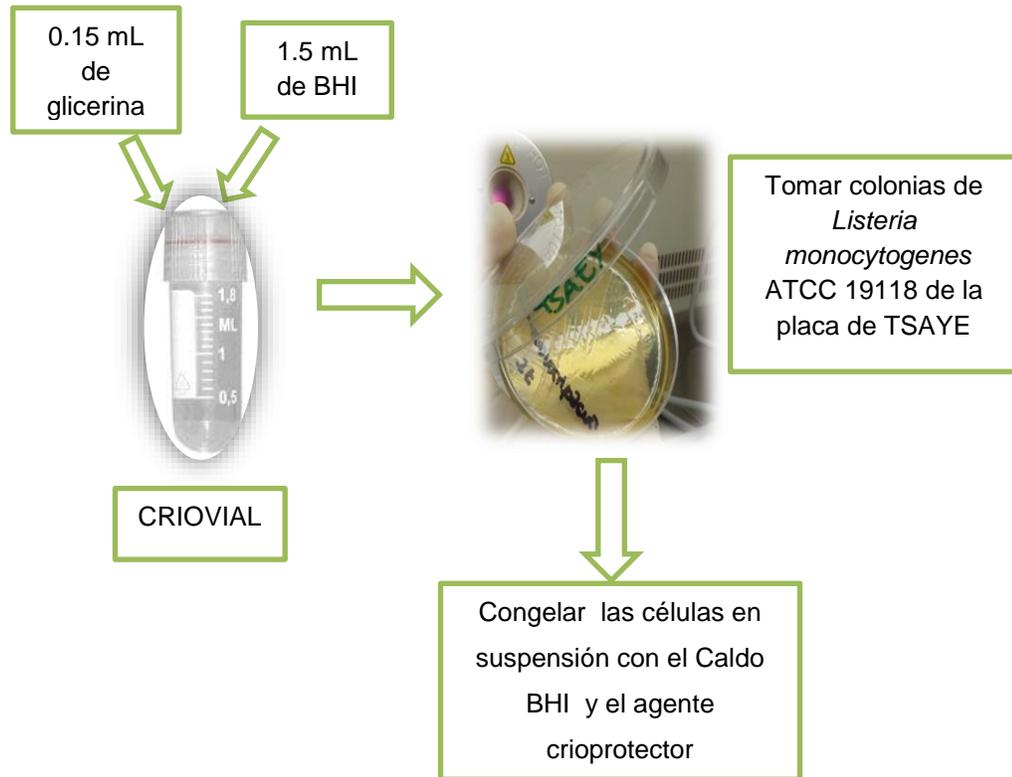


Figura N° 26. Conservación de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118

ANEXO N° 14

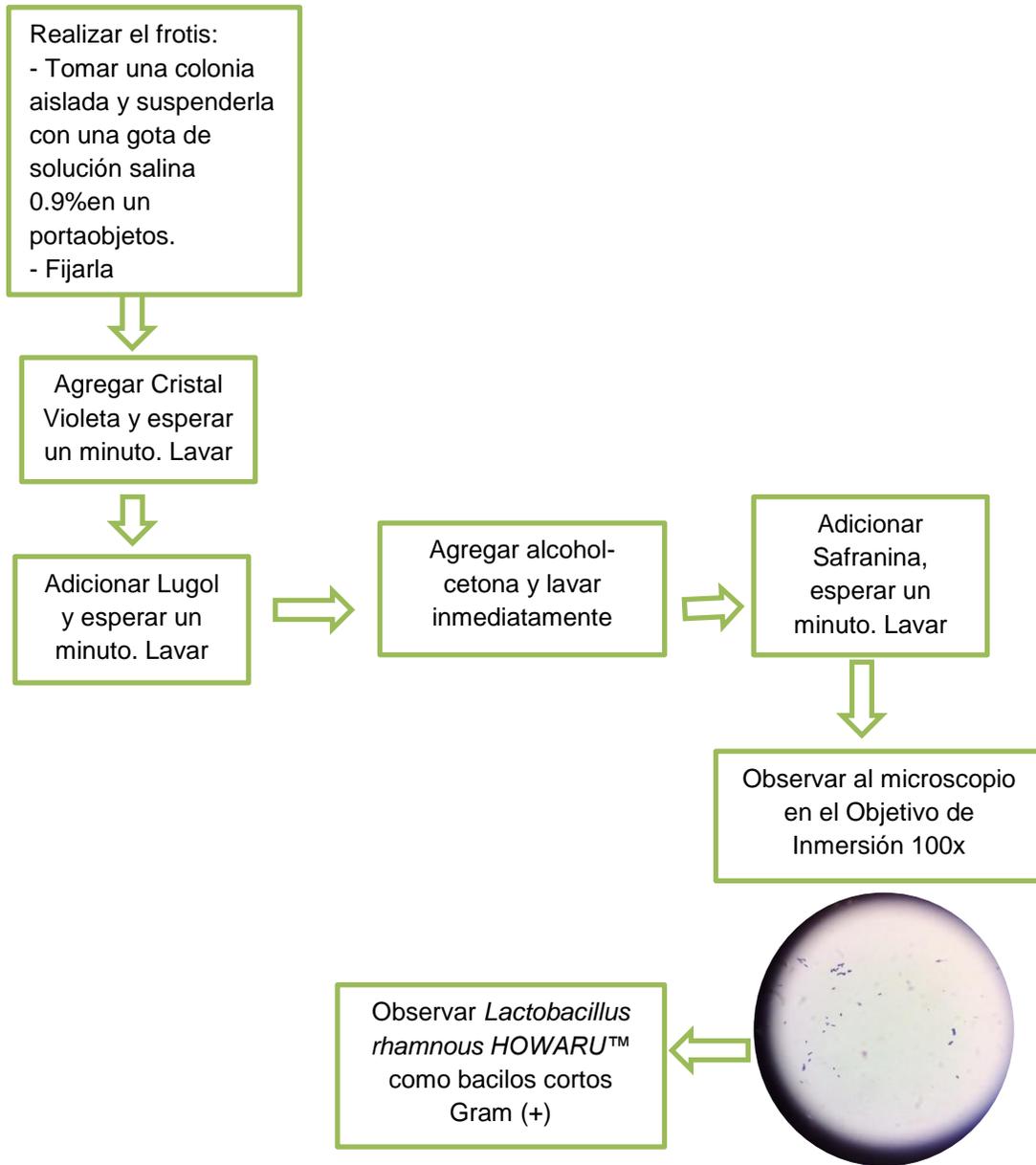


Figura N° 27. Tinción gram de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™

ANEXO N° 15
REGLAMENTO TECNICO CENTROAMERICANO RTCA 67.04.50:08 PARA
EL 1.0 GRUPO DE ALIMENTO: LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS; 1.9
SUBGRUPO DEL ALIMENTO: QUESOS FRESCOS, NO MADURADOS Y
REQUESÓN.

1.9 Subgrupo del alimento: Quesos frescos, no madurados y requesón			
Parámetro	Categoría	Tipo de riesgo	Limite máximo permitido
<i>Escherichia coli</i>	5	A	< 10 UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	7		10 ³ UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	10		Ausencia
<i>Salmonella ssp</i> /25 g	10		Ausencia

Figura N°28. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos.
Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08.

1.9 Subgrupo del alimento: Quesos frescos, no madurados y requesón						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	C	m	M
<i>Escherichia coli</i>	A	2	5	0	< 10 UFC/g	---
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		1	10 ² UFC/g	10 ³ UFC/g
<i>Salmonella ssp/25 g</i>		2		0	Ausencia	---
<i>Listeria monocytogenes/25 g</i>		2		0	Ausencia	---

Figura N° 29. Plan de muestreo y criterios microbiológicos para la vigilancia de alimentos.

ANEXO N° 16

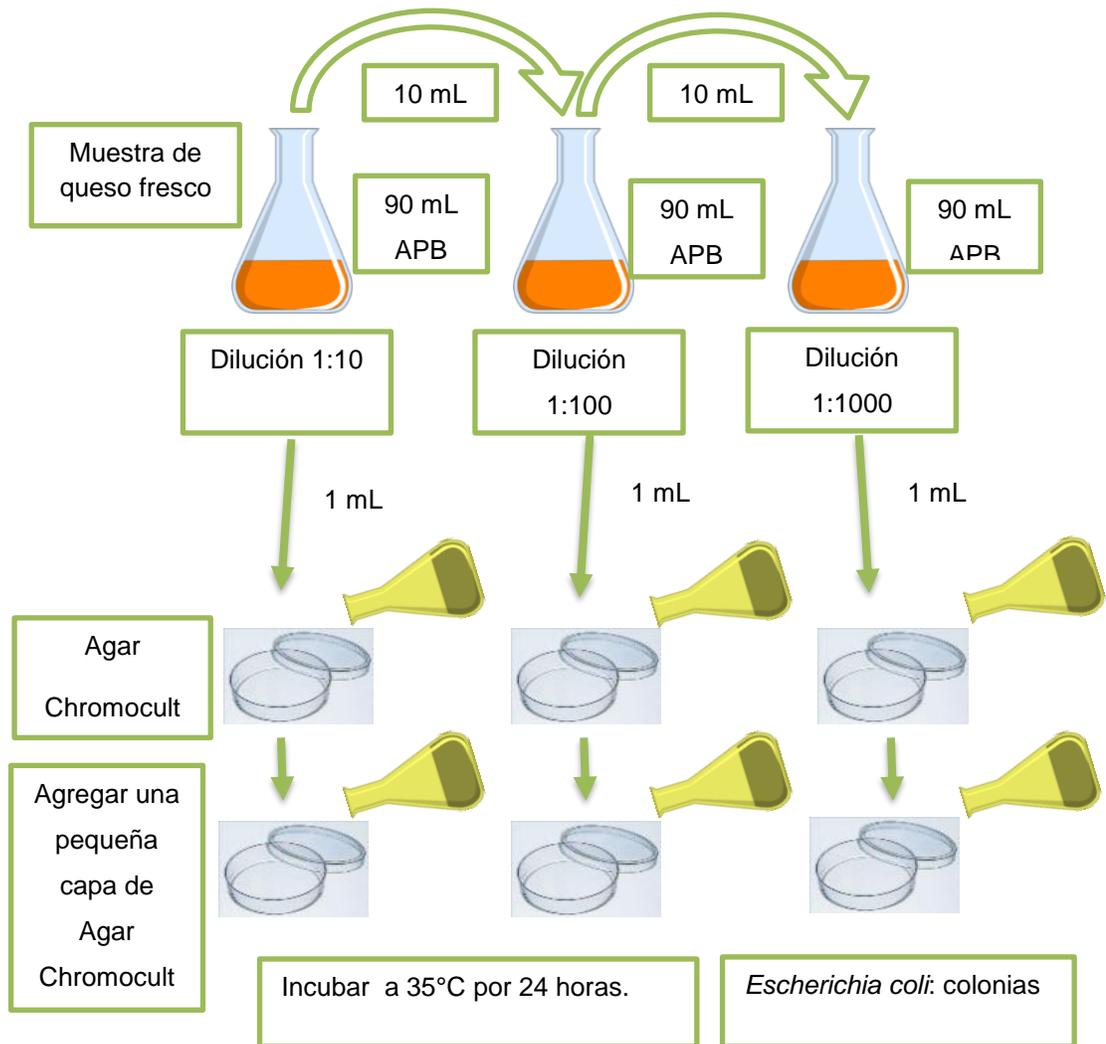


Figura N° 30. Recuento de *Escherichia coli*

ANEXO N° 17

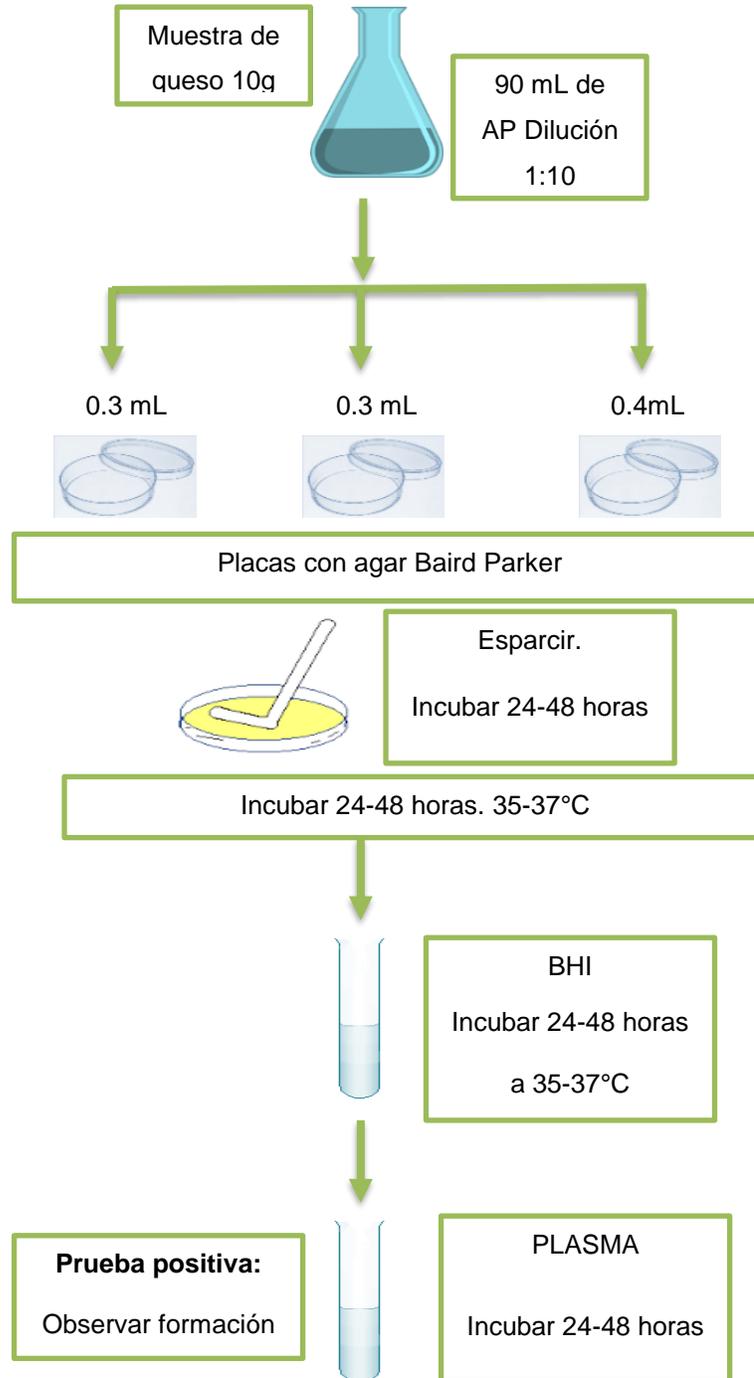


Figura N° 31. Recuento de *Staphylococcus aureus*

ANEXO N° 18

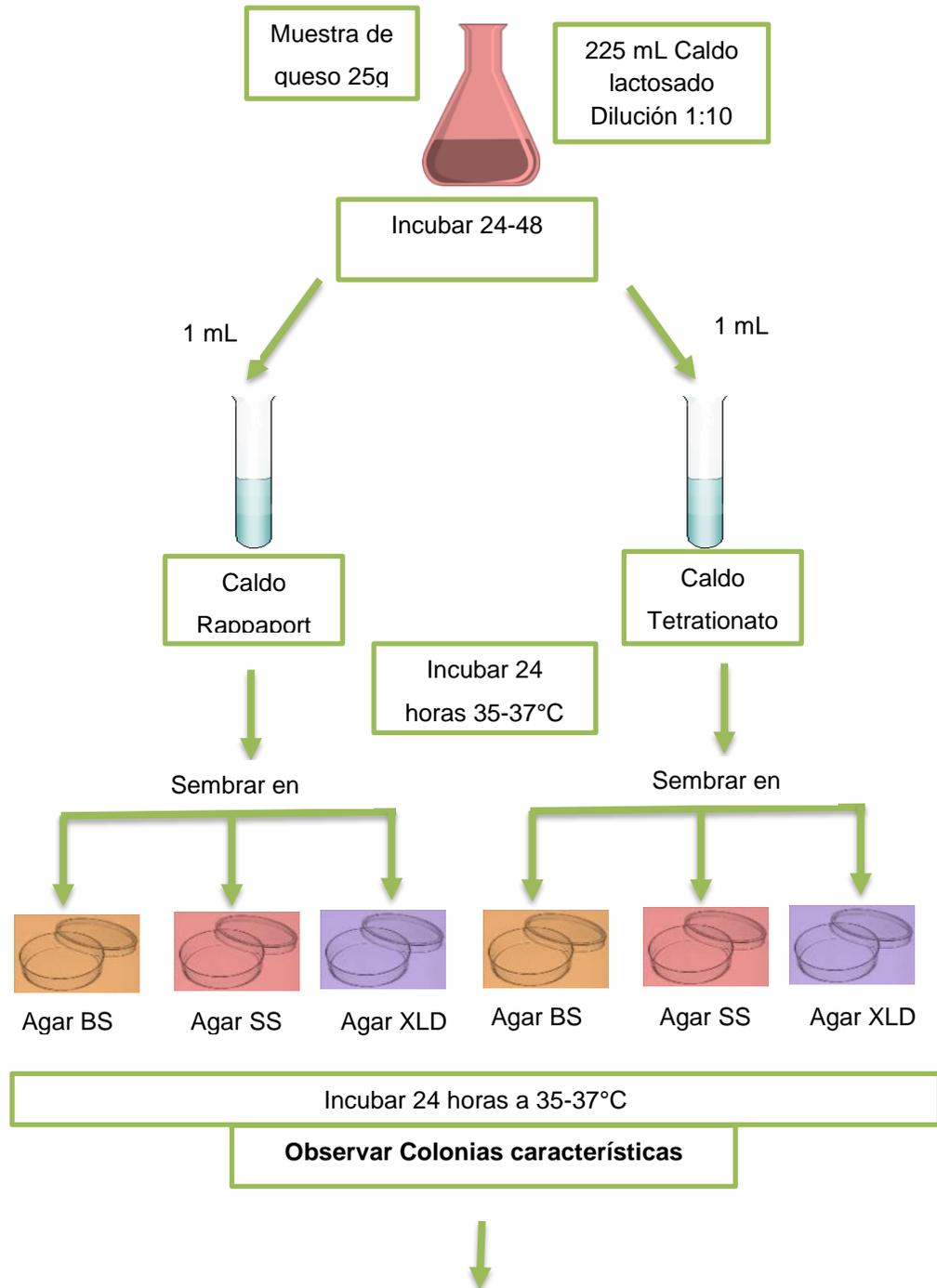


Figura N° 32. Determinación de *Salmonella* spp.

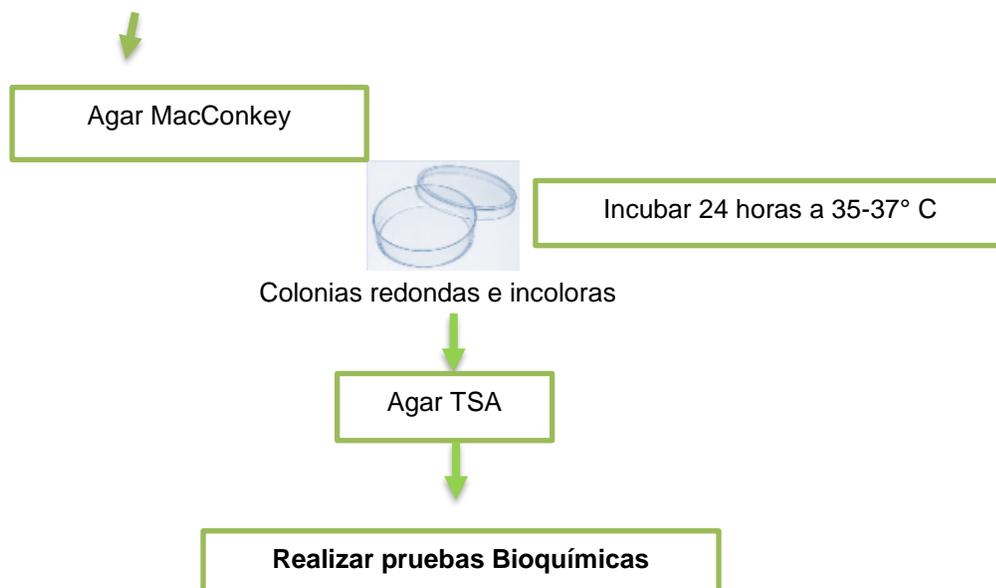


Figura N° 32. Continuación. Determinación de *Salmonella* spp.

ANEXO N° 19

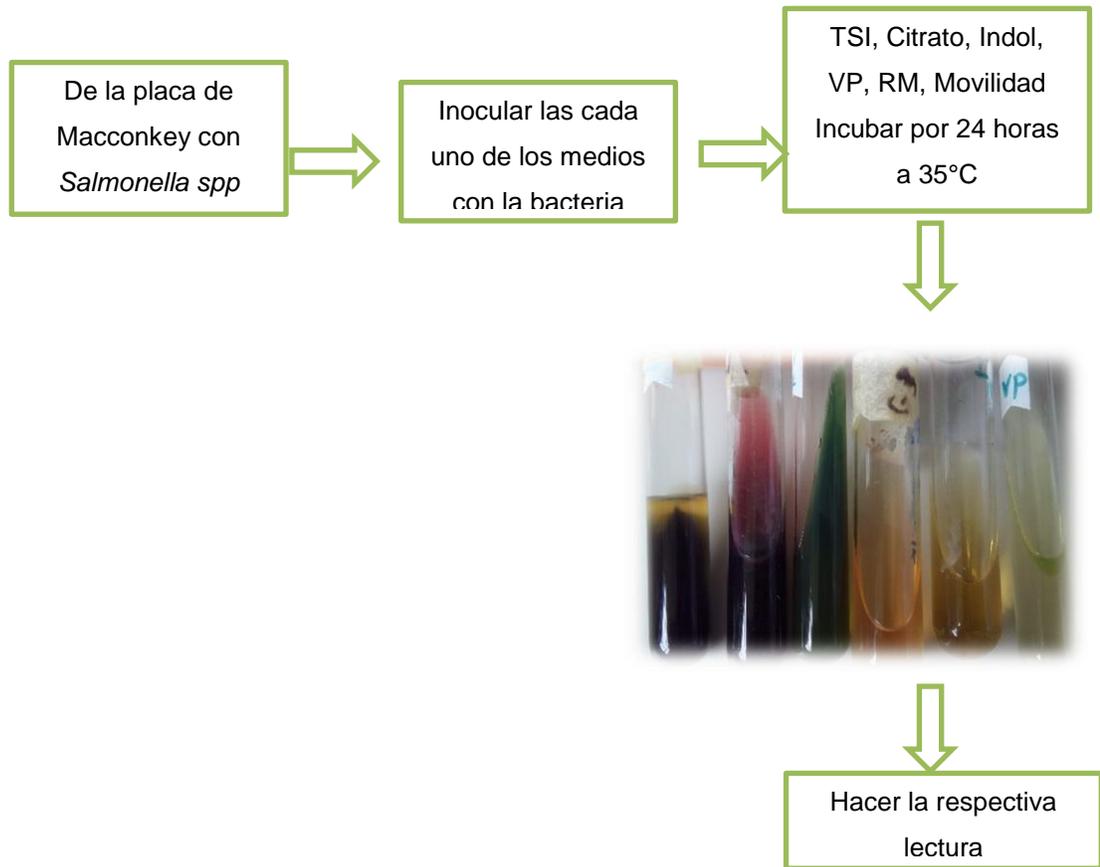


Figura N° 33. Pruebas bioquímicas de *Salmonella spp*

ANEXO N° 20

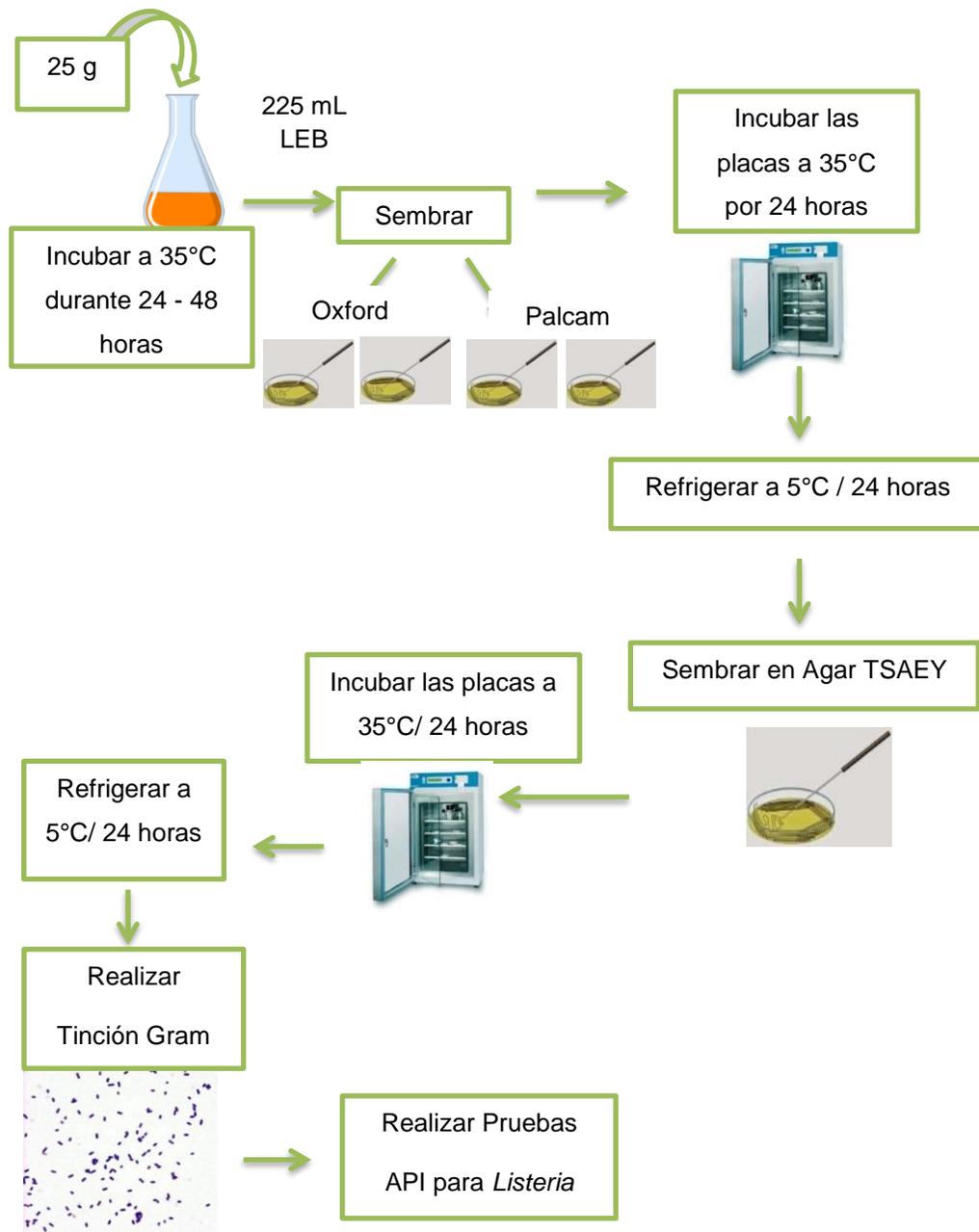


Figura N° 34. Determinación de *Listeria monocytogenes*

ANEXO N° 21
ESTANDARIZACION DE LA BACTERIA PATOGENA *Listeria*
***monocytogenes* ATCC 19118**

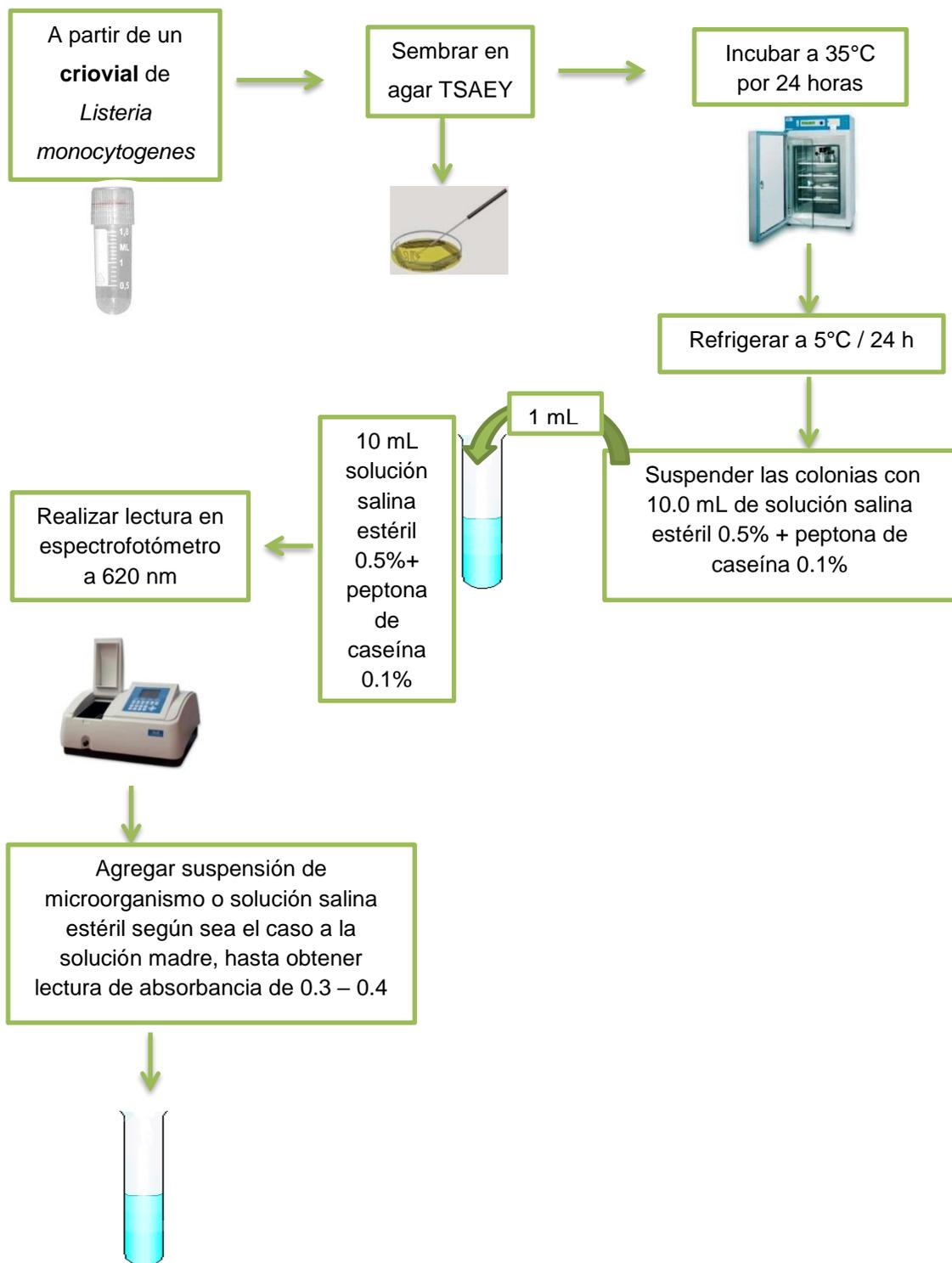


Figura N° 35. Estandarización de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118

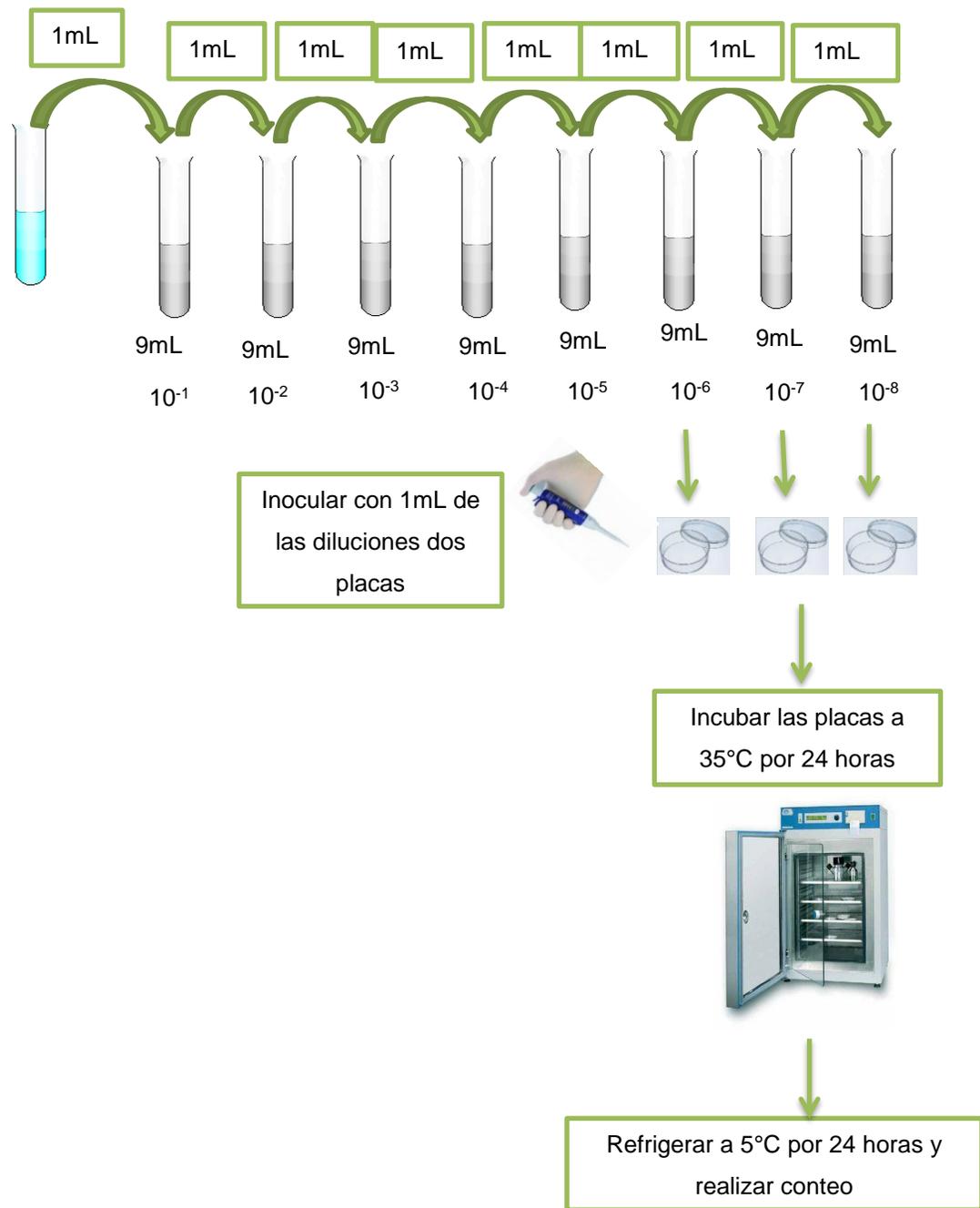


Figura N° 35. Continuación. Estandarización de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118.

ANEXO N° 22
ESTANDARIZACION DE LA BACTERIA PROBIOTICA *Lactobacillus*
***ramnosus* HOWARU™**

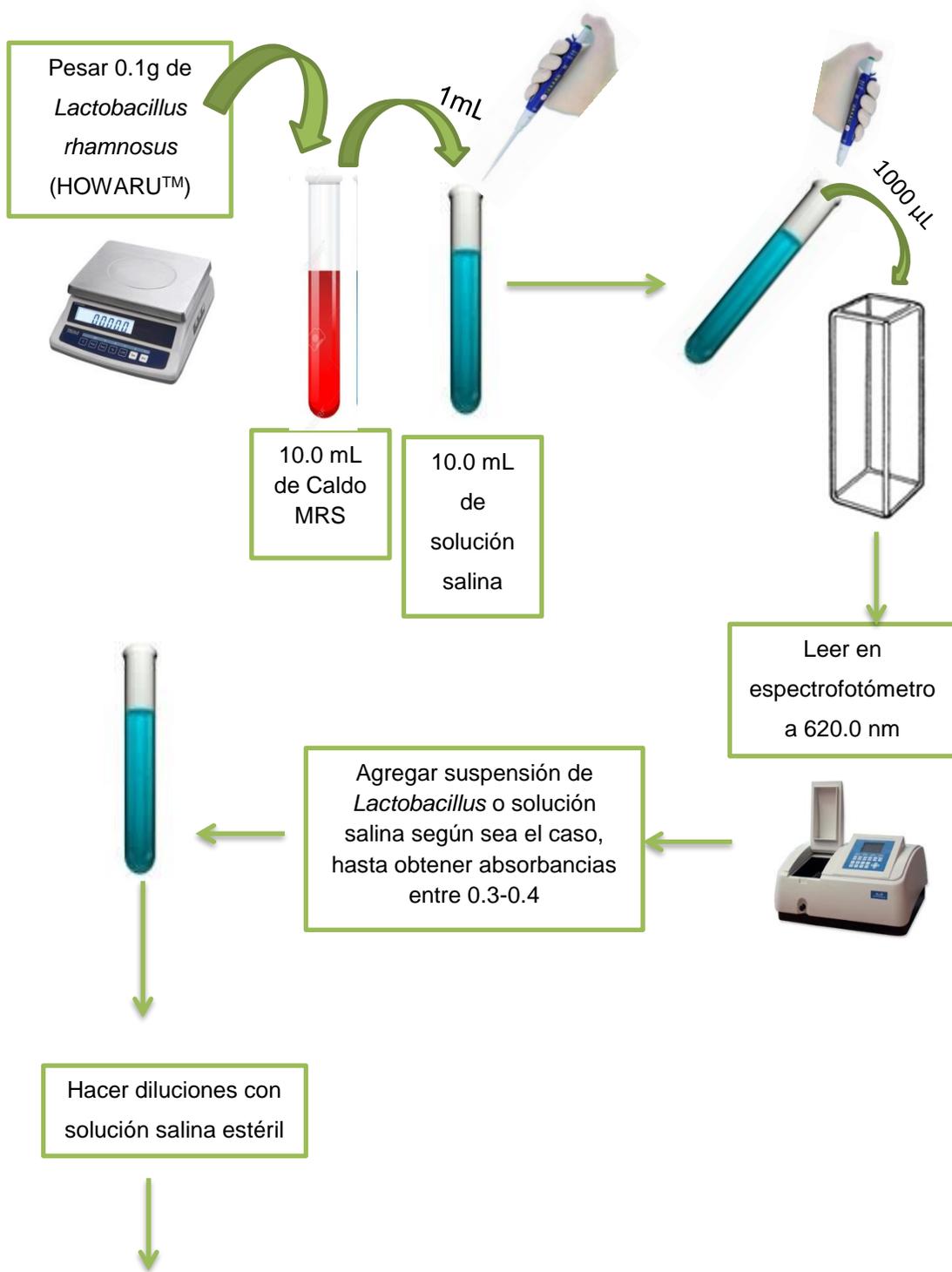


Figura N° 36. Estandarización de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™

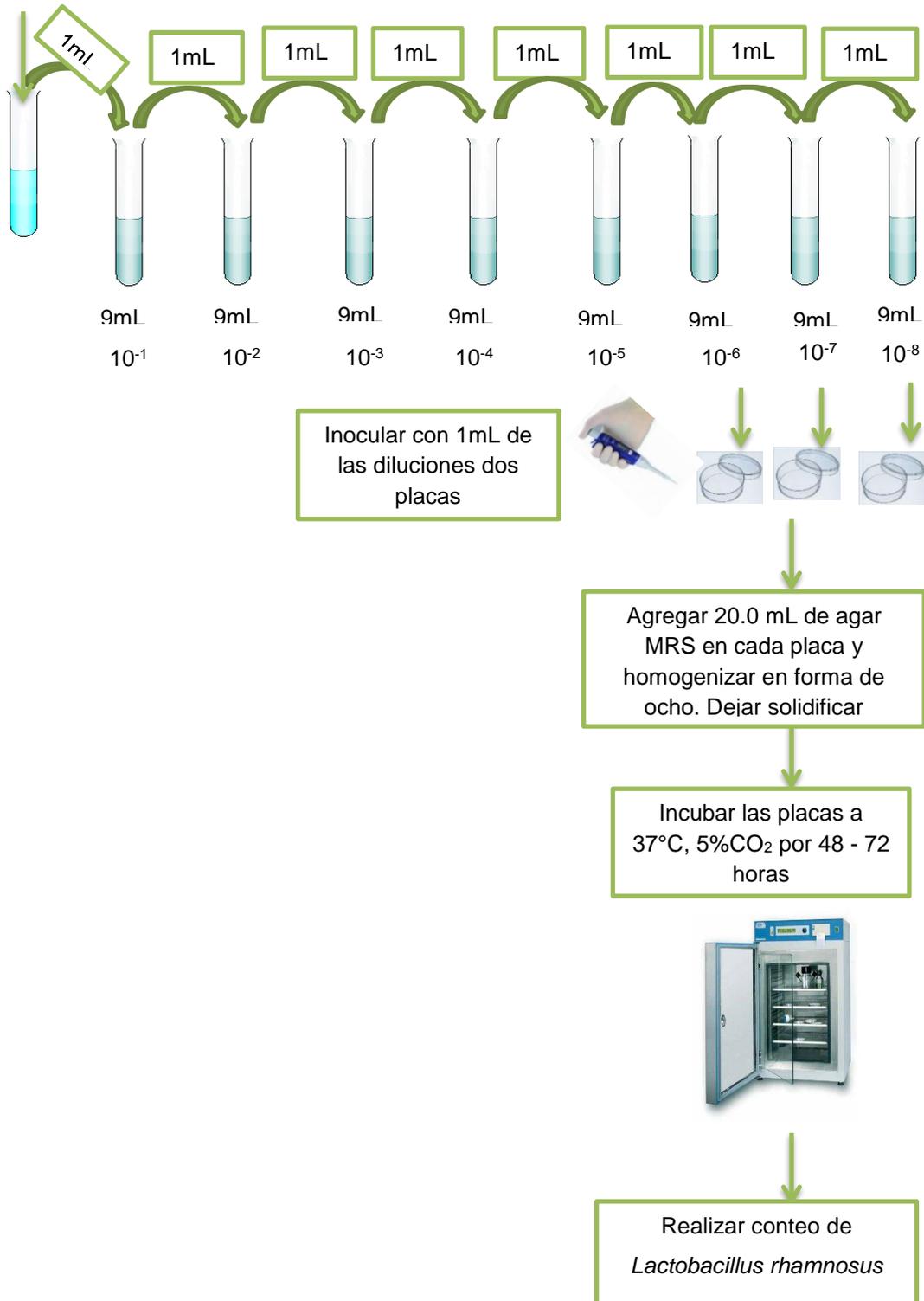


Figura N° 36. Continuación. Estandarización de *Lactobacillus rhamnosus*

ANEXO N° 23
PRIMER ENSAYO *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ 10⁶ UFC/g
FRENTE A *Listeria monocytogenes* 10³ UFC/g

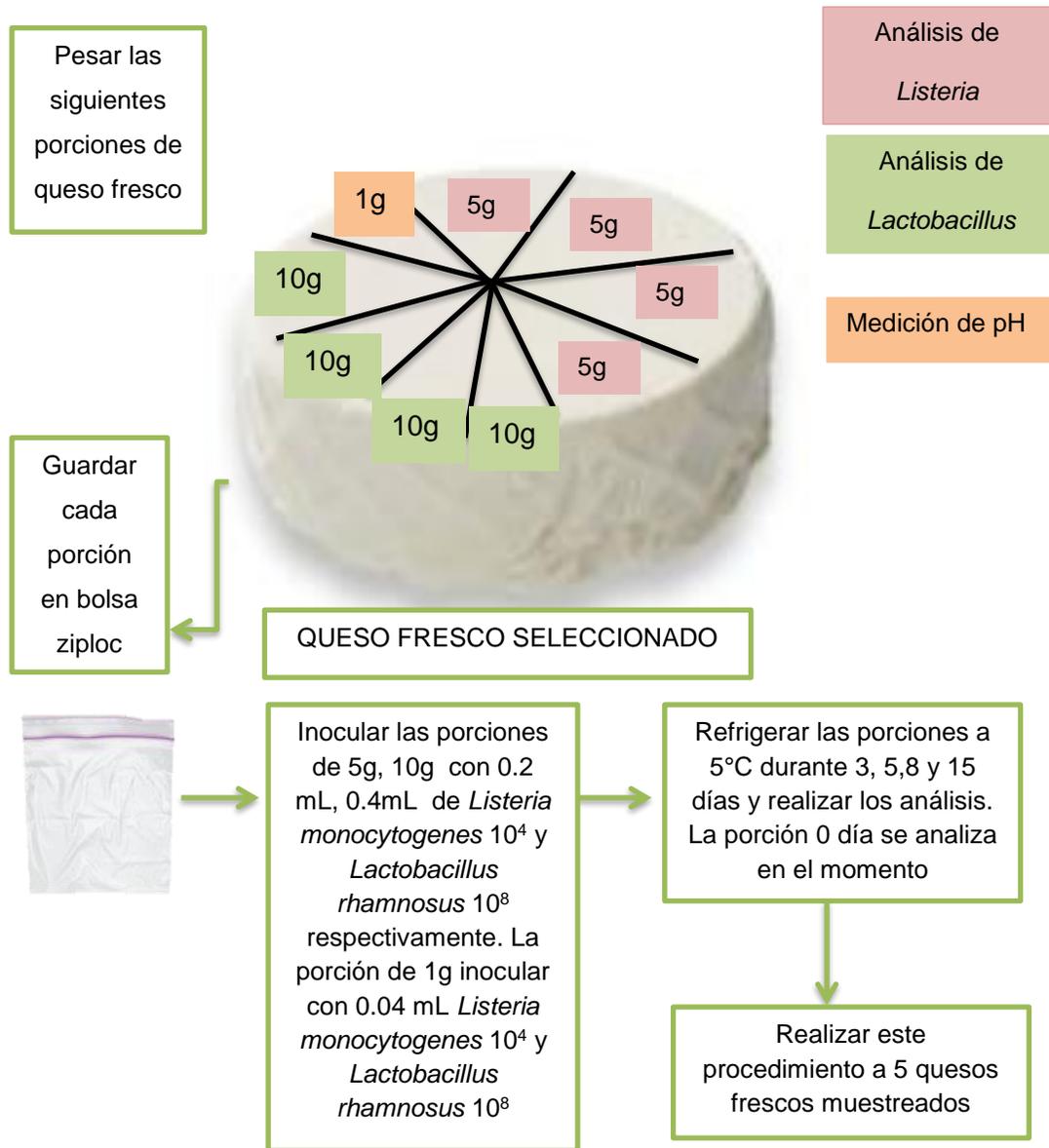


Figura N° 37. Inoculación de los quesos frescos muestreados para el segundo ensayo.

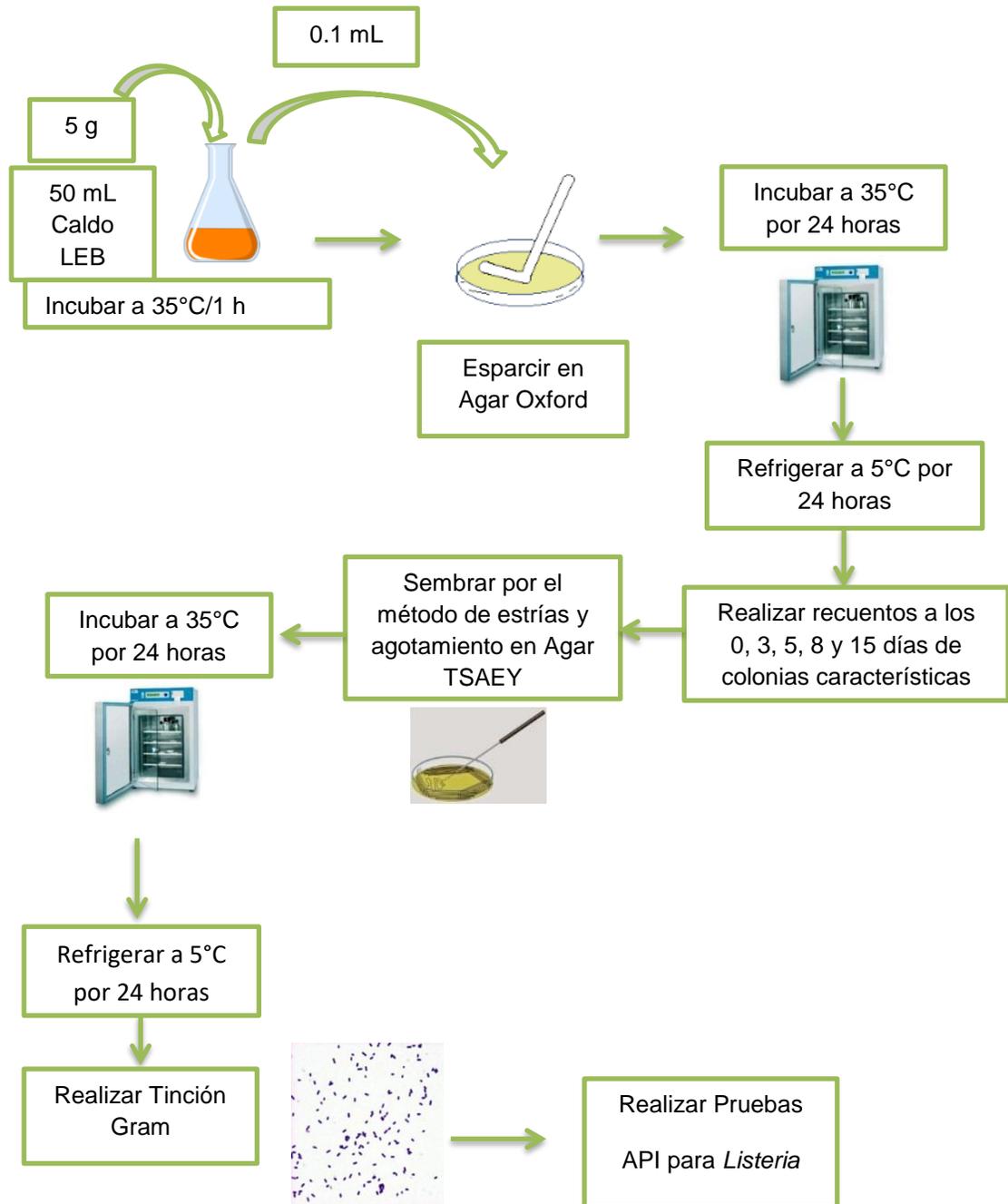


Figura N°38 Recuento de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118

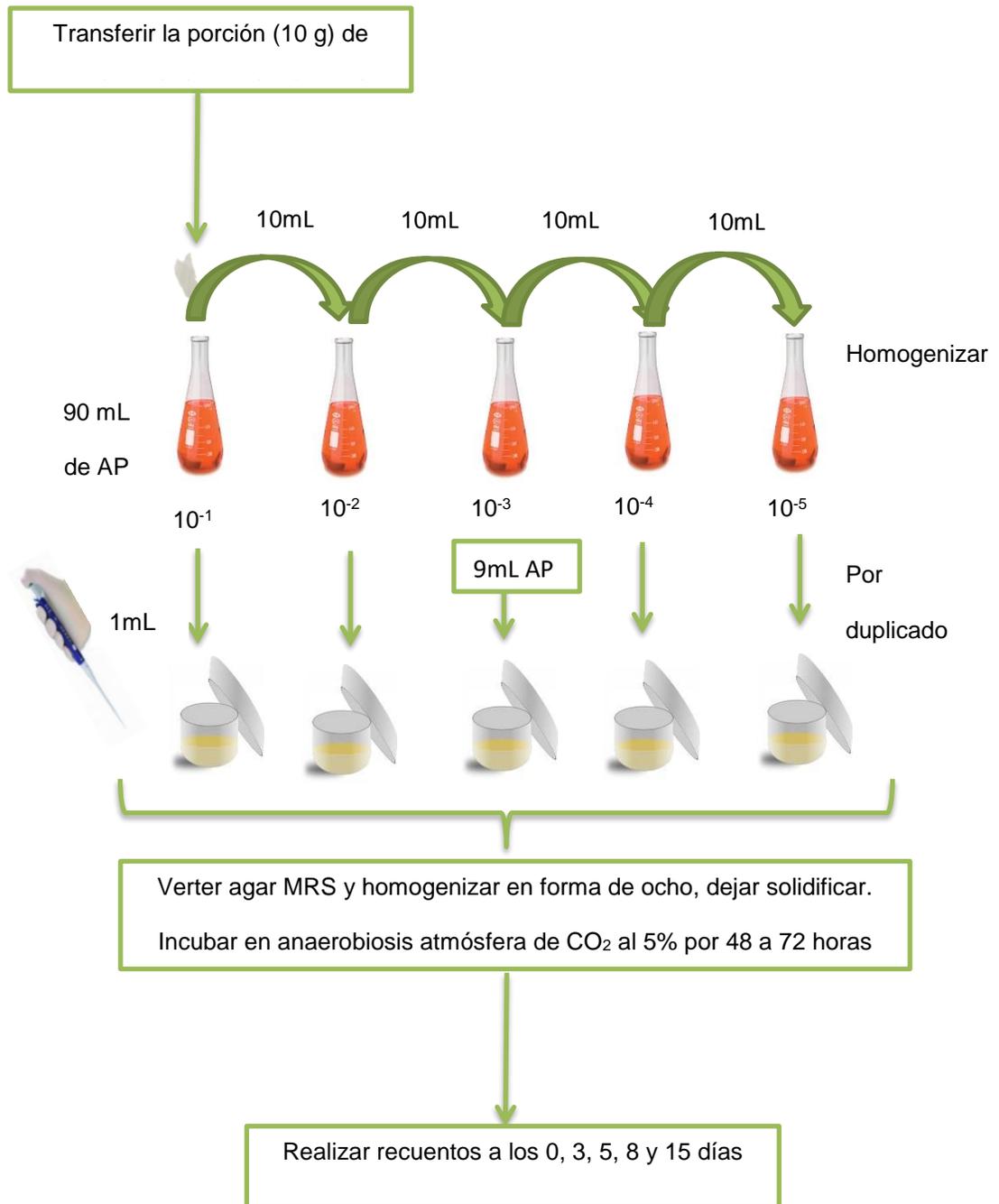


Figura N° 39. Recuento de *Lactobacillus rhamnosus* en primer ensayo.

ANEXO N° 24

**SEGUNDO ENSAYO *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ 10⁷ UFC/g
FRENTE A *Listeria monocytogenes* 10⁵ UFC/g**

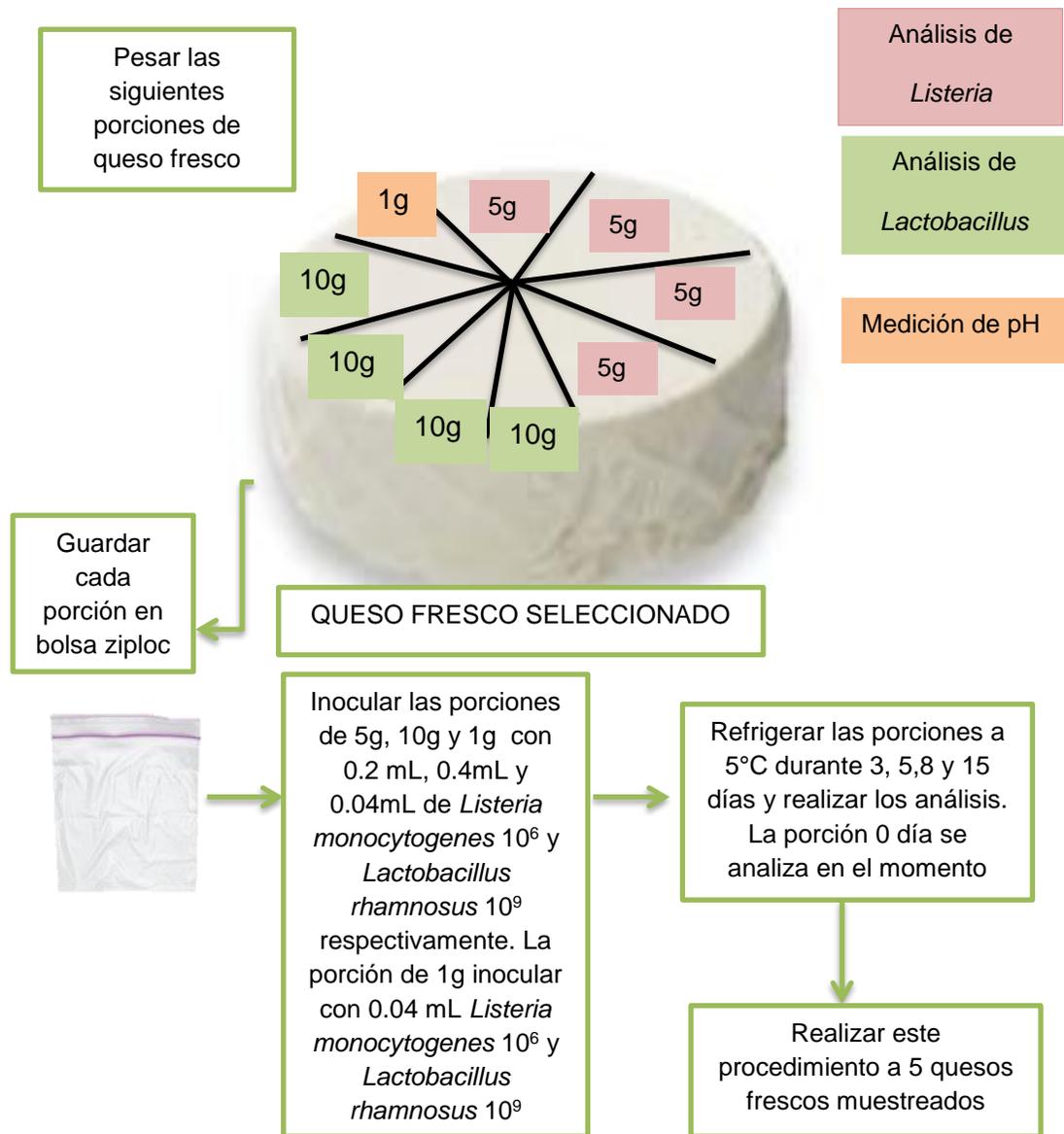


Figura N° 40. Inoculación de los quesos frescos muestreados para el segundo ensayo

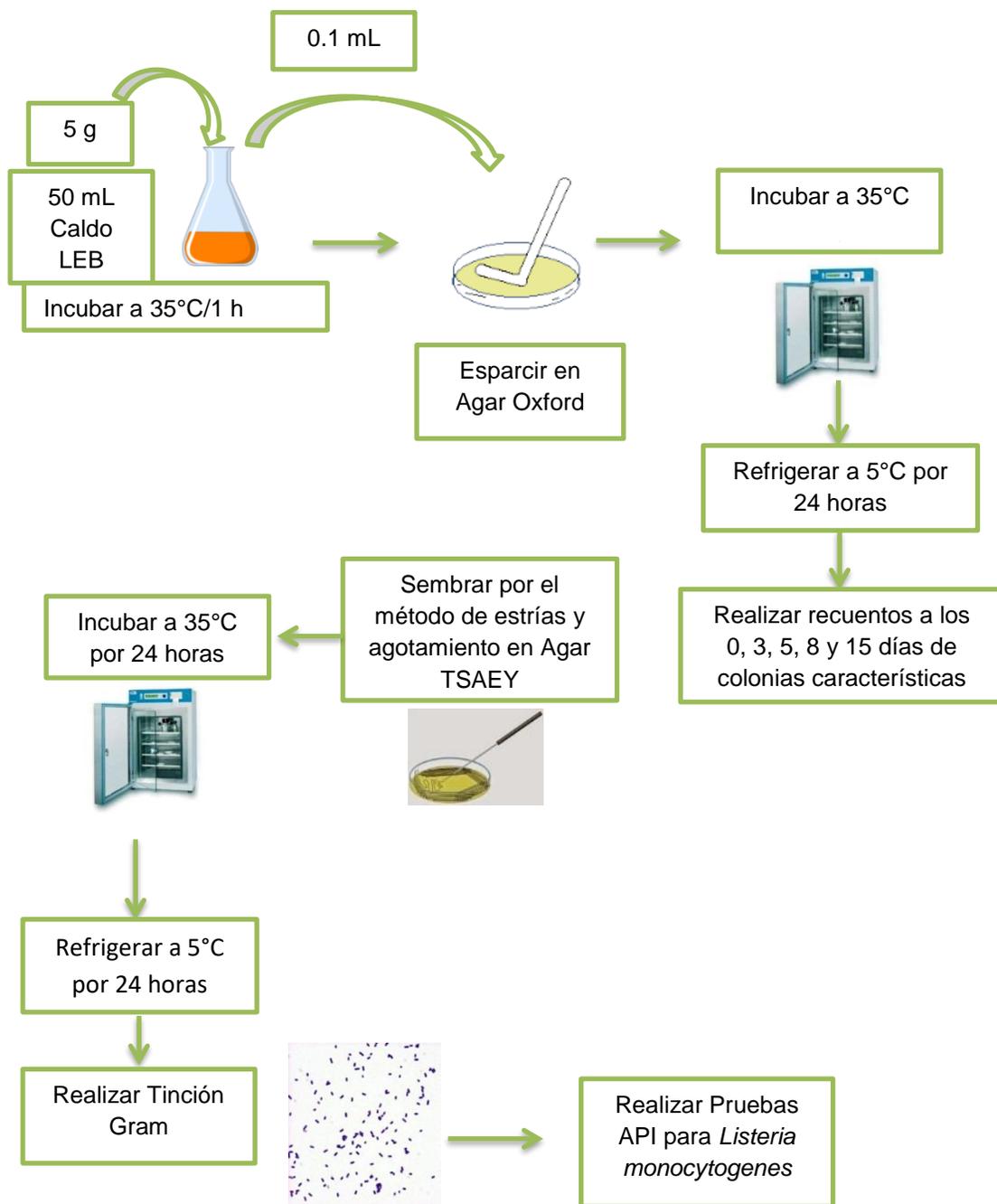


Figura N° 41. Recuento de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118

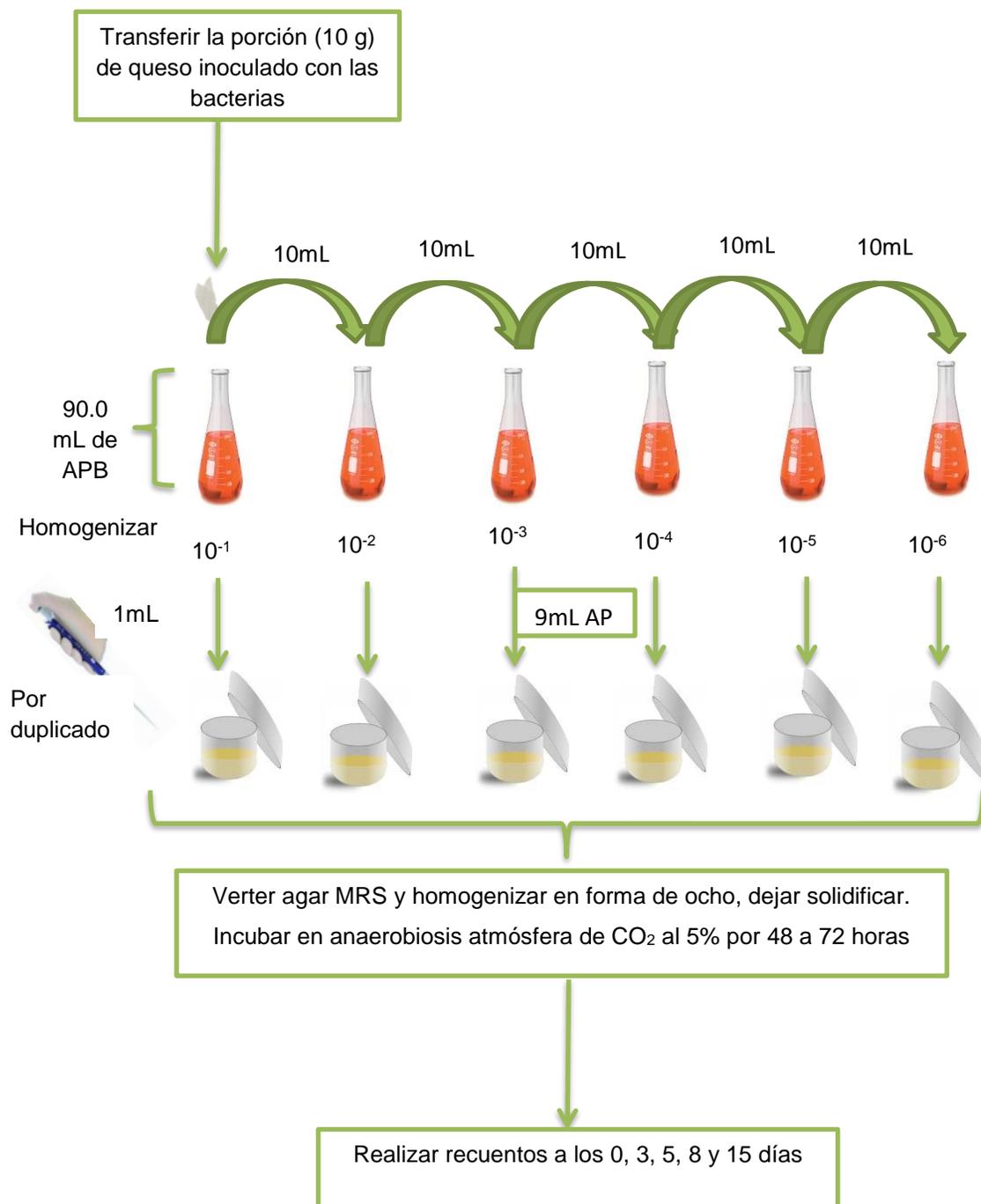


Figura N° 42. Recuento de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ en primer ensayo.

ANEXO N° 25

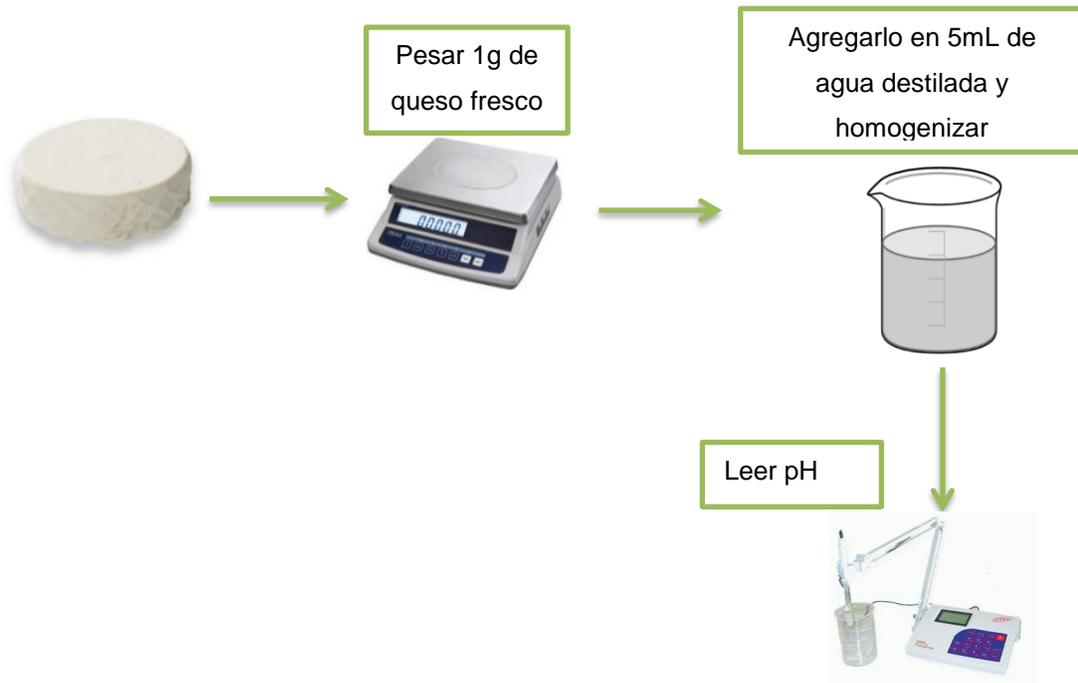


Figura N° 43. Determinación de pH

ANEXO N° 26

Tabla N° 19. Resultados de la sobrevivencia de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ en el primer ensayo de Bioconservación.

CODIGO DE MUESTRA	Día- UFC/g					Día- Ln [UFC/g]				
	0	3	5	8	15	0	3	5	8	15
E1Q1	2,100,000	34,000,000	79,000,000	94,000,000	130,000,000	15	17	18	18	19
E1Q2	4,200,000	34,000,000	140,000,000	57,000,000	610,000,000	15	17	19	18	20
E1Q3	4,300,000	72,000,000	54,000,000	72,000,000	200,000,000	15	18	18	18	19
E1Q4	3,400,000	99,000,000	110,000,000	67,000,000	190,000,000	15	18	19	18	19
E1Q5	3,600,000	96,000,000	45,000,000	100,000,000	170,000,000	15	18	18	18	19
PROMEDIO	3,500,000	67,000,000	80,000,000	70,000,000	260,000,000	15	18	18	18	19

ANEXO N° 27

Tabla N° 20. Resultados de la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en primer ensayo de Bioconservación.

CODIGO DE MUESTRA	DIAS-UFC/g					DIAS-Ln[UFC/G]				
	0	3	5	8	15	0	3	5	8	15
E1Q1	3900	<10	<10	<10	<10	8	2	2	2	2
E1Q2	4100	<10	<10	<10	<10	8	2	2	2	2
E1Q3	3700	<10	<10	<10	<10	8	2	2	2	2
E1Q4	4300	<10	<10	<10	<10	8	2	2	2	2
E1Q5	4000	<10	<10	<10	<10	8	2	2	2	2
PROMEDIO	4000	<10	<10	<10	<10	8	2	2	2	2

ANEXO N° 28

Tabla N° 21. Recuentos promedios de la sobrevivencia de la cepa patógena y cepa probiótica en el primer ensayo de Bioconservación

Día / Bacteria	Lactobacillus rhamnosus HOWARU™ UFC/g	Listeria monocytogenes ATCC 19118 UFC/g	Lactobacillus rhamnosus HOWARU™ (log)	Listeria monocytogenes ATCC 19118 (log)
0	3.500.000	4.000	15	8
3	67.000.000	9	18	2
5	80.000.000	9	18	2
8	70.000.000	9	18	2
15	260.000.000	9	19	2

ANEXO N° 29

TABLA N° 22. Resultados de la sobrevivencia de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ en segundo ensayo de Bioconservación

CODIGO DE MUESTRA	Día- UFC/g					Día- Ln [UFC/g]				
	0	3	5	8	15	0	3	5	8	15
E2Q1	48,000,000	100,000,000	330,000,000	550,000,000	480,000,000	18	18	20	20	20
E2Q2	50,000,000	700,000,000	300,000,000	620,000,000	780,000,000	18	20	20	20	20
E2Q3	51,000,000	600,000,000	460,000,000	620,000,000	630,000,000	18	20	20	20	20
E2Q4	47,000,000	800,000,000	460,000,000	600,000,000	460,000,000	18	21	20	20	20
E2Q5	46,000,000	100,000,000	150,000,000	590,000,000	430,000,000	18	18	19	20	20
PROMEDIO	48,000,000	460,000,000	340,000,000	590,000,000	550,000,000	18	20	20	20	20

ANEXO N°30

Tabla N° 23. Resultados de la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en segundo ensayo de Bioconservación.

CODIGO DE MUESTRA	Días – UFC/g					Días – UFC/g				
	0	3	5	8	15	0	3	5	8	15
E2Q1	220000	390000	360000	360000	450000	12	13	13	13	13
E2Q2	350000	350000	390000	410000	330000	13	13	13	13	13
E2Q3	320000	340000	550000	420000	530000	13	13	13	13	13
E2Q4	540000	680000	660000	530000	390000	13	13	13	13	13
E2Q5	740000	670000	1000000	710000	590000	14	13	14	13	13
Promedio	430.000	480.000	590.000	480.000	450.000	13	13	13	13	13

ANEXO N° 31

Tabla N° 24. Recuentos promedios de la sobrevivencia de la cepa patógena y cepa probiótica en el segundo ensayo de Bioconservación

Día / Bacteria	Lactobacillus rhamnosus HOWARU™ UFC/g	Listeria monocytogenes ATCC 19118 UFC/g	Lactobacillus rhamnosus HOWARU™ UFC/g	Listeria monocytogenes ATCC 19118 UFC/g
0	48.000.000	430.000	18	13
3	460.000.000	480.000	20	13
5	340.000.000	590.000	20	13
8	590.000.000	480.000	20	13
15	550.000.000	520.000	20	13

ANEXO N° 32

Tabla N° 25. Recuentos de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 en los dos ensayos de Bioconservación

DIA	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118 [UFC/g]	
	Ensayo 1	Ensayo 2
0	8	13
3	2	13
5	2	13
8	2	13
15	2	13

ANEXO N° 33

Tabla N° 26. Recuentos de *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU™ en los dos ensayos de Bioconservación

DIA	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HOWARU™ [UFC/g]	
	Ensayo 1	Ensayo 2
0	15	18
3	18	20
5	18	20
8	18	20
15	19	20

ANEXO N° 34

Tabla N° 27. Valores de pH obtenidos en el primer ensayo de Bioconservación

CODIGO DE MUESTRA	pH/ DIA				
	0	3	5	8	15
PATRON	6.71	5.86	5.71	7.00	7.86
E1Q1	6.04	5.37	5.47	5.77	6.43
E1Q2	6.30	5.81	6.05	6.05	7.32
E1Q3	6.00	5.40	5.65	6.37	6.73
E1Q4	5.96	5.60	5.39	5.95	7.25
E1Q5	5.76	5.28	5.31	5.56	5.49

ANEXO N° 35

Tabla N° 28. Resultados del color observado en las muestras del primer ensayo de Bioconservación en comparación con un queso patrón

CODIGO DE MUESTRA	0 DIAS			3 DIAS			5 DIAS			8 DIAS			15 DÍAS		
	Color	Color Blanco-Amarillo	Total	Color	Color Blanco-Amarillo	Total									
PATRON	100%	0%	100%	80%	20%	100%	70%	30%	100%	65%	35%	100%	40%	60%	100%
E1Q1	100%	0%	100%	90%	10%	100%	85%	15%	100%	80%	20%	100%	70%	30%	100%
E1Q2	100%	0%	100%	90%	10%	100%	85%	15%	100%	80%	20%	100%	70%	30%	100%
E1Q3	100%	0%	100%	90%	10%	100%	85%	15%	100%	80%	20%	100%	70%	30%	100%
E1Q4	100%	0%	100%	90%	10%	100%	85%	15%	100%	80%	20%	100%	70%	30%	100%
E1Q5	100%	0%	100%	90%	10%	100%	85%	15%	100%	80%	20%	100%	70%	30%	100%
PROMEDIO	100%	0%		90%	10%		85%	15%		80%	20%		70%	30%	

ANEXO N° 36

Tabla N° 29. Valores de pH obtenidos en el segundo ensayo de Bioconservación

CODIGO DE MUESTRA	pH/ DÍA				
	0	3	5	8	15
PATRON	6.71	5.86	5.71	7	7.86
E2Q1	5.95	5.72	6.31	6.49	6.8
E2Q2	6.14	5.38	6.67	6.08	8.42
E2Q3	5.8	5.45	6.8	6.71	8.17
E2Q4	5.8	5.35	6.16	6.89	7.56
E2Q5	6.02	5.23	6.49	5.93	7.4

ANEXO N° 37

Tabla N° 30. Resultados del color observado en las muestras de segundo ensayo de Bioconservación en comparación con un queso patrón

CODIGO DE MUESTRA	0 DIAS			3 DIAS			5 DIAS			8 DIAS			15 DÍAS		
	Color	Color Blanco-Amarillo	Total	Color	Color Blanco-Amarillo	Total									
PATRON	100%	0%	100%	80%	20%	100%	70%	30%	100%	65%	35%	100%	40%	60%	100%
E2Q1	100%	0%	100%	90%	10%	100%	80%	20%	100%	70%	30%	100%	60%	40%	100%
E2Q2	100%	0%	100%	90%	10%	100%	80%	20%	100%	70%	30%	100%	60%	40%	100%
E2Q3	100%	0%	100%	90%	10%	100%	80%	20%	100%	70%	30%	100%	60%	40%	100%
E2Q4	100%	0%	100%	90%	10%	100%	80%	20%	100%	70%	30%	100%	60%	40%	100%
E2Q5	100%	0%	100%	90%	10%	100%	80%	20%	100%	70%	30%	100%	60%	40%	100%
PROMEDIO	100%	0%		90%	10%		80%	20%		70%	30%		60%	40%	

ANEXO N° 38

Tabla N° 31. Temperaturas de refrigeración en las que se realizaron los ensayos de Bioconservación.

Tiempo (Días)	Temperatura de refrigeración (°C)
0	4.9
1	5.1
2	4.8
3	5
4	5
5	5.1
6	4.9
7	No aplica
8	5.1
9	4.8
10	4.9
11	5
12	5.1
13	4.9
14	No aplica
15	5