

17 JUN. 1983

#500 =  
DICNE

**FECHA DE DEVOLUCION**

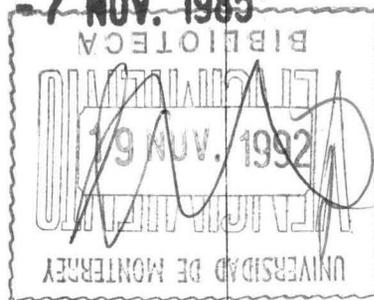
**BIBLIOTECA DEPARTAMENTAL DCNE**

El último sello marca la fecha tope para ser devuelto este libro.

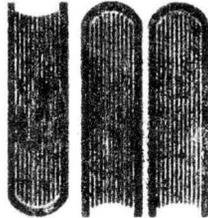
El lector pagará ~~\$5.00~~ <sup>20.00</sup> pesos por cada día que pase una semana después del vencimiento.

~~18 OCT. 1985~~

~~7 NOV. 1985~~



UNIVERSIDAD DE MONTERREY  
DIVISION DE CIENCIAS NATURALES  
Y EXACTAS



UNIVERSIDAD  
DE MONTERREY

*Clasif.*  
040.664  
275.1e  
1983  
C.1

*Título*

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO  
DEL ATUN ENLATADO

*Solis*  
900082

REPORTE DEL PROGRAMA DE  
EVALUACION FINAL  
PRESENTADO POR

*Aut. de*

MARINA A. DEL GRANDE LEYVA

EN OPCION AL TITULO DE  
INGENIERO EN ALIMENTOS

*No. Bo.*  
*Laura E. Barrón*

BIBLIOTECA  
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1983

Aprender  
es descubrir

lo que ya sabes.

Actuar es demostrar que  
lo sabes.

Richard Bach.

Angelo y Josefina, a ustedes les debo lo que soy, porque su presencia en los momentos fundamentales de mi viaje hasta convertirme en mujer ha sido y será invaluable.

Los adora, su hija.

Flora, David, Carlos José, Luis Manuel y Miguel Angel, quienes me han dado lo mejor de ellos, su cariño y apoyo. Siempre los recordaré con amor.

Amigos y Compañeros, en especial a tí Mary, les debo la ternura, la paciencia, las palabras de aliento y el haber compartido conmigo tantas cosas. Me acompañará su recuerdo donde quiera que yo vaya.

Laura Elvira, te agradezco infinitamente la amistad, la confianza y la valiosa colaboración que me brindaste durante este tiempo.

I N D I C E.

	Página.
INTRODUCCION.....	1
MATERIALES Y METODOS.....	20
RESULTADOS.....	27
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	36
RESUMEN.....	44
BIBLIOGRAFIA.....	46

## I N T R O D U C C I O N

A medida que el hombre fue organizando su existencia en comunidad, tuvo la necesidad de disponer de los medios que le proporcionaran una provisión de víveres de reserva para cubrir sus requerimientos alimenticios. Uno de los medios utilizados fue la conservación de alimentos por enlatado, que se viene practicando desde 1795 año en que Nicolás Appert dió a conocer su nuevo descubrimiento para beneficio de la humanidad (4,13).

Appert estableció que el alimento almacenado se conservaba por un período mayor de tiempo, si éste era calentado en recipientes sellados y se realizaban todas las operaciones del método con la mayor higiene y rapidez posible, cuidando de no romper el sello o abrir el recipiente durante el almacenamiento. De esta manera se evitaban las posibles alteraciones de los alimentos, aunque las causas de éstas fueron desconocidas hasta que el científico Louis Pasteur descubrió que los microorganismos eran los responsables de tales alteraciones y fue hasta entonces que se pudo dar explicación a la eficacia del método propuesto por Appert años atrás (4,10,13).

La industria enlatadora en años recientes ha tenido un progreso constante en la eficacia mecánica de las plantas de procesos, lo que ha llevado a un aumento en la producción y en la calidad de los productos, así como también una disminución en los costos. Sin embargo, aunque se conoce que los alimentos pueden ser alterados de diversas maneras por bacterias, levaduras y mohos que logran desarrollarse en ellos, desafortunadamente el mecanismo de muerte térmica de muchos microorganismos no ha sido determinado, siendo este punto de actual interés para mejorar los procesos de enlatado (4,15,17).

Las operaciones unitarias realizadas actualmente para la elaboración de un alimento enlatado son:

**Preparación del Alimento:** En esta etapa se realiza la selección del producto, el calibrado, el lavado, el mezclado y el escaldado o precocimiento. El paso más importante es el escaldado, que consiste en sumergir al alimento en agua caliente o someterlo a la exposición de vapor caliente a una temperatura entre los 82 y 93°C, por un tiempo previamente determinado, dependiendo del producto que se está tratando, antes de enlatarlo (7,8,14).

**Enlatado:** El llenado de la lata es un proceso que puede ser mecánico o manual; este paso debe ser cuidadosamente controlado, teniendo en cuenta la consistencia y el peso bruto del alimento que se incluye en cada recipiente, para facilitar los siguientes pasos del proceso (7,8,14).

**Evacuación:** Operación esencial que consiste en la expulsión del aire de la lata antes de cerrarla. Se realiza para disminuir fugas posteriores al cerrado debido a la tensión interior, expulsar el oxígeno que acelera la corrosión interna y crear un vacío cuando ésta se haya enfriado. En los procesos industriales se evacúa el aire

utilizando calor, inyectando vapor o mecánicamente dependiendo del alimento que se va a enlatar (7,8,14).

Cerrado: Este paso estriba en cerrar la lata una vez terminada la evacuación. Se realiza por métodos mecánicos y debe cumplir con los requisitos establecidos para el cierre. Cuando el insertado es perfecto se obtiene un cierre eficiente y hermético, sin embargo, cualquier defecto puede dar lugar a que el cierre sea incapaz de resistir la presión durante el tratamiento térmico posterior o presentar fugas con la consiguiente alteración del contenido de la lata durante el enfriamiento y el almacenamiento (7).

Tratamiento Térmico: En esta fase se calienta la lata en una atmósfera saturada de vapor o agua caliente durante un tiempo y a una temperatura predeterminados. Esta operación, en la industria alimenticia se conoce como "procesado" y puede ser considerada como el punto crucial de todo el proceso de enlatado, ya que las propiedades de conservación y calidad del producto dependen de la realización correcta de la técnica empleada. Generalmente se realiza en autoclaves o retortas (7,8,10,14,23).

Enfriado o Refrigeración: Una vez concluido el tratamiento

térmico, se enfría la lata con la mayor rapidez posible para evitar la separación de las juntas y prevenir el sobrecalentamiento de los alimentos. Esta operación es muy importante y un error puede ser causa de considerables inconvenientes y pérdidas (7,8,9,14).

Para lograr una mayor eficacia en el proceso de enlatado, es importante que deba transcurrir el menor tiempo posible entre la preparación y el terminado del alimento para evitar alteraciones posteriores (4,8).

La experiencia práctica demuestra que existe una relación entre el número de microorganismos presentes en un alimento y el calentamiento necesario para destruirlos, el cual solo asegura la esterilización cuando el producto no está excesivamente contaminado, por lo tanto en la preparación del alimento, es necesario controlar el número de microorganismos que potencialmente puedan llegar a producir alteraciones. Por otra parte también se ha demostrado que la posibilidad de que los microorganismos lleguen al producto envasado a través de las juntas y le provoquen alteraciones, está determinada por la condición microbiológica del

agua de enfriado, empleada en el proceso (8,9).

Las fuentes de contaminación microbiana de los alimentos pueden ser:

Materia Prima: Todos los productos naturales empleados para enlatar deben estar sanos y limpios, para que no se resienta la calidad del producto final y se puedan llegar a controlar las posibles alteraciones futuras. Para la preparación y envasado de los alimentos se requiere una escrupulosa limpieza y una estricta obediencia a los principios sanitarios. El sueldo es una fuente prolífica de microorganismos y muchas alteraciones se deben a gérmenes procedentes del mismo. En general, el organismo que se encuentra con mayor frecuencia en las materias primas es Bacillus coagulans, seguido por B. subtilis y B. licheniformis (8).

Fábrica: El control de la contaminación microbiana en la fábrica de enlatados descansa en la posesión de un equipo diseñado y construido adecuadamente en la eficacia de los procedimientos de limpieza (6,8).

Envase. Además de la posible entrada de microorganismos a través de las suturas defectuosas, el envase mismo puede ser fuente de contaminación de los alimentos. Desde el punto de vista microbiológico, su importancia radica en su condición higiénica (6,8).

Agua de Enfriamiento. La gran mayoría de las latas que presentan fugas debido a que el compuesto adherente de la junta está en estado relativamente blando, se contaminan durante la fase de enfriamiento por la penetración de pequeñas cantidades de agua a través de la sutura, aumentando así las posibilidades de que las bacterias sean arrastradas al interior de la lata. El grado de contaminación dependerá de la carga microbiana del agua. Uno de los métodos empleados con mayor éxito para reducir el contenido microbiano del agua de enfriamiento consiste en añadir al agua soluciones germicidas. Sin embargo, es necesario aclarar que el enfriamiento de las latas, deficientemente cerradas, utilizando agua con un número reducido de microorganismos, puede evitar la contaminación durante este proceso, pero siempre existirá el riesgo de una contaminación posterior debido a la penetración del aire (6,8,16).

Las alteraciones que pueden sufrir los alimentos enlatados pueden deberse a causas químicas y/o biológicas. El deterioro químico más importante se debe al abombamiento por la generación de hidrógeno, que es favorecida por la acidez del alimento, la temperatura elevada de almacenamiento, las imperfecciones del estañado y del barnizado interior de la lata, la evacuación insuficiente y la presencia de sulfatos y fosfatos solubles. Otros defectos son los causados por la interacción entre la base metálica del bote y el contenido del mismo: como por ejemplo, la coloración anormal del interior de la lata y del alimento, la producción de sabores y/u olores anormales, el enturbiamiento del líquido o jarabes, la perforación del metal y la pérdida del valor nutritivo (1,6,15,22).

La alteración biológica del alimento enlatado por microorganismos puede ser consecuencia de la supervivencia de éstos después del tratamiento térmico y/o los defectos del recipiente que permiten la entrada de organismos una vez terminado el tratamiento térmico. Estos microorganismos presentan gran diversidad de actividades metabólicas y, por lo tanto, pueden alterar a los alimentos de muchas formas. Los microorganismos que contaminan a los alimentos pueden ser saprófitos, que causan determinadas alteraciones químicas y hacen inadecuado al alimento para el consumo humano o pató-

genos para el hombre, que pueden dar origen a graves infecciones o intoxicaciones cuando son ingeridos (2,6,11,15,17).

Para establecer la clasificación de las alteraciones biológicas que puede sufrir un alimento, es conveniente agruparlos en base a su acidez:

- 1.- Alimentos de Baja Acidez: presentan un pH mayor o igual a 5.3. Entre ellos se encuentran los productos cárnicos y los marinos, la leche y ciertas hortalizas.
- 2.- Alimentos de Mediana Acidez: alimentos con un rango de pH entre 4.5 y 5.3. Las mezclas de alimentos cárnicos y vegetales, las especialidades como el spaghetti, las sopas, las salsas, los espárragos, la remolacha y las espinacas están consideradas en este grupo.
- 3.- Alimentos Ácidos: estos alimentos presentan un pH entre 4.5 y 3.7. Se toman como ejemplo, el tomate, la pera, el higo, la piña, y otras frutas.
- 4.- Alimentos de Alta Acidez: son aquellos con pH menor o igual a 3.7. En este grupo están considerados los encurtidos, la toronja, la mora, la fresa y otras frutas semejantes (1,4,6,8).

Sin embargo, debido a que la acidez guarda una estrecha relación con el tipo de alteración biológica que puede sufrir el alimento, para la clasificación de las alteraciones mi-

crobiológicas es conveniente agrupar a los alimentos en:

1.- Alimentos de Baja Acidez: que comprende a los alimentos con un pH igual o mayor a 4.6.

2.- Alimentos Acidos: que incluye a los alimentos con un pH menor de 4.6 (2,6,8).

Por lo tanto las alteraciones microbiológicas de los alimentos enlatados con Baja Acidez se agrupan en las siguientes categorías:

Alteración Insipiente: Se presenta cuando el producto se expone a temperaturas favorables para el desarrollo de los microorganismos por un largo período de tiempo antes del proceso de enlatado y esterilización. Como consecuencia de ésto, las latas pueden presentar una considerable pérdida de vacío, en casos extremos presentar abombamiento y en algunos productos hasta puede verse disminuido el pH. En este caso si se examinan las muestras directamente al microscopio, después de la esterilización, se observarán numerosas bacterias, sin embargo los cultivos de los productos incubados a 37 y 55°C no mostraran crecimiento (2,20,21,22).

Alteración Densa dentro del Proceso: Puede ser consecuencia de un tratamiento térmico deficiente, que provoca una textura dura en los alimentos sólidos debido a una cocción

heterogénea y además puede evitar la destrucción de bacterias formadoras de esporas. Generalmente el exámen microbiológico directo y de los cultivos incubados a 30-37°C muestran la presencia de una flora mixta no esporogena. Si existen fugas en la retorta esta alteración se puede presentar en algunas latas o en forma generalizada (2,6,8,20,21).

Alteración por Fugas: Consiste en la penetración de microorganismos al interior de la lata que ha sido esterilizada, pudiendo llegar a detectarse la presencia de bacilos gram negativos que no tienen importancia para la salud, Lactobacillus spp., Micrococcus spp., Microbacterium spp., Leuconostoc spp. y especies de enterococos, además, pueden ser aislados levaduras y mohos en cultivos incubados a 30°C. Las causas de esta alteración se pueden agrupar en factores relacionados con los materiales de la lata o con la manipulación de la misma y factores relacionados con el proceso o las operaciones de procesado (2,6,8,20,21,22).

Alteración Termofílica: Las alteraciones causadas por microorganismos termófilos son de tres tipos:

a) Agriado Plano: se llama así, porque la lata conserva su concavidad normal durante el agriado o producción de ácido láctico, y se caracteriza por la presencia del Bacillus stearothermophilus y por el ligero descenso del pH. Esta alteración se detecta por métodos de cultivo. Las bacte-

rias causantes, suelen proceder principalmente del equipo de la fábrica, de los escaldadores, pero también pueden provenir de las materias primas o del suelo.

b) Alteración por Termófilos Anaerobios ("T,A".): se presenta por mantener la lata durante largo tiempo a temperaturas elevadas, lo que ocasiona que se desarrolle el Clostridium thermosaccharolyticum, que es un termófilo anaerobio obligado, no produce ácido sulfhídrico pero sí otros ácidos, escinde los azúcares, forma esporas y gas, el cual hincha el bote, llegando a reventarlo si éste se mantiene prolongadamente a altas temperaturas. Este microorganismo no forma fácilmente colonias en agar, por lo que se detecta sembrándose en medios líquidos, tales como el caldo de tioglicolato, el caldo de hígado con trozos de este órgano y otros, incubando a 55°C y realizando exámenes para detectar la producción de gas y de ácido. Tiene la misma procedencia que las bacterias del agriado plano.

c) Alteración o Putrefacción Sulfhídrica: ésta no es común en los alimentos enlatados de baja acidez. Cuando se presenta esta alteración se detecta la presencia del Clostridium nigrificans, que es un termófilo obligado y las esporas son menos resistentes al calor que las esporas de las bacterias presentes en el Agriado Plano y la alteración T. A., por lo que la presencia de este microorganismo en los alimentos enlatados indica tratamiento térmico y enfriado

deficiente o almacenamiento a temperaturas elevadas. La fuente de las esporas es similar a las ya mencionadas para las alteraciones del agriado plano y T.A., pudiendo además, proceder del estiércol (2,6,8,20,21,22).

Tratamiento Térmico Insuficiente: Esta alteración se puede detectar por la presencia del Clostridium sporogenes que es un anaerobio putrefactivo, sin embargo en esta alteración se presentan con mayor incidencia microorganismos mesófilos aerobios formadores de esporas. En casos severos de insuficiente tratamiento térmico, se han aislado butíricos anaerobios como Clostridium butyricum o C. pasteurianum, pero con mayor frecuencia especies proteolíticas y no proteolíticas del Clostridium botulinum (2,6,8,20,21,22).

Las alteraciones microbiológicas en los alimentos Acidos enlatados pueden ser catalogadas en los siguientes grupos:

Proceso Insuficiente: Una gran variedad de microorganismos ácido-tolerantes formadores de esporas pueden sobrevivir al procesamiento térmico, por la excesiva contaminación del alimento antes del proceso y/o al pretender dar un tratamiento térmico suave para preservar la textura de los alimentos.

Estos microorganismos pueden ser:

a) Butíricos anaerobios, tales como el mesófilo anaerobio

formador de esporas Clostridium pasteurianum el cual produce ácido butírico así como dióxido de carbono e hidrógeno.

b) Acidúricos, productores de agriado plano, particularmente Bacillus coagulans en productos de tomate. Estos son anaerobios facultativos y pueden crecer entre los 30-35°C y 55°C.

c) Mohos resistentes al calor, particularmente en casos de contaminación de jugos concentrados y frutas con estos hongos antes del proceso, como Byssochlamys fulva o especies similares que producen ascosporas resistentes al calor. Esta alteración se detecta por la presencia de sabor y olor fungosos, la presencia de micelios en los productos y algunas veces por un ligero abombamiento en la tapa de la lata.

d) Levaduras y/o bacterias asporogénicas. Estos microorganismos producen una alteración con características semejantes a la debida a fugas, por esta razón debe hacerse un examen minucioso de la lata en busca de defectos estructurales, así como también conocer si las condiciones de manejo de los botes después del proceso fueron satisfactorias y de esta forma poder determinar la causa precisa de esta alteración (2,6,8,21,22).

Alteración Termofílica: Puede ocurrir en alimentos ácidos, particularmente en productos alimenticios hechos con tomate. La identificación de esta alteración se puede realizar

utilizando temperaturas cruzadas de incubación de 30-35°C y 55°C, para diferenciar mesófilos de termófilos (2,6,8,21,22).

Alteración Densa: Generalmente se detectan en ésta, bacterias tolerantes al ácido, levaduras y mohos, provocando en la mayoría de los casos gas y abombamiento de las latas. La alteración de las latas que permanecen planas es ocasionada por bacilos y/o cocos que no producen gas. Por lo general, el contenido de las latas presenta un ligero desenso del pH, con o sin cambios organolépticos obvios. Por otra parte cuando la alteración es provocada por mohos se detecta la presencia de micelios y esporas fúngicas, ocasionando que en las latas suficientemente alteradas penetre el oxígeno, lo cual se demuestra por la formación de un anillo grabado dentro de la lata recién abierta (2,6,8,21,22).

La metodología para el análisis de los alimentos enlatados, consta de tres etapas:

- 1.- Recopilación e Interpretación de los antecedentes del producto: en esta etapa se reúnen las condiciones de producción, almacenamiento e incidencia de los defectos en ciertas unidades de los lotes de alimentos. Este paso es invaluable para el diagnóstico de las condiciones microbiológicas, ya que frecuentemente la causa y la naturaleza de la alteración son evidentes cuando se ha realizado una revisión de los estudios anteriores.

2.- Exámen de los Envases y su Contenido: en este paso debe tomarse en cuenta el tamaño de la muestra, sus condiciones externas, el peso, el acondicionamiento del área de trabajo, la preparación de las muestras, medida de la presión o análisis de la producción de gas, toma aséptica de la muestra, exámen físico, exámen microscópico, determinación del pH, distribución del contenido y limpieza del envase.

3.- Procedimientos Microbiológicos de Cultivo: estos son diferentes dependiendo del grado de acidez del alimento. Consiste en el aislamiento primario de los microorganismos y su subcultivo, para clasificarlos dentro de los grupos causantes de las alteraciones. La diferenciación anterior depende de las condiciones de desarrollo de los microorganismos aislados de acuerdo a su requerimiento de oxígeno y a su temperatura óptima de crecimiento (2,8,12).

Se han utilizado una gran variedad de medios de cultivo para el examen bacteriológico de los alimentos enlatados. Ha sido práctica común el empleo de medios especiales preparados a partir del alimento a examinar, pero la mayoría de los microbiólogos han observado que las condiciones nutricionales de los microorganismos productores de alteraciones alimenticias se cubren con medios de cultivo de fácil preparación, como por ejemplo:

a) Medios de Cultivo para Alimentos Acidos: medio ácido de

proteosa peptona, caldo de hígado con tomate picado, medio de suero de naranja, extracto de malta, medio dextrosa-mosto, entre otros.

b) Medios de Cultivo para Alimentos de Baja Acidez: medio de triptona-dextrosa, caldo de hígado, caldo de triptona extracto de levadura, agar extracto de levadura-tioglicolato-almidón, caldo dextrosa púrpura de bromocresol.

c) Medios de Cultivo Adicionales: estos se emplean en exámenes ordinarios para fines específicos, como agar sulfuro de hierro, medio de infusión de guisante-jamón, medio reforzado para clostridios, medio de nitrato azúcar-jamón, medio de "microjamón", medio para levaduras osmofílicas (2,8,15).

Considerando todos los datos disponibles y la eficacia de las condiciones en que modernamente se realizan las operaciones de procesado, los alimentos enlatados y conservados industrialmente, son una fuente segura para el suministro alimenticio del hombre. Los alimentos enlatados raras veces causan intoxicaciones alimenticias, a no ser que se contamine el contenido de la lata una vez abierta. Cuando las intoxicaciones alimenticias guarden relación con los alimentos enlatados debe investigarse una posible contaminación y el uso del contenido después de abierto el recipiente por un tiempo prolongado (6,8).

Las intoxicaciones alimenticias de origen bacteriano se adquieren por el consumo de alimentos contaminados con ciertos tipos de microorganismos o por consumir alimentos en los que se han desarrollado bacterias que han producido sus correspondientes toxinas. Actualmente se conocen cuatro tipos principales de bacterias causantes de toxiinfecciones alimenticias: Clostridium botulinum, cuya toxina origina la enfermedad conocida por botulismo; Clostridium perfringens, ciertas especies de Salmonella spp. y Staphylococcus spp., que producen enfermedades caracterizadas por disturbios gastrointestinales agudos. Además de éstos, como agentes responsables de toxiinfecciones alimenticias se han señalado otros microorganismos: hoy se sabe que algunas cepas de Streptococcus faecalis pueden originar intoxicaciones en el hombre, mientras que otros investigadores consideran que el papel del Bacillus cereus y otras bacterias no es todavía concluyente a este respecto (6,8,12).

Debido a la importancia que tienen los alimentos enlatados en la dieta del hombre y tomando en cuenta las consecuencias que podrían ocasionar si son indebidamente tratados, se ha querido enfocar este estudio hacia el aislamiento de microorganismos que pudieran alterar a estos alimentos.

En este trabajo se seleccionó Atún Enlatado, alimento de

Baja Acidez que generalmente se consume en forma directa y sin proporcionarle ningún tratamiento adicional que pudiera destruir la posible presencia de microorganismos y toxinas nocivos para el hombre.

## M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

Para la realización de este trabajo, se seleccionó Atún Enlatado y se analizaron un total de 60 muestras, las cuales fueron recolectadas en el transcurso de los meses de Enero a Abril de 1983.

Las muestras se obtuvieron al azar en diferentes expendios del área metropolitana de la ciudad de Monterrey y fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Monterrey.

Para llevar a cabo el análisis del producto enlatado, se realizaron las siguientes pruebas: Examen Preliminar de la Muestra, Aislamiento Primario de Microorganismos y Pruebas Microbiológicas Primarias de Identificación.

#### I. EXAMEN PRELIMINAR DE LA MUESTRA

En este examen se evalúan las condiciones externas de la lata antes del análisis microbiológico y se miden las dimensiones externas de los sentidos utilizando un micrómetro.

#### II. AISLAMIENTO PRIMARIO DE MICROORGANISMOS.

a) Incubación Preliminar de las Muestras: la incubación se realiza durante una semana a 37°C.

b) Toma de la Muestra: se retira la etiqueta de la lata.

La zona que se va a perforar se sumerge en una solución alcohólica al 70% durante diez minutos; el exceso se elimina con algodón y se seca completamente flameando la lata. Se mide el vacío interno de la lata con un manómetro y se abre haciendo un corte circular. Se toma aproximadamente un gramo de la muestra, correspondiente al centro y la periferia del contenido y se introduce a un frasco que contiene 50 ml de solución Ringer y perlas de vidrio estériles, se agita vigorosamente y se deja reposar por 10 ó 15 minutos.

c) Inoculación de los Medios de Cultivo: se inoculan 2 tu-

bos con Caldo de Hígado y Caldo Dextrosa Púrpura de Bromocresol con 1 ml de la solución Ringer. Una vez inoculado el Caldo de Hígado, se estratifica con Aceite Mineral. Ambos medios se incuban a 37°C por 72 horas y a 55°C por 48 horas (Tabla No. 1).

- d) Subcultivos: los cultivos obtenidos en Caldo de Hígado y Caldo Dextrosa Púrpura de Bromocresol, incubados a 55°C, se subcultivan, tomando una o dos asadas y se siembra por estrías en placa de Agar Eosina Azul de Metileno y de Agar Sangre y se incuban por 48 horas a 55°C; y los cultivos obtenidos en los caldos antes mencionados, pero incubados a 37°C, se subcultivan en placas de Agar Eosina Azul de Metileno, de Agar Sangre y de Agar para Estafilococos No. 110 y se incuban a 37°C por 48 horas (Tabla no. 2).

En caso de obtener cultivos mixtos en las placas de agar, se procede a obtener cultivos puros, para lo cual es necesario inocular cada colonia diferente en Caldo de Tripticaseína y Soya, incubar a 37°C por 24 horas y sembrar por estrías en placas de agar en el que originalmente creció el microorganismo aislado.

### III. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS PRIMARIAS

A los cultivos puros obtenidos en placas de agar, se les realiza las siguientes pruebas:

- a) Agar para Estafilococos No. 110: prueba de la coagulasa y reacción al Gram.
- b) Agar Eosina Azul de Metileno: prueba de la catalasa, reacción al Gram, motilidad y vía de utilización de Carbohidratos.
- c) Agar Sangre: prueba de la oxidasa, reacción al Gram, motilidad y vía de utilización de Carbohidratos.

Los resultados se comparan con la tabla descrita por Cowan y Steel (3).

TABLA No 1: Inoculación de los Medios de Cultivo

MEDIO DE CULTIVO	TUBO	INCUBACION	TIEMPO	INVESTIGACION
Caldo Dextrosa Púrpura de Bromocresol	1	37°C	72 hr	Mesófilo Aerobio
	1	55°C	48 hr	Termófilo Aerobio
Caldo de Hígado	1	37°C	72 hr	Mesófilo Anaerobio
	1	55°C	48 hr	Termófilo Anaerobio

TABLA No. 2: Subcultivos

MEDIO DE CULTIVO	CAJA	INCUBACION	TIEMPO	INVESTIGACION
Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)	1	37°C	48 hr	Morfología, Catalasa, Rxn. al Gram, motilidad y OF
	1	55°C		
Agar Sangre	1	37°C	48 hr	Morfología, Oxidasa, Rxn. al Gram, motilidad y OF
	1	55°C		
Agar para Estafilococos No. 110	1	37°C	48 hr	<u>Staphylococcus</u> spp., Rxn. al Gram y Coagulasa

## REACTIVOS

### (R-1) Solución Ringer:

NaCl.....	8.50 g
KCl.....	0.20 g
NaCO <sub>3</sub> .....	2.20 g
Agua destilada.....	1.00 L

Se disuelven las sales en el agua y se esteriliza a 121°C por 15 minutos.

### (R-2) Caldo Dextrosa Púrpura de Bromocresol:

Dextrosa.....	10.00 g
Extracto de Carne.....	3.00 g
Peptona.....	5.00 g
Bromocresol Púrpura.....	2.00 ml

al 0.6% en alcohol

Agua destilada.....	1.00 L
---------------------	--------

Disolver los ingredientes por calentamiento, envasar tubos y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

El pH del medio se ajusta a 7.0 ± 0.1.

### (R-3) Caldo de Hígado:

Hígado de Res picado.....	500.00 g
Agua destilada.....	1.00 L

Hervir durante una hora. Ajustar la reacción de la

mezcla a pH 7.0 y hervir durante otros diez minutos.  
Filtrar con gasa o papel filtro y aforar a un litro.

Añadir:

Peptona.....	10.00 g
Fosfato de Potasio Dibásico.....	1.00 g
(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	
Cloruro de Sodio.....	15.00 g

Ajustar a pH 7.0. Se colocan trozos de 1.25 a 2.5 cm de hígado en el fondo de cada tubo y se agregan 5 ml del caldo. Se esteriliza a 121°C por 15 minutos; antes de la inoculación debe hervirse el medio para eliminar el aire disuelto.

## R E S U L T A D O S

Se analizaron un total de 60 latas de atún de diferentes marcas, presentando contaminación el 76.29% (46), debido a la presencia de microorganismos mesófilos en 45 muestras y microorganismos termófilos en sólo 3.

La distribución de las muestras en base al número de géneros aislados se encuentra en la tabla 3, observándose que un 30.00% (18) de las latas presentaron contaminación causada por la presencia de 2 géneros y un 1.67% (1) un máxi-

mo de 7. La frecuencia de muestras contaminadas en relación a los microorganismos identificados, se muestra en la tabla 4, dominando entre ellos los géneros: Micrococcus spp., Staphylococcus spp. y Bacillus spp.

Se examinaron las dimensiones externas de los sentidos de la lata, calculándose el grado de compacidad, con lo cual se encontró que un 65.00% (39) de las muestras presentó cierre peligroso, del cual, el 45.00% (27) lo mostró en la tapa o en la base y el 20.00% (12) en ambos; y solamente en un 35.00% (21) de las muestras se encontró cierre bueno.

Se relacionó el grado de compacidad del cierre con la frecuencia de latas contaminadas por microorganismos y se estableció que un 60.00% (36) de las muestras presentó contaminación y la calidad del cierre peligroso (tabla 5).

En el análisis de la presión interna de las muestras se encontró que un 18.34% (11) estaba dentro de los límites óptimos de vacío, un 58.33% (35) tenían un vacío sospechoso y un 23.33% (14) vacío peligroso.

Asimismo, se confrontaron el vacío interno de las muestras y el grado de compacidad, encontrando que 35.00% (21) de las muestras presentaron vacío sospechoso y cierre peligroso.

so (tabla 6). Por otra parte se determinó que un 40.00% (24) de las muestras presentaron contaminación y vacío sospechoso (tabla 7).

Se comparó el vacío interno, grado de compacidad y la condición microbiológica de las muestras, para establecer una correlación entre estas variables y se observó que un 30.00% (18) de la muestra total presentó vacío sospechoso, cierre defectuoso y contaminación (tabla 8).

TABLA 3

Distribución de las muestras analizadas con relación al número de géneros aislados.

Número de muestras	Número de géneros por muestra	Frecuencia porcentual
14	0	23.33
12	1	20.00
18	2	30.00
7	3	11.66
6	4	10.00
1	5	1.67
1	6	1.67
1	7	1.67
TOTAL: 60		100.00

TABLA 4

Frecuencia de muestras contaminadas en  
relación al microorganismo aislado

Microorganismo	Número de muestras	Frecuencia * porcentual
<u>Micrococcus</u> spp.	27	45.00
<u>Staphylocoecus</u> spp.	25	41.67
<u>Bacillus</u> spp.	15	25.00
<u>Pediococcus</u> spp.	7	11.67
<u>Enterobacterias</u>	6	10.00
<u>Listeria</u> spp.	6	10.00
<u>Branhamella</u> spp.	5	8.33
<u>Aerococcus</u> spp.	4	6.67
<u>Alcaligenes</u> spp.	4	6.67
<u>Acinetobacter</u> spp.	3	5.00
<u>Corynebacterium</u> spp.	3	5.00
<u>Leuconostoc</u> spp.	3	5.00
<u>Streptococcus</u> spp.	2	3.33
<u>Pseudomonas</u> spp.	1	1.67

\* En relación al total de muestras.

TABLA 5

Relación del grado de compacidad con la condición microbiológica del total de muestras.

Relación*	Número de muestras	Frecuencia porcentual
1	10	16.67
2	4	6.66
3	10	16.67
4	36	60.00
TOTAL	60	100.00

\* Relación:

- 1 Latas no contaminadas con cierre bueno.
- 2 Latas no contaminadas con cierre peligroso.
- 3 Latas contaminadas con cierre bueno
- 4 Latas contaminadas con cierre peligroso.

TABLA 6

Relación de la presión interna  
con el grado de compacidad

Relación*	Número de muestra	Frecuencia <sup>a</sup> Porcentual
1	2	3.33
2	8	13.33
3	15	25.00
4	21	35.00
5	4	6.67
6	10	16.67
TOTAL	60	100.00

\* Relación:

- 1 Latas con cierre bueno y vacío óptimo
- 2 Latas con cierre peligroso y vacío óptimo
- 3 Latas con cierre bueno y vacío sospechoso.
- 4 Latas con cierre peligroso y vacío sospechoso.
- 5 Latas con cierre bueno y vacío peligroso
- 6 Latas con cierre y vacío peligroso.

a Con relación al total de muestras.

TABLA 7

Relación de la presión interna con la condición microbiológica del total de muestras.

Relación*	Número de muestras	Frecuencia Porcentual
1	1	1.67
2	10	16.67
3	11	18.33
4	24	40.00
5	2	3.33
6	12	20.00
TOTAL	60	100.00

\* Relación:

- 1 Latas con vacío óptimo no contaminadas.
- 2 Latas con vacío óptimo contaminadas.
- 3 Latas con vacío sospechoso no contaminadas.
- 4 Latas con vacío sospechoso contaminadas.
- 5 Latas con vacío peligroso no contaminadas.
- 6 Latas con vacío peligroso contaminadas.

TABLA 8

Relación del grado de compacidad con la presión interna  
y la condición microbiológica del total de muestras

Relación*	Muestras	
	Contaminadas	No Contaminadas
A	2(03.33) <sup>a</sup>	0(00.00)
B	8(13.33)	1(01.67)
C	6(10.00)	8(13.33)
D	18(30.00)	3(05.00)
E	2(03.33)	2(03.33)
F	10(16.67)	0(00.00)

\* Relación:

- A Lata con cierre bueno y vacío óptimo.
- B Lata con cierre peligroso y vacío óptimo.
- C Lata con cierre bueno y vacío sospechoso.
- D Lata con cierre peligroso y vacío sospechoso.
- E Lata con cierre bueno y vacío peligroso.
- F Lata con cierre y vacío peligroso.

<sup>a</sup> Frecuencia porcentual del número de muestras.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

En la actualidad los productos enlatados han adquirido gran importancia, a tal grado que han llegado a modificar los hábitos alimenticios del hombre. Por tal motivo se analizó atún enlatado para determinar su contenido microbiano y así poder establecer si es una fuente importante de toxiinfecciones alimenticias para el hombre.

Para el aislamiento primario de los microorganismos presentes en el producto se seleccionó el método propuesto por

Hersom (8), el cual constituye el paso inicial para poder llegar a la identificación de los microorganismos.

En los resultados obtenidos del aislamiento primario se observó que en 46 muestras (76.29%) hubo contaminación, de las cuales en 45 fue debida a la presencia de microorganismos mesófilos, en 2 a mesófilos y termófilos y en sólo una a termófilos.

El estándar bacteriológico mínimo establece que en todos los alimentos enlatados de baja acidez, excepto en algunos productos como la carne curada o ahumada y la leche evaporada, deben estar ausentes esporas de Clostridium botulinum y microorganismos poco resistentes al calor como cocos y bacilos no esporulados. De acuerdo con esto, la presencia de tales microorganismos es considerada como posible evidencia de un tratamiento térmico deficiente, de una contaminación posterior debida a fugas o de un tiempo prolongado y una temperatura elevada de almacenamiento (8), lo que lleva a deducir que la mayoría de las muestras analizadas pudieron ser contaminadas en cualquiera de estas etapas.

En relación al tipo de microorganismos aislados se encontró la presencia de 14 géneros, entre los cuales predominaron Micrococcus spp., Staphylococcus spp. y Bacillus spp. en un

45.00%, 41.67% y un 25.00% respectivamente; seguidos por Pediococcus spp., Enterobacterias, Listeria spp., Branhamella spp., Aerococcus spp. y Alcaligenes spp. con un rango de frecuencia entre 6.67% y 11.67%; encontrándose en menor frecuencia Acinetobacter spp., Corynebacterium spp., Leuconostoc spp., Streptococcus spp. y Pseudomonas spp. entre el 1.67% y 5.00%.

Para poder llegar a establecer una relación entre el tipo de microorganismo presente en el producto analizado y los factores que influyen en su contaminación, es necesario tomar en cuenta, además de otros, los que corresponden a las características propias del atún, el cual es un alimento de baja acidez, de consistencia sólida y elaborado con aceite para impartirle sabor. Estos factores influyen de diferente manera en la termorresistencia de los microorganismo, por ejemplo: la baja acidez del medio la aumenta, su estado físico impide que durante el tratamiento térmico, el calor se distribuya homogéneamente, lo que trae como consecuencia la protección de los microorganismos presentes y el aceite que debido a sus propiedades fisicoquímicas, ejerce un aumento en la resistencia al calor de los microorganismos presentes principalmente en los esporulados (8).

Los resultados obtenidos concuerdan con lo expuesto ante-

riormente y es probable que los microorganismos que se aislaron con mayor frecuencia como Micrococcus spp, Bacillus spp. y Streptococcus spp., entre otros, haya sido consecuencia de ésto. No siendo el caso para los géneros Branhamella spp., Listeria spp., Corynebacterium spp., Pseudomonas spp., Alcaligenes spp. y Enterobacterias, los cuales pueden contaminar al alimento durante el enfriado, manipulación o almacenamiento de las latas.

Tomando en cuenta que la condición microbiana de los alimentos enlatados está íntimamente realcionada con la eficiencia e higiene con que se realizó el proceso, se consideró de gran utilidad evaluar el estado físico de la lata para llegar a determinar una posible relación entre el contenido microbiano y su origen.

"El estudio de las características mecánicas de los envases juega un papel tan importante en los resultados, que el examen de los insertados debe considerarse como una parte fundamental de la investigación bacteriológica de los alimentos enlatados. El estado bacteriológico del contenido puede determinarse por pruebas de cultivo, microscópicas y otros ensayos, pero ninguno de ellos indica si los botes presentarán fugas o, si ya ha tenido lugar la alteración, si ésta se debió a defectos tales como insertados que no se ajustan a las

normas establecidas, al uso de agua muy contaminada o a unos insertados dañados o deformados"(8).

Del examen de las dimensiones externas de los sertidos se encontró que un 65.00% (39) de las muestras presentó cierre peligroso y un 35.00% (21) cierre bueno.

Coincidiendo con los reportes de la bibliografía, se encontró que un 60.00% (39) de las latas con cierre defectuoso mostró contaminación, un 16.67% (10) con cierre bueno no estaban contaminadas y un 6.66% (4) con cierre peligroso no presentó contaminación. Demostrando que generalmente la presencia de fugas en la lata trae como consecuencia la contaminación del producto durante la fase de enfriamiento o almacenamiento.

Sin embargo, se encontró que un 16.67% (10) de las muestras con cierre bueno presentaron contaminación microbiológica, lo que demuestra una posible deficiencia en el tratamiento térmico o durante el almacenamiento.

Una de las alteraciones físicas que se presenta con mayor frecuencia en los productos enlatados, es el vacío insuficiente, el cual es provocado por una evacuación deficiente, ocasionando que la lata sufra deformaciones físicas, y de

esta manera la formación de fugas, las cuales son indeseables por la alta probabilidad que ofrecen a que el alimento se contamine después del tratamiento térmico. Por otra parte al no haber vacío en las latas es posible la presencia de oxígeno en el interior de éstas, lo que ofrece una condición óptima para que proliferen los posibles microorganismos presentes (8).

Por tal motivo se confrontaron el vacío y el grado de compacidad de las muestras, encontrando que un 35.00% (21) tenían cierre peligroso y vacío sospechoso, un 16.67% (10) cierre y vacío peligroso y sólo un 3.33% (2) cierre bueno y vacío óptimo, lo que nos lleva a deducir que los resultados concuerdan con lo anteriormente dicho en lo referente a que un vacío insuficiente origina, en la mayoría de los casos, la presencia de fugas. Igualmente se observó que un 25.00% (15) de la muestra presentó cierre bueno y vacío sospechoso y un 6.67% (4) cierre bueno y vacío peligroso, lo que puede indicar alguna deficiencia durante la evacuación.

Cabe resaltar que un 13.33% (8) de las latas mostraron cierre peligroso y vacío óptimo. La respuesta a esto es que en ocasiones el cierre aunque no cumpla con las normas establecidas, no presenta fugas.

Por otra parte los resultados obtenidos de la relación entre la presión interna y el contenido microbiológico de las muestras coinciden con lo expuesto, debido a que un 20.00%

(12) de la muestra presentó vacío peligroso y contaminación y un 40.00% (24) vacío sospechoso y contaminación. Sin embargo, un 16.67% (10) mostró vacío óptimo y contaminación, lo cual es indicativo de un tratamiento térmico deficiente o de un almacenamiento inadecuado.

De acuerdo a lo antes mencionado, se puede observar que existe una relación entre las condiciones microbianas de las muestras, el grado de compacidad y la presión interna de la lata, aunque cabe la posibilidad de que ésta sea una consecuencia de otros factores.

En base a los resultados que se obtuvieron en este estudio, se concluye lo siguiente:

- 1.- La frecuencia de muestras contaminadas puede ser mayor debido a que en este trabajo no se realizó la identificación de microorganismos anaerobios estrictos.
- 2.- Existe una correlación directa entre el índice de contaminación observado en las muestras y los factores involucrados con la naturaleza del producto procesado.
- 3.- La temperatura y el tiempo de almacenamiento deben ser cuidadosamente controlados debido a que los microorganismos termorresistentes están presentes aún cuando el proceso de enlatado se haya realizado exitosamente.
- 4.- Debido a que el número de muestras analizadas fue pequeño,

de diferente marca y se desconocía el lote de procedencia, no es posible establecer si el atún es una fuente importante de toxiinfecciones alimenticias para el hombre.

Para la realización de estudios posteriores, se recomienda medir el pH del producto, así como la observación al microscopio, determinar el número de microorganismos por gramo de producto, aislar e identificar los gérmenes anaerobios estrictos y de esta forma obtener resultados que lleven a una conclusión más completa.

## R E S U M E N

Se analizaron 60 muestras de Atún Enlatado, adquiridas al azar en diferentes expendios del área metropolitana de la ciudad de Monterrey para determinar la presencia de microorganismos, utilizando para su aislamiento Caldo de Hígado y Caldo Dextrosa Púrpura de Bromocresol. A cada uno de los microorganismos aislados se les realizaron pruebas Microbiológicas Primarias para su identificación.

Del total de muestras analizadas, 46 presentaron micoorganismos, en su mayoría mesófilos, es decir el 76.67%.

De los microorganismos aislados, los géneros que se presentaron con mayor frecuencia fueron: Micrococcus spp., Staphylococcus spp. y Bacillus spp.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Canada, C.J., J.M. Dryer, and D.T. Maunder. 1976.  
Canned Foods-Tests for Commercial Sterility. In  
"Compendium of Methods for the Microbiological Exa-  
mination of Foods," ed. M.L. Speck, p. 620. Am Pu-  
blic Health Assn., Washington, D.C.
  
- 2.- Cortell, D.A. Jr. 1976. Canned Foods-Tests for Cause  
of Spoilage. In "Compendium of Methods for the Mi-  
crobiological Examination of Foods," ed M.L. Speack  
p. 632. Am. Public Health Assn., Washington, D.C.

- 3.- Cowan, S.T. y K.J. Steel. 1979. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. 2a. ed. C.E.C.S.A, México.
- 4.- Desrosier, N.W. 1980. Conservación de Alimentos. 2a. ed. C.E.C.S.A, México.
- 5.- Durán, L. y J. Morell. s.a. El cierre de los envases de hojalata, características, defectos y métodos de análisis. Asociación de Investigadores de Conservas Alimenticias e Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, México.
- 6.- Frazier, W.C. 1976. Microbiología de los Alimentos. 2a. ed. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- 7.- Heiss, R. 1977. Principios de Envasado de los Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- 8.- Herson, A.C. y E.D. Hulland. 1974. Conservas Alimenticias. 2a. ed. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- 9.- Ito, K.A. and M.L. Seeger. 1980. Effects of Germicides on Microorganisms in Can Cooling Waters. J. Food Protec. 43: 484-487.

10. Johnston, M.R. and R.H. Dougherty. 1978. Thermal processing of canned foods: introductory remarks. Food Technol. 32: 55,62.
11. Joslyn, M.A. and J.L. Heid. 1874. Food Processing Operations. 3rd. ed. The Avi Publishing Company Inc., Westport, Conn.
12. Kramer, A. and B.A. Twigg. 1970. Quality Control for the Food Industry. 1. 3rd. ed. The Avi Publishing Company Inc., Westport, Conn.
13. Miller, B.M. and W. Listsky. 1976. Industrial Microbiology. McGraw-Hill Book Company, U.S.A.
14. Mulvaney, T.R., R.M. Schaffner, R.A. Miller, and M.R. Johnston. 1978. Regulatory review of scheduled thermal processes. Food Technol. 32: 73-75.
15. National Canners Association Research Laboratories. 1968. Laboratory Manual for Food Canners and Processors. 1. 3rd. ed. The Avi Publishing Company Inc., Westport, Conn.
16. National Canners Association Research Laboratories. 1968.

Laboratory Manual for Food Canners and Processors.  
2. 3rd. ed. The Avi Publishing Company Inc., West-  
port, Conn.

17. Payne, J.W. y D.R. Brown. 1974. Microbiología. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
18. Pelczar, M.J. y R.D. Reid. 1977. Microbiología. McGraw-Hill de México, S.A. de C.V., México.
19. Pflug, I.J. and T.E. Odlaug. 1978. A review of z and F values used to ensure the safety of low-acid canned food. Food Technol. 32: 63-70.
20. Put, H.C., H.J. Witvoet, and W.R. Warner. 1980. Mechanism of Microbiological Leaker Spoilage of Canned Foods: Biophysical Aspects. J. Food Protec. 43: 488-497.
21. Segner, W.P. 1978. Mesophilic aerobic sporeforming bacteria in the spoilage of low-acid canned foods. Food Technol. 32: 55-59,80.
22. Weiser, H.H., G.J. Mountney, and W.A. Gould. 1971. Practical Food Microbiology and Thechology. The Avi Pu-

blishing Company Inc., Westport, Conn.

23. Yawger, E.S. 1978. Bacteriological Evaluation for thermal process design. Food Technol. 32: 59-62.