

TRABAJO FIN DE MÁSTER



Estudio microbiológico de conservas vegetales y condiciones
óptimas del proceso de appertización

Máster universitario en Tecnología e Industria Alimentaria

Autor:

Antonio Moncayo López

Tutores académicos:

Purificación Calvo Ruiz y María de la Montaña Durán Barrantes

Autorización del tutor

Agradecimientos:

Agradezco a Doña Purificación Calvo Ruiz y Doña María de la Montaña Durán Barrantes, por haberme orientado y guiado con el presente trabajo, mediante su aporte de información y conocimiento.

A su vez, quisiera agradece a Eugenio por haber contribuido a la realización del TFM mediante su ayuda con los métodos de trabajo empleado

Título:

Estudio microbiológico de conservas vegetales y condiciones óptimas del proceso de appertización.

Autor:

Antonio Moncayo López

Tutores académicos:

Purificación Calvo Ruiz y María de la Montaña Durán Barrantes

Resumen:

Las conservas vegetales se definen como los productos obtenidos a partir de alimentos perecederos de origen vegetal, con o sin adición de otras sustancias autorizadas, contenidos en envases apropiados, herméticamente cerrados tratados exclusivamente por el calor, en forma que asegure su conservación. El tratamiento térmico empleado consiste en la appertización que tiene como objetivo eliminar los microorganismos que puedan contener nuestro producto, permitiendo una estabilidad biológica del producto a largo plazo.

En este trabajo, se estudiaron los tipos de microorganismos presentes en la superficie del pimiento, antes y durante las diferentes etapas de elaboración de la conserva, utilizando diferentes medios de cultivo, tanto selectivos como diferenciales y pruebas bioquímicas para la identificación de algunos de estos microorganismos.

De este modo, las pruebas utilizadas para la identificación de microorganismos han demostrado la presencia de una gran diversidad de microorganismos presentes en la superficie del pimiento, habiendo detectados neutrófilos y acidófilos, bacterias grampositivas y gramnegativas, así como coliformes y enterococos fecales. Mediante estas pruebas han sido posible la identificación de 2 especies de bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia rubidaea*.

El estudio microbiológico llevado a cabo en las etapas de escaldado, appertización y envasado demostraron la eficacia del tratamiento, siendo la etapa de escaldado suficiente para eliminar toda la carga microbiana presente en el pimiento. No obstante, fue necesario el proceso de appertización para asegurar la destrucción total de microorganismos.

En relación a la optimización de la temperatura y tiempo se consiguió disminuir toda la carga microbiana durante la appertización a 100°C y a 95°C durante 5, 10, 20 y 50 minutos, demostrando que tal proceso es esencial para el posterior consumo de la conserva para evitar peligros y riesgos de la manipulación de los alimentos.

Por otra parte, los estudios sobre la estabilidad microbiológica de la conserva una vez abierta, nos indican que ésta se puede consumir en unos 4 días manteniéndola a 4°C, pasado este tiempo, hay crecimiento de microorganismos por lo que no se aconseja su consumo.

Finalmente, se determinó que el método utilizado para la elaboración de la conserva es suficientemente efectivo como para ser empleado de forma tradicional en el hogar, pudiéndose consumir hasta varios días después de la apertura como cualquier conserva realizada a nivel industrial.

Palabras claves:

Appertización, conserva, placa de Petri, pimiento, medios selectivos y diferenciales, pruebas bioquímicas, MacConkey, tinción de Gram, TSI, VPRM y API 20E.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Características botánicas del pimiento rojo.....	2
1.1.1 Clasificación	2
1.1.2 Origen	3
1.1.3 Usos	3
1.2 Características nutricionales del pimiento rojo.....	4
1.3 Microbiología de los alimentos	7
1.3.1 Descomposición de los alimentos	8
1.3.2 Principales microorganismos en los alimentos	9
1.3.3 Indicadores de la calidad microbiológica	12
1.3.4 Características generales de las bacterias.....	13
1.3.5 ¿Qué necesitan las bacterias para crecer?	15
1.3.6 Curva de crecimiento bacteriano	16
1.4 Tecnología de las conservas	18
1.4.1 Secuencia operativa típica para la appertización de conservas.....	20
1.4.2 Envase	22
1.5 Legislación para conservas vegetales	23
1.6 Objetivos.....	26
2. MATERIAL Y MÉTODOS	28
2.1 Elaboración de una conserva vegetal de pimiento rojo al natural	28
2.1.1 Balances de materia	33
2.2 Análisis Microbiológico para la elaboración de conservas de pimientos	35
2.2.1 Composición de los medios de cultivo	36
2.2.2 Estudio para la identificación de micoorganismos presentes en la superficie del pimiento.....	38
2.2.2.1 Aislamiento de microorganismos en agar nutritivo	38
2.2.2.2 Tinción de Gram	40
2.2.2.3 Pruebas para la Identificación de bacterias coliformes y enterococos.	41
2.2.2.4 Medios selectivos y diferenciales para la identificación de micoorganismos: MacConkey y TSI.	44
2.2.2.5 Pruebas bioquímicas para la identificación de micoorganismos: VPRM y API 20E	45
2.2.3 Estudio microbiológico durante las etapas de elaboración de la conserva del pimiento: cortado, escaldado y envasado.....	50
2.3 Estudio de la estabilidad microbiológica en la conserva de pimiento una vez abierta.	51

3. RESULTADOS y DISCUSIÓN	54
3.1 Elaboración de una conserva de pimiento en su jugo.....	54
3.2 Estudio microbiológico.....	58
3.2.1 Identificación de microorganismos presentes en la superficie del pimiento ..	58
3.2.2 Estudio microbiológico llevado a cabo en las etapas de elaboración de la conserva del pimiento: cortado, escaldado y envasado	80
3.2.3 Estudio de estabilidad microbiológica de la conserva una vez abierta	82
4. CONCLUSIONES	90
5. BIBLIOGRAFÍA	92

Glosario de abreviaturas:

- BEDCA: Base de Datos Española de Composición de Alimentos
- BOE: Boletín Oficial del Estado
- Agar TSI: Triple Sugar Iron
- VPRM: Voges Proskawer-r

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace miles de años, los hombres se han enfrentado con la necesidad de conservar los alimentos. Generalmente, éstos se descomponen con rapidez, se ponen agrios y toman un sabor desagradable. Para preservarlos por largos períodos de tiempo y evitar que la población pasara hambre durante los largos meses de invierno, se introdujo la costumbre de secarlos, salarlos y ahumarlos.

El militar francés Napoleón Bonaparte se dio cuenta de lo importante que era alimentar de forma adecuada a los hombres de su ejército, de forma que ofreció un premio de 12.000 francos para aquel que inventara alguna forma de mantener los alimentos frescos durante un período de tiempo prolongado [11].

En 1795, el inventor francés Nicolás François Appert, se puso a trabajar para resolver el problema. Él sabía que el biólogo italiano Lazzaro Spallanzani había demostrado que la carne no se descomponía si se la hervía durante un rato y se conservaba herméticamente cerrada. Appert ideó entonces un sistema para aplicar ese principio a gran escala, calentando carnes y verduras y guardándolas después herméticamente en recipientes metálicos o de vidrio. Su sistema representó el comienzo de la industria de conservas.

Appert describió la appertización como un nuevo método de mantener los alimentos. Desde entonces, las conservas han adquirido una importancia tal que ahora nos sería difícil imaginar la vida sin ellas.

Actualmente, el Código Alimentario Español define a las **conservas** como productos obtenidos a partir de alimentos perecederos de origen animal o vegetal, con o sin adición de otras sustancias autorizadas, contenidos en envases apropiados, herméticamente cerrados tratados exclusivamente por el calor, en forma que asegure su conservación [22].

Hay que tener en cuenta que a pesar de las precauciones que se toman, los alimentos pueden contaminarse, aunque se encuentren en latas selladas.

Aunque las conservas comenzaron a utilizarse desde principios del siglo XIX, no fue hasta 1864 cuando Pasteur descubrió la relación entre los microorganismos y la putrefacción de los alimentos. Hasta la segunda década del siglo XX no se conocieron las características del *Clostridium botulinum*, el microorganismo más peligroso desde el punto de vista de los alimentos en conserva [18], ni se estableció la relación entre el pH de los alimentos y la resistencia al calor de los mismos.

1.1 Características botánicas del pimiento rojo

El pimiento rojo presenta una serie de características que las diferencias del resto de las otras hortalizas que trataremos de comentar a continuación.

1.1.1 Clasificación

El pimiento rojo, hortaliza empleada en el presente estudio, es denominada mediante el nombre científico *Capsicum frutescens*. Aunque actualmente, la especie y todos sus taxones infraespecíficos son considerados meros sinónimos de *Capsicum annuum* o *Capsicum baccatum*. En el presente proyecto debe ser considerado como una descripción de las características y propiedades de dichas especies.

Es una planta dicotiledónea, herbácea, considerada perenne de vida corta pero cultivada como anual. Bajo el género *Capsicum* se encuentran diferentes especies que se conocen por el nombre común en español de pimiento, ají o chile.

El pimiento pertenece a la familia botánica Solanaceae, a la cual también pertenecen otras plantas cultivadas como el tomate, la berenjena, la papa, el tomatillo, el tabaco y la petunia [7].

1.1.2 Origen

Se considera a México como su centro de domesticación, allí se han encontrado semillas en restos arqueológicos de 6500 a 5000 años AC y es donde hoy día se encuentra la mayor diversidad de la especie. Para la época en que llegaron los españoles a México, los aztecas ya habían desarrollado docenas de variedades de pimiento. Cristóbal Colón llevó semillas a Europa, desde donde se diseminó el pimiento al Mediano Oriente, África y Asia. Posteriormente se introdujo a lugares más al norte en Norte América donde antes no se conocía.

Aparentemente recibió el nombre común de 'pimiento' en español y "pepper" en inglés al ser confundido inicialmente con la pimienta (*Piper nigrum*), debido al sabor picante presente en muchas de sus frutas.

1.1.3 Usos

La fruta del pimiento se consume mayormente madura, ya sea en su etapa de verde o cuando ha desarrollado su color característico al madurar. Los pimientos 'dulces' de la especie *C. annuum* tienen un sabor considerado no picante. Sus usos son los siguientes:

1. Se pueden comer crudos en ensalada o cocidos de varias formas (por ejemplo, al horno, asados, fritos o salteados), frecuentemente rellenos con carne u otros productos alimenticios.
2. Pueden ser preservados en encurtido o enlatados.
3. Se usan también como parte de los ingredientes en sopas, guisos, salsas y en la preparación de sofrito.
4. La fruta completamente madura se puede secar y moler para utilizar este polvo como colorante vegetal y condimento. Tanto a la fruta como a las hojas se le atribuyen propiedades medicinales.
5. En cuanto a su valor nutritivo, sus frutas son una buena fuente de vitamina C (ácido ascórbico) y una de las mejores fuentes de vitamina A, especialmente las frutas maduras.
6. Es relevante mencionar la importancia del uso de la capsaicina (la principal sustancia alcaloide que le da el carácter picante a los pimientos). Este alcaloide, además de su importancia en el uso del pimiento como especia, se usa como ingrediente activo en algunos medicamentos para aliviar el dolor de artritis y el dolor postoperatorio en amputaciones, entre otros usos medicinales. La capsaicina también es un ingrediente activo en el 'pepper spray' utilizado para defensa personal y por organizaciones del orden público como la policía.

1.2 Características nutricionales del pimiento rojo

El pimiento rojo presenta las siguientes características nutricionales que la diferencia de otras especies de hortalizas y le dan su característico sabor y olor (Tabla 1 y Figura 1). Todos estos datos fueron obtenidos de la Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA) [20].

Pimiento rojo

English name: Red pepper, raw

Nombre científico: *Capsicum annuum*

Parte comestible (%): 83



Figura 1. Distribución de la energía total en pimiento rojo

Tabla 1. Información de composición (por 100 gramos de combustible)

<u>Componentes</u>	Valor	Unidad
alcohol (etanol)	0	g
energía, total	121	kJ (kcal)
grasa, total (lípidos totales)	0.6	g
proteína, total	1.3	g
agua (humedad)	92.2	g
<u>Hidratos de Carbono</u>		
fibra, dietetica total	1.8	g
Carbohidratos	4.5	g
<u>Grasas</u>		
ácido graso 22:6 n-3 (ácido docosahexaenóico)	-	-
ácidos grasos, monoinsaturados totales	0.04	g
ácidos grasos, poliinsaturados totales	0.26	g
ácidos grasos saturados totales	0.14	g
ácido graso 12:0 (láurico)	-	-
ácido graso 14:0 (ácido mirístico)	-	-
ácido graso 16:0 (ácido palmítico)	-	-

ácido graso 18:0 (ácido esteárico)	-	-
ácido graso 18:1 n-9 cis (ácido oléico)	-	-
Colesterol	0	mg
ácido graso 18:2	-	-
ácido graso 18:3	-	-
ácido graso 20:4 n-6 (ácido araquidónico)	-	-
ácido graso 20:5 (ácido eicosapentaenóico)	-	-
<u>Vitaminas</u>		
Vitamina A equivalentes de retinol de actividades de retinos y carotenoides	90	ug
Vitamina D	0	ug
Vitamina E equivalentes de alfa tocoferol de actividades de vitámeros E	0.86	mg
folato, total	23	ug
equivalentes de niacina, totales	0.1	mg
Riboflavina	0.01	mg
Tiamina	0.04	mg
Vitamina B-12	0	ug
Vitamina B-6, Total	0.3	mg
Vitamina C (ácido ascórbico)	152	mg
<u>Minerales</u>		
Calcio	9	mg
hierro, total	0.4	mg
Potasio	155	mg
Magnesio	8	mg
Sodio	6	mg
Fósforo	15	mg
Ioduro	0.78	ug
selenio, total	0.1	ug
zinc (cinc)	0.1	mg

1.3 Microbiología de los alimentos

Los alimentos tienen que recorrer un camino más o menos largo desde que se producen hasta que llegan a nosotros, los consumidores. Durante este trayecto están expuestos a múltiples agentes que pueden alterarlos en mayor o menor medida, hasta el punto de llegar a producirnos una intoxicación alimentaria y, por tanto, ser perjudiciales para nuestra salud.

No todos los alimentos se deterioran con la misma facilidad, y por ello podríamos clasificarlos en tres grupos, dependiendo del tiempo que tardan en estropearse. Acorde con los comentado se pueden clasificar los alimentos en 3 grupos, los alimentos perecederos o de alto riesgo, los alimentos semiperecederos o de bajo riesgo y los alimentos que se pueden considerar como no perecederos [4].

1. Alimentos perecederos o de alto riesgo

Son aquellos que se alteran con rapidez y deben consumirse en un plazo corto de tiempo. Con ellos hay que extremar las precauciones y **desde el momento de su adquisición deben conservarse en frío** para que su capacidad nutritiva no varíe en absoluto.

Suelen ser alimentos ricos en agua, proteínas y vitaminas como las carnes, los pescados, las frutas, las verduras, etc. [4].

2. Alimentos semiperecederos o de bajo riesgo

Son los que han sido procesados o conservados por congelación, deshidratación, salazón, enlatado... Su duración es más larga, y se pueden conservar durante más tiempo, siempre que las condiciones sean adecuadas. Podríamos incluir aquí las mermeladas, las grasas y los encurtidos.

Un producto que estaba conservado en lata, en el momento en que se abre es perecedero, aunque previamente hubiera estado esterilizado. Por ello, nunca se debe dejar ningún producto envasado en su lata después de haberla abierto [4].

3. Alimentos que se podrían considerar como no perecederos

Debido a su larga duración, tendríamos aquí la miel, el vinagre, las especias, las legumbres, los cereales..., que pueden durar hasta 2 años o más si están bien conservados.

1.3.1 Descomposición de los alimentos

Los productos alimenticios se pueden estropear por varias causas:

- Debido a una descomposición natural
- Debido a una contaminación con agentes externos

La descomposición natural o envejecimiento de los alimentos puede simplemente modificar sus características organolépticas, es decir su color, sabor, olor, textura, etc. Esto puede resultar a que resulten menos apetitosos y atractivos, o puede deteriorar sus componentes provocando pérdidas de su valor nutritivo.

Esta descomposición natural puede deberse a varios factores:

- 1) Los alimentos se descomponen de una manera natural por ciertas causas físicas como la temperatura, la luz, la humedad y el aire (oxígeno).

Los alimentos con un alto contenido en agua pueden perder esta humedad por respiración. Los vegetales, aunque estén bien envasados en la nevera, son alimentos vivos, y a pesar de estar ya recolectados van a seguir respirando, y por tanto van a perder humedad a través de sus hojas, y se irán arrugando o resecaando cambiando poco a poco su calidad original [3]. Por ello cuando la tapa de plástico o de cristal de un recipiente dónde se conservan alimentos en la nevera se observan, por su cara interior, pequeñas gotas de agua se deben a su respiración.

- 2) Los alimentos se pueden descomponer naturalmente también por causas biológicas como la acción de ciertas enzimas. Son los catalizadores que

se encuentran presentes en todas las reacciones químicas del organismo y, aunque no son venenosos en sí, afectan al ritmo de descomposición de los alimentos. Su acción, en pequeña escala, puede causar decoloración, pérdida de sabor y de valor nutritivo y, a la larga, acaban por dañar los alimentos envejeciéndolos hasta el punto de pudrirlos y que resulten peligrosos. Además, no sólo operan las enzimas de los tejidos cárnicos o vegetales de los alimentos, sino también y con mayor intensidad las enzimas que se encuentran en el interior mismo de los microorganismos y éstos, inevitablemente, existen en todos los alimentos.

Se ha comprobado que sólo una temperatura elevada puede detener, la acción de estas enzimas responsables del metabolismo de los tejidos [4].

Además de por su propia descomposición natural, los alimentos también pueden sufrir una **contaminación por agentes externos**, como puede ser una contaminación por microorganismos. Éstos son seres vivos microscópicos que se desarrollan y multiplican rápidamente en un ambiente adecuado, y los alimentos constituyen un medio de cultivo ideal y especialmente atractivo para ellos. Cuanto más ricos, jugosos y nutritivos sean los alimentos, más fácilmente se contaminarán, si no se tiene un especial cuidado con ellos. Aunque, no todos ellos son perjudiciales, ya que los hay también algunos beneficiosos, que ayudan, por ejemplo, a la fermentación de la cerveza o el vino.

1.3.2 Principales microorganismos en los alimentos

Los grupos más importantes de microorganismos que pueden contaminar nuestros alimentos y alterarlos son las bacterias, los virus, los priones y los hongos, incluyendo a mohos y levaduras en este último grupo.

Las bacterias, son organismos unicelulares que están por todas partes, en el aire, en el agua, en todos los seres vivos, en el interior y en el exterior de

nuestro cuerpo y también, en los alimentos. Son imposibles de vislumbrar a simple vista, puesto que son microscópicas.

La mayoría de estas bacterias prefiere vivir en medios templados, húmedos, ni demasiado ácidos ni demasiado salados. Pero algunas toleran bien el frío y el calor, y otras pueden sobrevivir incluso en medios secos, ácidos o muy salados [11]. Además, si las condiciones son adversas, muchas hasta pueden desarrollar formas resistentes llamadas "esporas". Unas necesitan oxígeno para vivir las llamadas aerobias, que crecen en la superficie de los alimentos. Otras, las anaerobias, prefieren ambientes sin aire y se desarrollan dentro de las carnes y pescados, en el interior de las latas de conserva o en alimentos envasados al vacío.

Entre las bacterias más destacadas entre los alimentos destacan:

- El grupo de las coliformes fecales que fermentan la lactosa con producción de ácidos y se transmiten por malos hábitos de manipulación en los alimentos. En este grupo se incluye el 90% de las colonias de *E. coli* y algunas cepas de *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Proteus*. Su presencia en el alimento brinda información sobre las condiciones higiénicas del producto y la eventual presencia de patógenos.

- Los enterococos, son microorganismos que se encuentran en el tracto intestinal y también en vegetales. Son un indicador de contaminación fecal, aunque tiene limitaciones como indicador su presencia en alimentos indica prácticas sanitarias inadecuadas o la exposición del alimento a condiciones que permiten la reproducción de microorganismos indeseables.

- Bacterias del género *Clostridium*, incluye bacterias anaerobias, bacilos gram positivos, esporulados, por lo que pueden persistir en el alimento cuando la mayoría de los microorganismos han sido destruidos. Es habitante usual del tracto intestinal de muchos animales y es productor de intoxicaciones alimenticias, cuyas esporas se destruyen a temperaturas de 100° C. El *Clostridium perfringes* se puede reproducir durante una cocción de grandes cantidades de alimentos a fuego muy lento, y está muy asociado al consumo de carne cocida. Igualmente, está presente *Clostridium botulinum*, formadora de

espora y que produce una potente neurotoxina [19]. Estas esporas son altamente resistentes y pueden sobrevivir en alimentos que han sido incorrectamente procesados.

Los virus, a pesar de que no pueden multiplicarse ni producir toxinas en los alimentos, son capaces de causar diversas enfermedades de origen alimentario. Esto se debe a su capacidad para permanecer viables en alimentos mantenidos a distintas temperaturas de refrigeración y en el medio ambiente marino. Los virus transmitidos por los alimentos son generalmente entéricos: infectan por vía oral (ingestión) y se eliminan por las heces.

Uno de los principales virus, es el denominado virus de la hepatitis A se transmite en general por el consumo de mariscos crudos o mal cocinados u otros productos crudos. Este virus, se transmite por las heces y prolifera en el tracto intestinal humano.

Los priones, son más simples estructuralmente que los virus, son proteínas capaces de replicarse presentes en todos los vertebrados superiores [11]. Si se alteran, pueden causar enfermedades. Pueden adquirirse a través de alimentos cárnicos procedentes de animales infectados y provocar la enfermedad tras un periodo de incubación de hasta 10 años.

Los hongos, tienen potencial para crecer en valores extremos de pH (1-11). Se caracterizan porque disminuyen la vida útil del producto y se les asocia con materia prima contaminada o ambiente contaminado y su presencia es indicativo de:

-Alimentos de baja acidez y alta actividad de agua (aw).

-Alimentos ácidos de baja aw, el crecimiento de hongos es mayor. Ejemplo: frutas frescas, vegetales, cereales, jugo de frutas, quesos y alimentos congelados.

Algunos de los hongos más importantes que se relacionan con los alimentos son: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Monilia*, *Byssochlamys*, *Candida*, *Sacharmyces* y *Rhodotorula*.

Los mohos, A diferencia de las bacterias, los mohos sí se detectan a simple vista ya que crecen en la superficie del alimento produciendo una masa algodonosa característica [11].

Aunque prefieren ambientes templados, también pueden crecer en la nevera. Como son poco exigentes pueden aparecer en condiciones muy diferentes, en productos húmedos o secos, ácidos, salados o dulces...

Aunque, también hay mohos útiles como los que se utilizan en la fabricación de algunos quesos tan sabrosos como el Roquefort, el Cabrales, el Camembert, etc.

Las levaduras, se encuentran de forma natural en el aire y en la piel de muchas frutas. También son microscópicas y no se detectan a simple vista, pero su presencia en los alimentos se puede apreciar por la formación de burbujas y la aparición de un ligero olor a alcohol.

La mayoría de las levaduras son **útiles** y se utilizan principalmente en los procesos de fermentación de la cerveza y del pan.

A diferencia de las bacterias y de los mohos, las levaduras no constituyen un riesgo para la salud y sólo afectan a las características organolépticas de los alimentos, es decir a su olor, color, sabor, etc.

1.3.3 Indicadores de la calidad microbiológica

Examinar un producto en busca de organismos indicadores puede proporcionar información rápida, de confianza y simple sobre la situación del proceso y del nivel general de higiene bajo el alimento procesado y almacenado. Estos indicadores deben:

- Estar presentes y ser detectables en todos aquellos alimentos de los que se evalúa la calidad.
- Su crecimiento y número deben presentar correlación negativa con la calidad del producto.
- Ser detectados y contados fácilmente en un periodo corto de tiempo

De esta forma la presencia de microorganismos indicadores puede sugerir un peligro microbiológico, por ejemplo, la presencia de *Escherichia coli* en una muestra indica una posible contaminación fecal [13].

Los coliformes fecales, donde está incluida *Escherichia coli*, se utiliza como indicador de contaminación fecal en agua. Cuando los coliformes llegan a los alimentos, no sólo sobreviven, sino que se multiplican, por lo que, en los alimentos, el grupo coliforme adquiere un significado distinto al que recibe en el agua. En productos alimenticios que han recibido un tratamiento térmico (pasteurización, horneado, cocción, etc.), se utilizan como indicadores de malas prácticas sanitarias [13]. Aunque las bacterias coliformes no son los únicos indicadores de agua fecales, existen otros grupos de bacterias como pueden ser los enterococos.

La pérdida de calidad en otros productos puede no estar limitada a un organismo, sino implicar a varios. En este tipo de productos, suele ser más práctico determinar el recuento de los grupos de microorganismos que causan mayor probabilidad de deterioro en cada alimento en particular.

De este modo, se puede emplear el recuento microscópico directo (RMD) se utiliza para estimar el número de colonias viables e inviables en muestras que contienen un elevado número de microorganismos, expresado en unidades formadoras de colonias por mililitro. (UFC/ml).

1.3.4 Características generales de las bacterias

La **pared celular** es una capa resistente que protege el contenido de la célula, da rigidez a esta, funcionando como mediadora en todas las relaciones de la célula con el entorno.

Existen dos tipos de paredes celulares, la de las bacterias gramnegativas y la de las bacterias grampositivas [18]. Las bacterias grampositivas poseen una pared celular constituida por 90% de peptidoglicano. Sin embargo, las bacterias gramnegativas presentan una capa fina de peptidoglicano y una membrana

externa (Figura 2). Un método para determinar fácilmente, el tipo de pared celular y diferenciar de este modo entre el tipo de bacteria, consiste en la tinción de Gram. Esta tinción es una tinción diferencial, ya que nos permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias gramnegativas y bacterias grampositivas. De este modo, las bacterias grampositivas retienen el cristal-violeta después de la decoloración y aparecen de color púrpura y las bacterias gramnegativas no son capaces de retener el cristal-violeta después de la decoloración y son teñidas de rojo-rosa debido a la safranina.

Fue desarrollada por el científico danés Hans Christian Gram en 1884; hoy en día, sigue siendo una de las tinciones más utilizadas universalmente debido a lo económico, sencillo y eficaz que resulta.

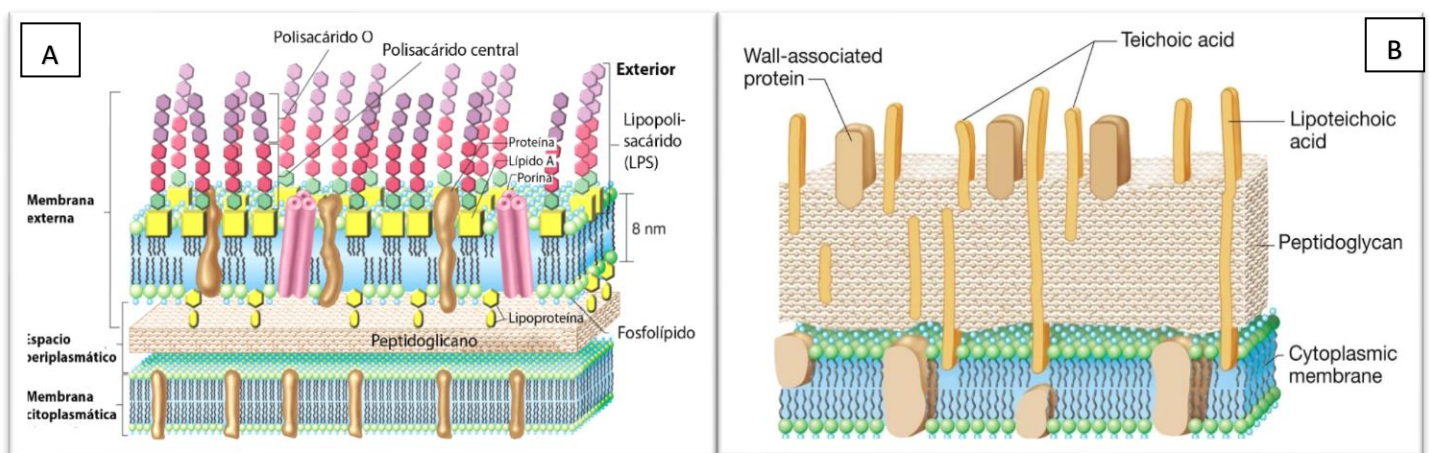


Figura 2. Esquema de la pared celular: A. Bacterias gramnegativas. B. Bacterias grampositivas.

No obstante, para la observación e identificación de estos microorganismos es necesario, en primer lugar, aislarlo en un medio de cultivo. Existen una gran cantidad de medios de cultivos, éstos se pueden clasificar atendiendo a varios criterios, composición, consistencia y utilidad [5].

- Con respecto a su **composición** los medios pueden ser **definidos**, si se conoce la composición exacta de cada uno de los componentes del medio y **complejos** si no se conoce la composición exacta del medio.
- Con respecto a su **consistencia** los medios pueden ser líquidos o sólidos.
- Según su utilidad se clasifican en: **no selectivos** y **selectivos** o **diferenciales**. En los medios no selectivos crecen gran variedad de microorganismos, los selectivos permiten diferenciar un tipo o varios de

microorganismos y los diferenciales nos permiten identificarlos en función a su metabolismo.

Entre los medios más comunes nos encontramos el medio de MacConkey que se trata de un medio diferencial y selectivo. Otros medios diferenciales muy utilizados son el medio de agar TSI y el caldo VPRM.

1.3.5 ¿Qué necesitan las bacterias para crecer?

Acabamos de ver que las bacterias se pueden desarrollar en medios muy diferentes, pero las bacterias responsables de las contaminaciones alimentarias necesitan, para crecer y multiplicarse, 4 elementos fundamentales:

- **Alimento**, los alimentos de alto riesgo son un cultivo idóneo para las bacterias al ser muy nutritivos, ricos en humedad. Sin embargo, los que son muy salados, muy dulces, muy ácidos, muy grasientos y demasiado secos son menos perecederos.

- **Temperatura adecuada**, las temperaturas ideales para que las bacterias se encuentren a sus anchas, crezcan y se multipliquen a la máxima velocidad están comprendidas en lo que hemos llamado zona de peligro, entre los 5 y 60 grados.

- **Humedad**, las bacterias, como el resto de los seres vivos, necesitan agua para vivir, y como la mayoría de nuestros alimentos tienen un alto porcentaje en su composición, son muy susceptibles de ser atacados por las bacterias.

- **Tiempo**, cuando las bacterias se encuentran en un producto alimenticio nutritivo, templado y húmedo, lo único que necesitan para multiplicarse es tiempo. En uno de estos medios de cultivo ideal, se empezarán a dividir a unas velocidades exponenciales y cuando su número sea elevado, o ellas mismas produzcan toxinas en cantidad, provocarán los síntomas de la intoxicación y/o infección.

1.3.6 Curva de crecimiento bacteriano

La curva del crecimiento bacteriano resulta de la representación gráfica del logaritmo de la concentración celular respecto al tiempo transcurrido de un cultivo [15] (Figura 3).

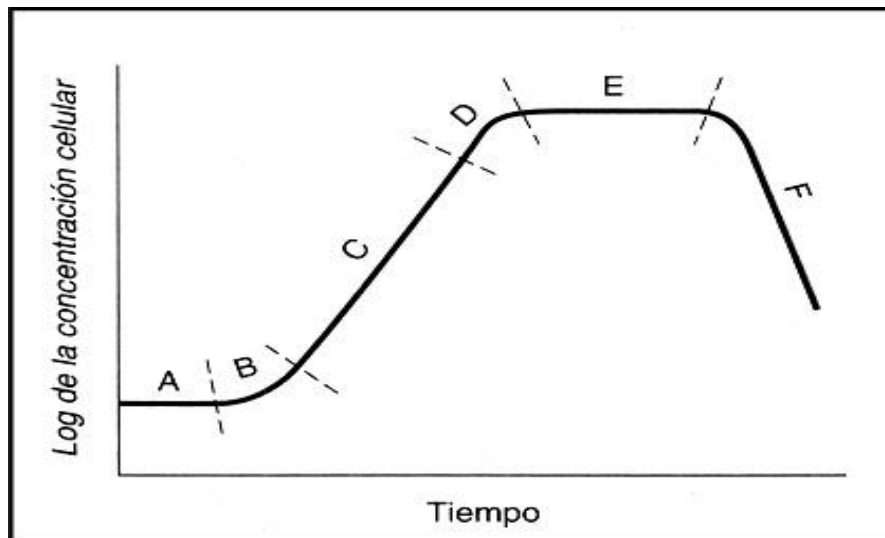


Figura 3. Representación de la curva de crecimiento bacteriano

A continuación, se muestra un cuadro con las características principales de cada fase y se desarrollan las fases más relevantes (Tabla 2).

Tabla 2. Diferentes fases de la curva de crecimiento bacteriano

Parte de la curva	Fase	Tabla de crecimiento
A	Latencia o rezago	Cero
B	Aceleración	Creciente
C	Exponencial	Constante
D	De retraso	Decreciente
E	Estacionaria máxima	Cero
F	Declinación	Negativa (muerte)

Fase de Latencia o rezago (A). Este periodo consiste en la adaptación de las células microbianas a su nuevo ambiente. Se puede prolongar en el caso de que el medio de cultivo previo y las condiciones actuales resulten tan diferentes que las células sean genéticamente incapaces de sobrevivir, por lo que sólo unas cuantas mutantes podrán subsistir, y obviamente se requerirá más tiempo para que éstas se multipliquen lo suficiente y sea notorio el aumento de células.

Fase Exponencial (C). Como el nombre lo indica, en esta fase las células se encuentran en un estado de crecimiento sostenido. Esto continua hasta que uno o más nutrientes se agoten, o hasta que se acumule tal cantidad de metabolitos tóxicos que se inhiba el crecimiento. El crecimiento se denomina exponencial porque la biomasa se incrementa exponencialmente con respecto al tiempo.

Fase Estacionaria Máxima (E). Como se explicó en la descripción de la fase anterior, ante el agotamiento de nutrientes en el medio o la acumulación de metabolitos tóxicos el crecimiento cesa por completo después de un periodo de decrecimiento en la tasa de crecimiento, lo cual corresponde a la fase D o de retraso. No obstante, por lo general en esta fase se puede observar recambio celular, lo cual se debe a que, aunque existe una pérdida lenta de células por muerte, dicha pérdida se compensa exactamente por la formación de nuevas células a través de crecimiento y división. La duración de esta fase depende de la naturaleza del microorganismo y de las condiciones del medio.

Fase de Declinación (F). Esta fase, también conocida como fase de muerte, representa el decremento de células debido al aumento progresivo de la tasa de mortalidad. Sin embargo, se pueden observar ligeras subidas en la curva que puede deberse a que las células consiguen crecer gracias a los nutrientes liberados por las células que mueren y se lisan, observándose recambio celular.

1.4 Tecnología de las conservas

La esterilización es el proceso que ha llevado a generar productos estables sin refrigeración, con una vida de incluso de varios años.

Durante el proceso, los alimentos son elevados a una temperatura específica, la cual es mantenida por un tiempo predeterminado y luego es enfriado, en un recipiente herméticamente sellado. Estos efectos térmicos aseguran la inactivación enzimática y microbiana, generando un producto estable.

Existen tres diferentes mecanismos de transferencia de calor: conducción, convección y radiación [16] (Figura 4).

La **conducción** ocurre cuando existe un gradiente de temperatura en un cuerpo, ya que se presenta una transferencia de energía de la región de alta temperatura a la de baja temperatura, por ejemplo, cuando se coloca una pieza de carne sobre una plancha caliente para cocinar.

La **convección** es la transferencia de calor entre partes relativamente frías y calientes de un fluido por mezclado, por ejemplo, cuando se hierve agua.

La **radiación**, es el calor emitido por un cuerpo debido a su temperatura, en este caso no existe contacto entre los cuerpos, ni fluidos intermedios que transporten el calor.

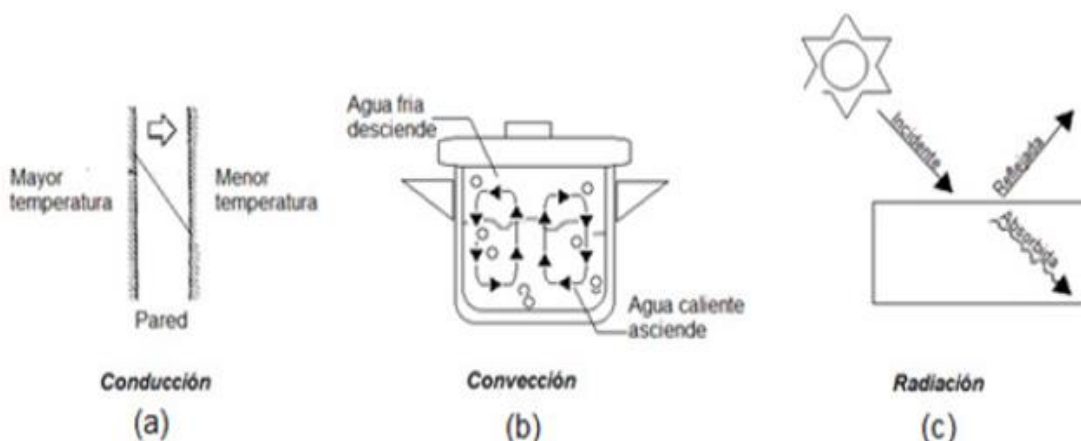


Figura 4. Esquemas de transferencia de calor: a. conducción. b. convección. c. radiación [9].

Para inactivar una enzima o destruir un microorganismo en un alimento es necesario que toda su masa permanezca a la temperatura de trabajo durante el tiempo necesario. Lo normal es que en la industria se caliente el alimento envasado con un fluido térmico y como el calentamiento no es instantáneo, se toma como referencia el 'punto frío' (el lugar en el envase que siempre tiene menor temperatura que el resto) [2]. Cuando el punto frío alcanza la temperatura de tratamiento y permanece en ella durante el tiempo prescrito se cumple el objetivo (pues todos los demás puntos reciben un tratamiento mayor).

En un alimento sólido conservado, en un envase de una determinada geometría, en el cual se tiene un calentamiento por conducción, el punto frío estará situado en el centro geométrico del envase (Figura 5), mientras que en el caso de los alimentos que se calienten por convección (alimentos líquidos) [2], el punto frío se localizará por debajo del centro del envase (Figura 5).

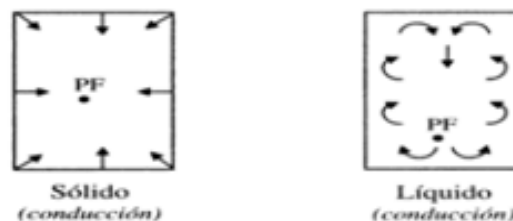


Figura 5. Sistemas de transferencia de calor según el estado del alimento

En una conserva con líquido de gobierno, el sólido va acompañado por un líquido que ocupa los huecos, favorece la convección, puede intercambiar materia con el sólido y ayuda a regular el pH. Puede consumirse con el sólido o no.

Las secuencias operativas típicas para la elaboración de conservas vegetales tienen muchas etapas en común y se diferencian principalmente en las etapas de acondicionamiento particulares, según la materia prima.

1.4.1 Secuencia operativa típica para la appertización de conservas

Se desarrolla un diagrama de flujo desde materias primas a los productos terminados, detallando corrientes de entrada y salida de cada etapa y condiciones de operación.

A continuación, se detalla el diagrama de flujo típico para el proceso de appertización de conservas comentando los procesos más relevantes (Figura 6):

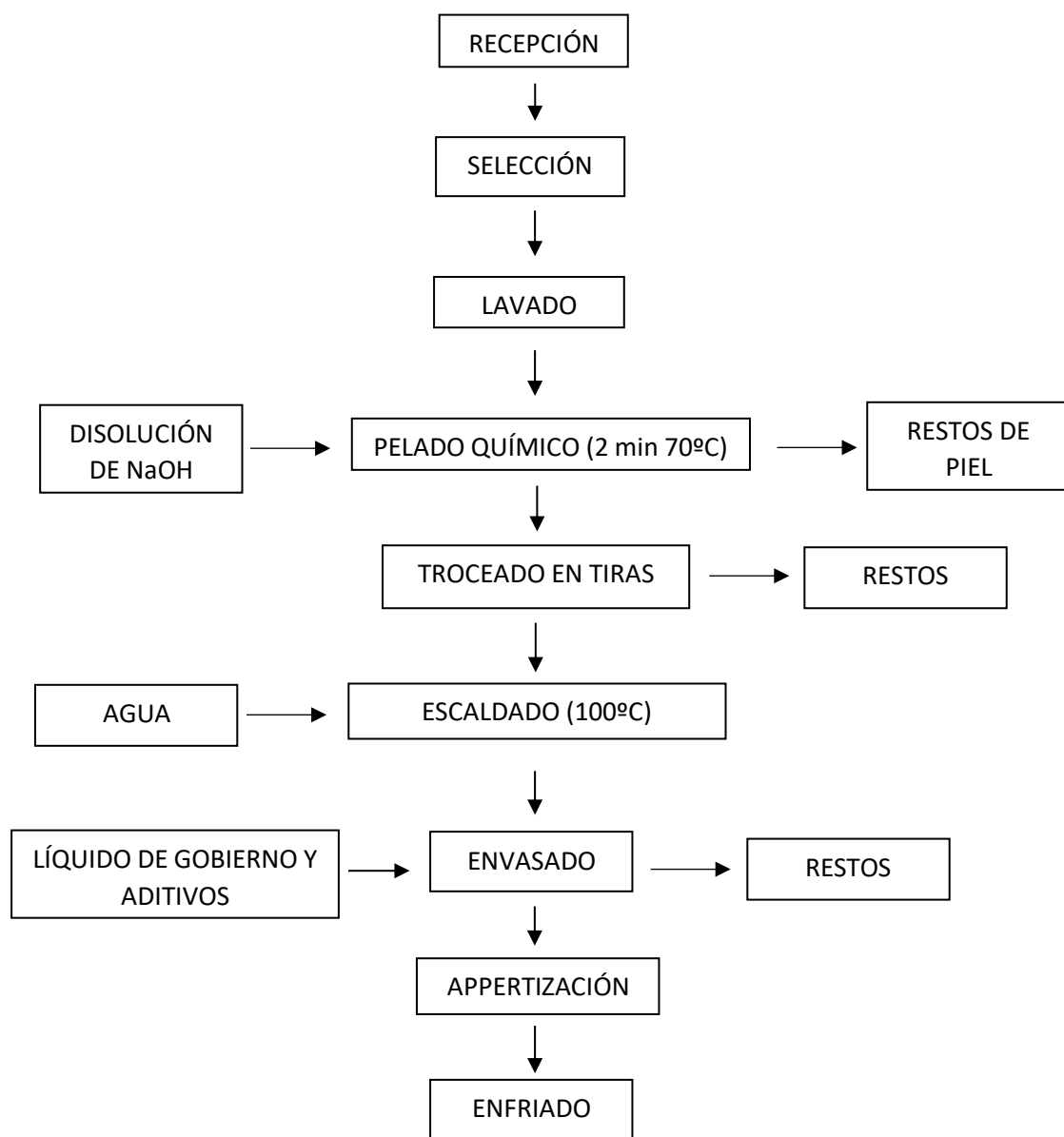


Figura 6. Diagrama de flujo general

Pelado químico: Es un proceso usado en la industria alimentaria para separar la piel de las hortalizas y frutas usando una disolución alcalina (NaOH). De esta manera, procedemos al intercambio del elemento calcio presente en la superficie de unión de la piel de la hortaliza con el sodio de la disolución, desprendiéndose esta [12].

Las condiciones son clave en este proceso. Al aumentar la temperatura y la concentración de sosa en la disolución la velocidad del pelado es mayor, de modo que es necesario ser más cuidadoso con el tiempo transcurrido del proceso para que no penetre la disolución en el interior de la hortaliza. Se suele emplear una dilución al 10% en sosa a una temperatura en torno a 70-80°C.

Escaldado: Es un tratamiento térmico que consiste en tratar el producto a alta temperatura durante un corto período de tiempo, realizado previamente a un tratamiento de conservación: congelación o appertización [8]. Este procedimiento tiene como fin inactivar las enzimas que pueden empeorar la calidad del producto durante su manipulación (cortado, pelado, troceado y almacenamiento).

Se recomienda reducir los tiempos de escaldado al máximo para evitar la pérdida de nutrientes (proteínas, vitaminas, etc.).

Se suelen realizar este procedimiento a temperatura de ebullición del agua, es decir a 100°C con un tiempo de empleo de entre 1 a 2 minutos.

Appertización: Es el proceso físico de esterilización a elevadas temperaturas en envases de cierre hermético que tiene como objetivo eliminar los microorganismos y/o esporas que pueda contener nuestro producto permitiendo una estabilidad biológica del producto a largo plazo.

Sin embargo, los microorganismos formadores de esporas solo se pueden eliminar mediante el tratamiento de tindalización [4]. Este procedimiento consiste en someter la sustancia a esterilizar a un proceso seriado de elevación y disminución de la temperatura, de tal modo que en cada una de esas etapas se eliminen paulatinamente las esporas.

1.4.2 Envase

El envase empleado para la conserva de pimiento es un envase de vidrio de 1/4 Kilogramo, con un volumen en torno a los 212ml.

Los envases de vidrio presentan las siguientes ventajas:

- Inerte
- Mucha flexibilidad de formas
- Impermeable a gases
- Resistencia a temperaturas muy altas
- Su capacidad no varía con el tiempo
- Facilidad de apertura
- Facilidad uso en hogar
- Mayor facilidad de limpieza
- Reciclable

Los inconvenientes son los siguientes:

- Se rompe
- Pesa más
- Más caro
- No apto para alimentos sensibles a la luz

1.5 Legislación para conservas vegetales

Para llevar a cabo la comercialización de un producto alimenticio, este debe de cumplir una serie de leyes nacionales y europeas vigentes.

El producto elaborado en el presente trabajo, al ser de fabricación española, presenta un proceso de elaboración y envasado que debe estar conforme a lo establecido por el Boletín Oficial del Estado (BOE) [21] y los reglamentos europeos.

A continuación, recogeremos las leyes por las que se debe regir nuestro producto de pimientos rojos al natural:

-Real Decreto 2420/1978 por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y venta de conservas vegetales; BOE nº244 del 12/10/1978.

-Orden de 21 de noviembre de 1984 por la que se aprueban las normas de calidad para conservas vegetales; BOE nº287 de 30/11/1984.

En esta orden, se trata las normas de calidad para las conservas vegetales esterilizadas térmicamente destinadas al consumo directo.

En el anexo 1 de la orden se establece las condiciones técnicas generales y de calidad que deben reunir todas las conservas vegetales esterilizadas térmicamente, con destino al consumo directo, que se comercialicen en territorio nacional.

Otro aspecto importante en la orden, corresponde con el anexo 15 donde se establece el objeto de las conservas de pimiento.

Esta norma establece las condiciones que deben reunir las conservas de pimiento obtenidas a partir de frutos *C. Annuum*, en las elaboraciones siguientes:

- Al natural
- En vinagre

Los frutos deben presentarse pelados, excepto en las elaboraciones en vinagre, desprovistos de corazón, cáliz, pedúnculo y prácticamente libres de semillas.

En cuanto a sus categorías comerciales:

Se establecen las siguientes categorías comerciales con sus exigencias y tolerancias:

-Pimientos enteros, en tiras o en cuadros que pueden ser de categoría Extra, Primera, Segunda.

-Pimientos «enteros y trozos», trozos irregulares y entreverados en todas las elaboraciones de Primera, Segunda categoría.

En el anexo 15, también se incluyen el contenido neto y escurrido (elaboración tradicional) que debe incluir la conserva según el formato (Tabla 3).

Tabla 3. Cuadro de masas mínimas recomendadas a las elaboraciones de pimientos con liquido de gobierno

Formato	Capacidad (ml)	Contenido neto (g)	Elaboración tradicional	En vinagre
1/8 cascabel (1/4 onzas)	106	80	60	-
1/8 americano (4 onzas)	125	100	70	65
1/4 kilogramo	212	185	125	110
1/2 kilogramo	425	300	250	220
1 kilogramo	850	780	500	440
3 kilogramos	2650	2500	1650	1400
A-10	3100	2900	1950	1650
5 kilogramos	4250	4000	2700	2250

En nuestro caso, se ha empleado como referencia el formato de conserva ¼ Kilogramo (212 ml), aunque no es de obligado cumplimiento el empleo de dicho formato.

Entre otros parámetros legales, se establecen, las diferencias entre las categorías extra, primera, segunda, mencionados anteriormente. En nuestro caso se emplean los de primera categoría (Tabla 4).

Tabla 4. Cuadro de exigencias y tolerancia de calidad para conservas de pimientos de primera categoría

<i>Categoría</i>	<i>Primera</i>
Color	Rojo pálido uniforme, sin presencia de partes verdes
En tiras	No inferior a 1cm (ancho)
Nº de semillas máx.	10 semillas (100g)
Max. De piel quemado (por pieza o 100g)	1,5 cm ²
Consistencia	80%

-Orden de 11 de febrero de 1987 por la que se modifica la de 21 de noviembre de 1984, que aprueba las normas de calidad para conservas vegetales; BOE nº44 de 11/02/1987 (BOE-A-1987-4524).

En esta orden se trata sobre el valor del pH, estableciéndose un cambio en el valor de pH máximo permitido. En las conservas vegetales, en que la esterilización térmica no se realice en autoclave o por proceso que garantice los mismos resultados, el pH no deberá ser superior a 4.6.

-Real Decreto 176/2013, de 8 de marzo, por el que se derogan total o parcialmente determinadas reglamentaciones técnico-sanitarias y normas de calidad referidas a productos alimenticios, entre ellas se modifica la orden de 21 de noviembre de 1984; BOE nº77 de 29/03/2013.

En este Real Decreto, quedan derogados, los apartados 15.6 y 15.7 del anexo número 15 Orden de 21 de noviembre de 1984, que corresponde con cuadro de masas mínimas recomendadas para las elaboraciones de pimientos con liquido de gobierno (Tabla 3). Sin embargo, es el que hemos aplicado como referencia al no existir normativa aplicable sobre esta conserva en relación a peso mínimo exigido según su formato.

-Real Decreto 1334/1999 del 31 de Julio, por el que se aprueba la norma general de etiquetado presentación y publicidad de los productos alimenticios. Actualizada al **reglamento (UE) nº1169/2011**, que regula la información alimentaria facilitada al consumidor, donde se exige el contenido nutricional. Aplicable desde el

13/12/2014 con la excepción de que la información nutricional con carácter obligatorio es aplicable a partir del 13/12/2016.

-Real Decreto 142/2002 del 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos, colorantes y edulcorantes empleados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. BOE nº44 del 20/02/2002.

En este Decreto, se aprueban aditivos, entre los que se encuentra el ácido cítrico (E-330) que utilizamos para acidular los pimientos, en cantidad permitida de *quantum satis*, expresión que significa que no se especifica ningún nivel máximo para el aditivo en cuestión, solo aquel derivado de las buenas prácticas de fabricación [21].

1.6 Objetivos

Para la mayoría de las personas, la palabra "higiene" significa «limpieza». Si algo parece limpio entonces piensan que debe ser también higiénico. Sin embargo, un alimento, puede ser no apto para el consumo, aunque no lo parezca. Es necesario, por lo tanto, realizar una correcta manipulación alimentaria para que los alimentos que se manejan sean totalmente higiénicos y aptos para ser consumidos sin causar intoxicación alimentaria.

El objetivo de este trabajo es hacer un estudio microbiológico durante la elaboración de una conserva vegetal de pimiento al natural, e intentar optimizar el proceso de appertización, modificando la temperatura y los tiempos del tratamiento. Para tal estudio se elaborará una conserva de pimiento rojo en el laboratorio del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química.

El análisis microbiológico se realizará en el Departamento de Microbiología en la Facultad de Biología. Se intentará identificar los tipos de microorganismos presentes en la superficie del pimiento, antes y durante las diferentes etapas de elaboración de la conserva, para ello se utilizarán diferentes medios de cultivo y pruebas bioquímicas para la identificación de algunos de estos microorganismos.

Par la optimización del proceso de appertización, se aplicarán dos temperaturas diferentes 100° C y 95°C con diferentes tiempos de tratamiento 5,10,20 y 50 minutos.

Por otra parte, se determinará el tiempo de la inocuidad microbiológica de la conserva de pimiento una vez abierta y mantenida a 4°C, tras la manipulación habitual del consumidor. Para ello, se hará un estudio de la curva de crecimiento de los microorganismos presentes en la conserva una vez abierta a lo largo de varios días, indicando el tiempo de estudio y la carga microbiana de la conserva. Con esto se pretende conocer es la vida útil de la conserva.

Por otra parte, se pretende demostrar, que el método utilizado para elaboración de la conserva vegetal, es suficiente efectivo como para ser empleado de forma tradicional en el hogar, pudiéndose consumir hasta varios días después de la apertura como cualquier conserva realizada a nivel industrial.

2.MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Elaboración de una conserva vegetal de pimiento rojo al natural

La elaboración de la conserva se realizó en el Departamento de Ingeniería Química de la facultad de Química. En la figura 7, se muestran las diversas etapas para la elaboración de la conserva de pimiento al natural.

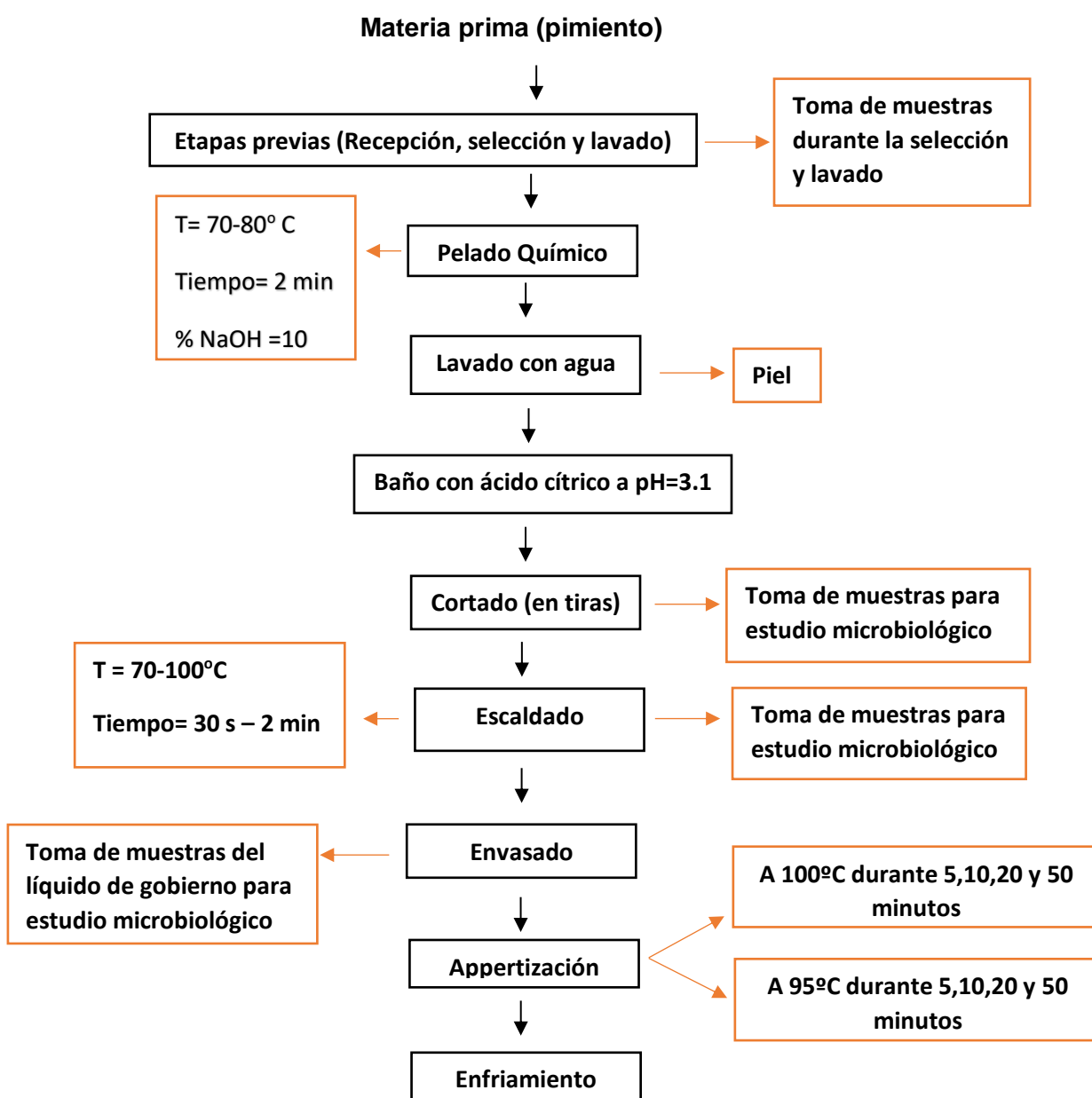


Figura 7. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de la conserva pimiento

Etapas previas

Recepción de la materia prima: en primer lugar, se hizo un balance de materia teniendo en cuenta el número de botes que se iban a preparar y el contenido de estos según indica la legislación, así el balance de materia se realizó para determinar la cantidad de pimiento necesario que había que comprar para elaborar la conserva. Tras esto, los pimientos se pesaron con ayuda de una balanza y se lavaron (Figura 8).

En esta etapa, se tomó una pieza de pimiento la cual fue empleada para el estudio microbiológico de microorganismos en la superficie del pimiento en la etapa del lavado.

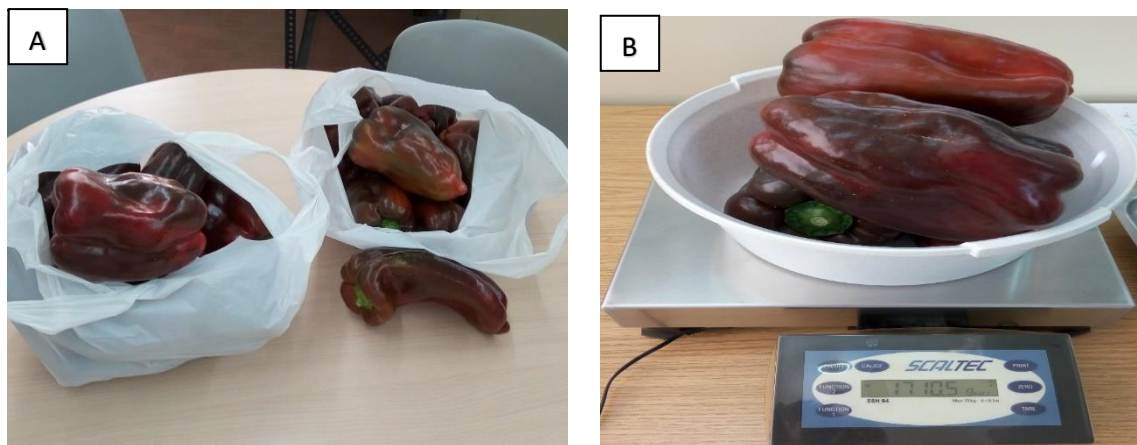


Figura 8. Etapas previas. Recepción y selección de la materia. A. Pimientos rojos. B. Pesado de pimiento

Lavado y pelado químico

En primer lugar, los pimientos se lavaron con agua para seguidamente realizar el pelado químico.

Para la realización del pelado químico, los pimientos se sumergieron durante 2 minutos en una concentración de sosa (NaOH) al 10% (Figura 9A) calentada en torno a los 70 y 80 °C. Seguidamente, los pimientos se sacaron de la solución y se procedió a quitar la piel bajo un continuo flujo de agua. Posteriormente, se colocaron en un baño con una solución de ácido cítrico a pH=3.1 para neutralizar el exceso de NaOH (Figura 9B).

El pimiento permaneció en esta solución hasta el momento en el que se procedió a realizar el cortado en tiras.

Finalmente, se obtuvo un pimiento totalmente pelado, sin piel adherida (Figura 9C). Este tipo de pelado permite la destrucción de los polisacáridos que constituyen la capa externa de la carne, adherida a la piel.



Figura 9. Pelado Químico. A. Tratamiento con NaOH 10% a 70-80°C. B. Baño con ácido cítrico a pH=3.1 C. Pimiento pelado

Cortado en tiras

Los pimientos fueron descorazonados retirando todas las semillas. Posteriormente, se cortaron en tiras de 20 mm de ancho y 1 cm de largo que se colocaron en una olla con una solución de agua con ácido cítrico, la cual va a ser empleada como líquido de gobierno tras el escaldado. (Figura 10).

Por otra parte, se trituraron algunas tiras para medir el pH y los grados brix de diferentes pimientos. En esta fase se cogieron algunas tiras que se introdujeron introducidas en botes estériles para su posterior análisis microbiológico.

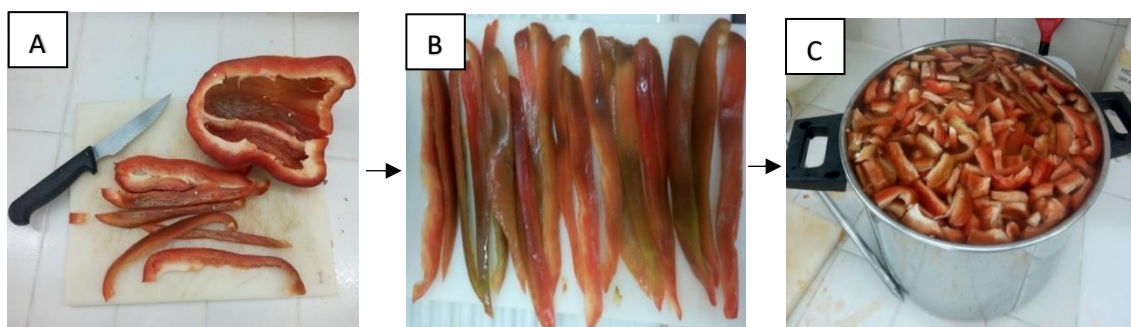


Figura 10. A y B. Pimientos cortados C. Pimientos en solución acuosa de ácido cítrico a pH=3.1

Escaldado

Nos permite inactivar a las enzimas peptinasa predominantes en el pimiento.

- Se llenó una olla con un poco más de la mitad con agua, se le añadió ácido cítrico para bajar el pH, hasta 3.1.
- Posteriormente se calentó hasta llegar al punto de ebullición, y se introdujeron las tiras de pimientos, hasta que nuevamente alcanzó la temperatura de 100°C.
- Transcurridos dos minutos, se retiró de la fuente de calor, dejando que se enfriara y a continuación se procedió al envasado.

En esta etapa, también se realizó medidas del pH y los grados brix de las tiras de los pimientos, para conocer si se había producido cambios al realizar dicha etapa.

Por otra parte, se recogieron muestras en un bote estéril para su posterior análisis microbiológico (Figura 11).

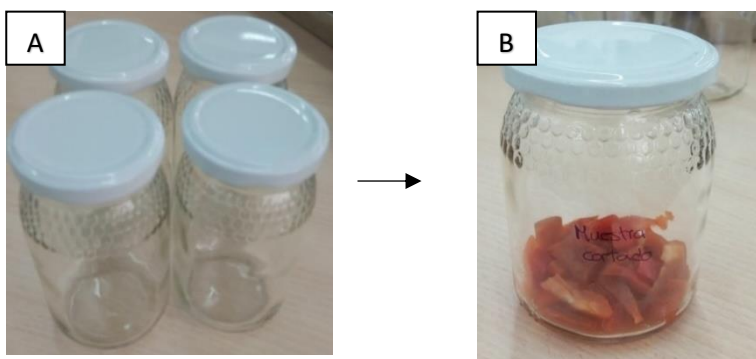


Figura 11. A. Botes estériles para el análisis microbiológico. B. Muestra de pimiento en tiras

Envasado

Se añadió el líquido de gobierno, el cual, consiste en agua acidificada con ácido cítrico a pH de 3.1 procedente del escaldado. Se introdujeron las tiras y se llenó el bote con el líquido de gobierno hasta llenarlo, evitando la formación de burbujas que disminuyeran el contenido neto de la conserva (Figura 12).



Figura 12. Envasado de los botes de vidrio con tiras de pimientos.

Appertización

El proceso de appertización se realizó a 2 temperaturas distintas, a 95°C y a 100°C con diferentes tiempos de esterilización 5, 10, 20 y 50 minutos.

Transcurrido este tiempo, se retiraron los botes del intercambiador de calor con ayuda de unas pinzas y se enfrió con un flujo continuo de agua hasta que los botes obtuvieron una temperatura en torno a 35-40°C (Figura 13).



Figura 13. A. appertización a 95° C. B. appertización a 100° C. C. retirada de botes. D. Enfriamiento final

Este proceso realizado a alta temperatura nos permite evitar una posible contaminación y crear un espacio de botella que nos permita un mejor cierre. Esto es debido a que cuando la conserva regresa lentamente a la temperatura ambiente y a su volumen original, al no existir el aire que se encontraba en el espacio superior se crea un vacío que es el que produce el cierre hermético de la tapa. Este cierre al vacío es el que impide una nueva contaminación al evitar que el aire entre nuevamente hacia el interior del producto

Enfriado

Los botes se dejaron reposar tres semanas permitiendo el equilibrio químico, entre el pimiento y el líquido de gobierno.

Una vez transcurrido todas estas etapas se realizó la **caracterización** de los botes. Con esta caracterización podemos saber si la conserva ha alcanzado el equilibrio en cuanto a pH y grados Brix. Conforme a la Orden del 21 de noviembre de 1984, se vació la conserva, es decir, el contenido del bote, sobre un embudo colador con una luz de malla de 5mm durante 2 minutos, pesando las piezas de pimiento, obteniéndose el peso escurrido (PE). El peso neto se calcula por diferencia con la tara del tarro más la tapa. Se midió el pH y los grados brix del líquido de gobierno. El pH se midió con ayuda de un pH metro de bolsillo (Milwaukee). Los grados Brix que determinan la cantidad total de materia seca (generalmente azúcares) disuelta en un líquido se midió con ayuda de un refractómetro de mano.

2.1.1 Balances de materia

Este balance se realizó para determinar la cantidad en gramos de pimientos rojos necesario para llevar a cabo el proceso de elaboración de conservas de

pimientos. Para ello, se tomó como referencia la Orden de 21 de noviembre de 1984 por la que se aprueban las normas de calidad para conservas vegetales; BOE nº287 de 30/11/1984 (mencionada anteriormente), la cual se encuentra actualmente derogada. Como mínimo se establece como referencia:

- 185 g de peso neto (PN). Este valor corresponde con el valor de pimiento junto con su líquido de gobierno, en nuestro caso agua acidulada. Para evitar posibles errores, se establecen valores por encima de los establecidos, se estableció como PN **200 gramos**.
- 125 gramos de peso escurrido (PE). El peso escurrido hace referencia al peso del pimiento sin el líquido de gobierno. Se tomó como valor establecido **140 gramos**, para evitar valores inferiores establecidos y debido al hecho de que el pimiento pierde masa durante el tratamiento debido a la pérdida de sales, comprobado por pruebas previas.

Los valores estimados corresponden al envase de 1/4 kg (Tabla 5).

Tabla 5. Medidas peso neto y peso escurrido para conservas de pimiento de 1/4 kg

Tipo de peso	Hoja establecida	Peso que se estima
Peso neto	200g	185g
Peso escurrido	140g	125g

Considerando que se envasaran 17 botes, junto con el hecho de que el pimiento tiene un rendimiento de un 40%, datos establecidos por el BEDCA [20], se realizó el siguiente calculo:

$$140 \times 17 \times 100 / 40 = \mathbf{5950g}$$
 de pimientos rojos.

Serán necesarios 5950 gramos de pimientos para la preparación de la conserva y los estudios microbiológicos.

2.2 Análisis Microbiológico para la elaboración de conservas de pimientos

Para el estudio microbiológico se tomaron muestras antes de la elaboración de la conserva y a lo largo de las diferentes etapas de su elaboración. Se siguió el siguiente plan de estudio para la identificación de microorganismos presentes en la superficie del pimiento:

- Se realizó un aislamiento en agar nutritivo y tinción de Gram
- Se realizaron pruebas presuntivas y confirmativas para bacterias coliformes y enterococos fecales.
- Se emplearon medios de cultivos selectivos y diferenciales como medio de MacConkey y de TSI (triple sugar iron).
- Se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos como Voges Proskauer Rojo de Metilo (VPRM) y Api 20E para la identificación de enterobacterias.
- Para el estudio microbiológico de las etapas de troceado, escaldado y envasado durante el proceso de elaboración de la conserva. Se recogieron muestras para el aislamiento de microorganismos en medio no selectivo (agar nutritivo).
- Para el estudio de la estabilidad microbiológica en la conserva de pimiento una vez abierta, se realizó el recuento en placa para determinar número de microorganismos presentes y medida de la densidad óptica para determinar la biomasa microbiana.

2.2.1 Composición de los medios de cultivo

- Medio no selectivo. **Agar nutritivo:**

Extracto de levadura o carne -----> 5 g
 polipectona -----> 5 g
 Cl Na -----> 5 g
 Agar nutritivo -----> 20 g
 Agua destilada -----> 1000 ml

- Medios selectivos y diferenciales

▪ **MacConkey**

Hidrolizado pancreático de Gelatina -----> 17.0 g
 Hidrolizado pancreático de Caseína -----> 1.5 g
 Hidrolizado péptico de tejidos animales -----> 1.5 g
 Lactosa -----> 10.0 g
 Sales biliares -----> 1.5 g
 Cloruro sódico -----> 5.0 g
 Rojo neutro -----> 0.03 g
 Cristal violeta -----> 0.001 g
 Agar -----> 13.5 g
 Agua destilada -----> 1000 ml

▪ **TSI (triple sugar iron)**

Extracto de carne -----> 3,0 g
 Extracto de levadura -----> 3,0 g
 Peptona -----> 15,0 g
 Proteosa-peptona -----> 5,0 g
 Lactosa -----> 10,0 g
 Sacarosa -----> 10,0 g
 Glucosa -----> 1,0 g
 Sulfato ferroso -----> 0,2 g
 Cloruro de sodio -----> 5,0 g
 Tiosulfato de sodio -----> 0,3 g
 Rojo fenol -----> 0,024 g
 Agar -----> 12,0 g
 Agua destilada -----> 1000 ml

- Pruebas bioquímicas:
 - **Voges Proskauer-Rojo de Metilo (VPRM)**
 - Polipeptona -----> 7,0 g
 - Glucosa -----> 5,0 g
 - Fosfato dipotásico -----> 5,0 g
 - Agua destilada -----> 1000 ml

 - **API 20E.** La galería de pruebas bioquímicas API 20E permite la identificación para bacterias del orden *Enterobacteriales*

- Pruebas para identificación de bacterias coliformes y enterococos fecales
 - **Prueba presuntiva bacterias coliformes.** Caldo lactosado y púrpura de bromocresol.
 - Triptona -----> 5 g
 - Extracto de carne -----> 5 g
 - Lactosa -----> 5 g
 - Púrpura bromocresol -----> 0.025 g
 - Agua destilada -----> 1000 ml

 - **Prueba confirmativa bacterias coliformes.** Verde brillante
 - Bilis -----> 20 g
 - Lactosa -----> 10 g
 - Peptona -----> 10 g
 - Verde brillante -----> 0.013 g
 - Agua destilada -----> 1000 ml

 - **Prueba presuntiva enterococos fecales.** Azida de Rothe:
 - Peptona carne -----> 10 g
 - Peptona caseína -----> 10 g
 - Dextrosa -----> 5g
 - Na Cl -----> 5 g
 - K₂HPO₄ -----> 2.7 g
 - KH₂PO₄ -----> 2.7 g
 - Azida sódica -----> 0.2 g
 - Agua destilada -----> 1000 ml

2.2.2 Estudio para la identificación de microorganismos presentes en la superficie del pimiento

Se realizarán diversos estudios mediante el empleo de medios diferenciales y pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos presentes en la superficie del pimiento.

2.2.2.1 Aislamiento de microorganismos en agar nutritivo

Se tomaron muestras de la superficie del pimiento empleando tres métodos diferentes:

a) Recogida de muestras con un bastoncillo en agua estéril. Se humedeció un bastoncillo en 200 μ l de agua estéril y se pasó por diferentes zonas de la superficie del pimiento y se llevó a cabo la siembra por zonas en placas de agar nutritivo a pH=7 y pH=4.6. Posteriormente las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C (Figura 14)

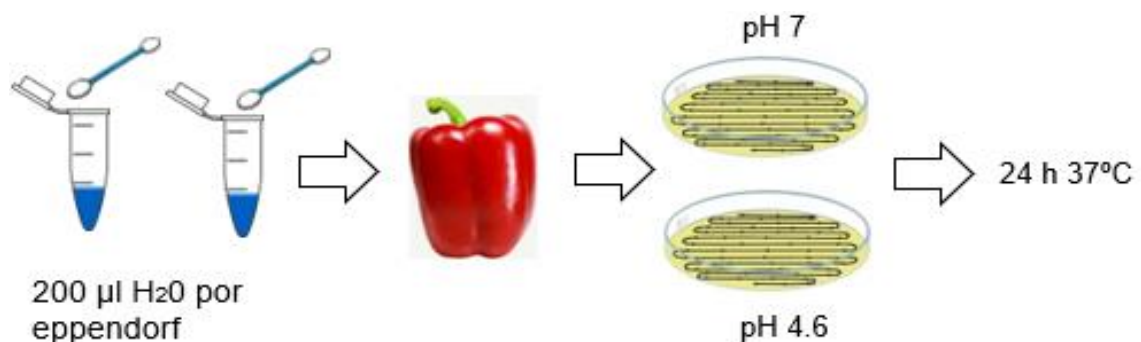


Figura 14. Método primero. Recogida de muestras con un bastoncillo en agua estéril

b) Recogida de muestras con un bastoncillo húmedo y posterior resuspensión. Se introdujo un bastoncillo en un eppendorf que contenía 400 μ l de agua estéril, se recogió la muestra de la superficie del pimiento y posteriormente se resuspendió el bastoncillo en los 200 μ l del agua restantes como se indica en la figura 15. A continuación, se sembraron dos placas de agar nutritivo a pH=7 y pH=4.6 y se incubaron durante 24 horas a 37°C.

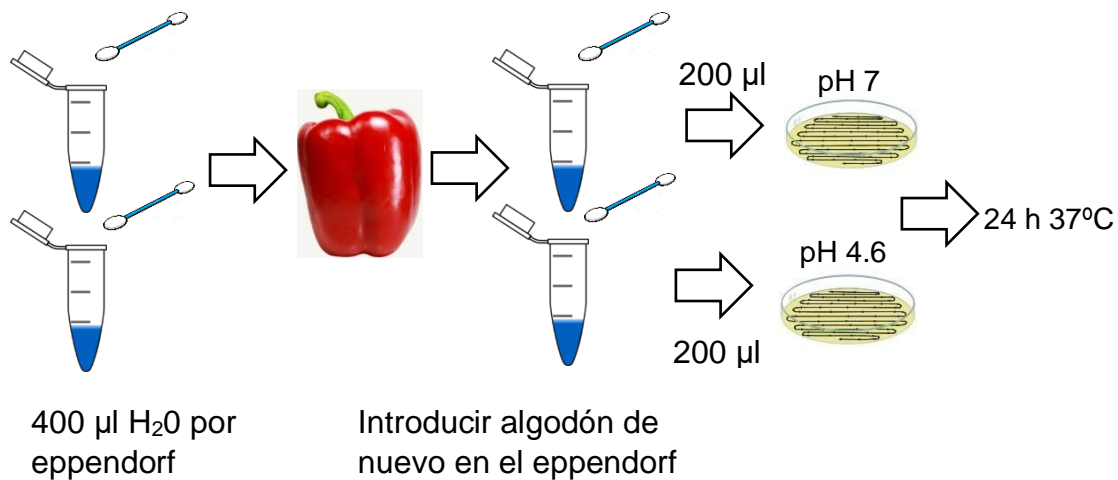


Figura 15. Método segundo. Recogida de muestras con un bastoncillo húmedo y posterior resuspensión

c) Recogida de la muestra del lavado en bandeja estéril. Se realizó el lavado del pimiento con 80 ml de agua estéril, a continuación, se sembraron en césped 100 μ l del agua del lavado en placas de agar nutritivo a pH=7 y pH=4.6. Se incubaron durante 24 horas a 37° C.

La siembra a dos pH diferentes nos permitió observar el crecimiento de microorganismos neutrófilos y acidófilos. Las siembras se realizaron en una campana de flujo laminar para evitar posibles contaminaciones.

2.2.2.2 Tinción de Gram

Para la identificación de las colonias bacterianas obtenidas en el lavado del pimiento, se realizó la tinción de Gram a varias de las colonias morfológicamente diferentes seleccionadas del crecimiento en placa, siguiendo los pasos que a continuación se describen:

1. Extensión del cultivo: En un portaobjetos limpio, libre de grasa, y con un asa estéril, se colocó una gota de agua. A continuación, se cogió un poco de biomasa de la colonia bacteriana que se quería identificar, se realizó un frotis o extensión, se dejó secar y se fijaron las bacterias al portaobjetos por calor, pasando el portaobjetos unas tres veces por la llama del mechero.
2. Tinción de Gram [10]. Se añadieron los siguientes compuestos en el orden y tiempo que se indican
 - Cristal violeta, dos minutos
 - Lavado suave con agua
 - Lugol, 30 segundos
 - Lavado con agua
 - Alcohol a 96°, 15 segundos
 - Lavado con agua
 - Safranina, 2 minutos
 - Lavado con agua
 - Secado a temperatura ambiente

Una vez realizada la tinción de Gram, se observó la preparación al microscopio óptico (Olympus BX61), con el objetivo de 100x, para la toma de micrografías.

Las bacterias grampositivas aparecieron teñidas de azul-violeta y las grampositivas de color rojo (Figura 16).



Figura 16. Tinción de Gram

2.2.2.3 Pruebas para la Identificación de bacterias coliformes y enterococos.

Se realizaron dos pruebas, la prueba presuntiva y la prueba confirmativa, con el agua restante del lavado del pimiento.

- Identificación de bacterias coliformes:

-Prueba presuntiva. Para esta prueba se utilizaron 9 tubos que contenían como medio caldo lactosado con púrpura de bromocresol (indicador de pH) y campana de Durham. Este medio presenta una coloración morada. Tres de estos tubos contenían doble concentración (2x), los cuales fueron inoculados con 10 ml del agua de lavado. Los otros 6 tubos restantes, con concentración sencilla (1x) fueron inoculados, tres de ellos con 1 ml de agua de lavado y otros 3 con 100 μ l. Se dejaron incubando Incubar a 37°C durante 24 horas (Figura 17). Se considera positivo aquellos tubos que presentan coloración amarilla y gas.

-Prueba confirmativa. A partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva, se inocularon 100 μ l en un tubo con caldo de bilis lactosa verde brillante (BLVB) y campana de Durham, que presenta una coloración verde. Se dejó crecer a 37°C y se examinaron a las 24-48 horas (Figura 17). La presencia de gas atrapado en las campanas de Durham y turbidez se considera como positivo.

- Identificación de enterococos:

-Prueba presuntiva. Para esta prueba se utilizaron 9 tubos que contenían como medio caldo de azida de Rothe. Este medio tiene coloración amarilla. Tres de estos tubos contenían doble concentración (2x), los cuales fueron inoculados con 10 ml del agua de lavado. Los otros 6 tubos restantes, con concentración sencilla (1x) fueron inoculados, tres de ellos con 1 ml de agua de lavado y otros 3 con 100 μ l. Se dejaron incubando a 37°C durante 24 horas (Figura 17). Se consideran positivo aquellos tubos que presenten turbidez.

-Prueba confirmativa. Se realizaron tinciones de Gram a los tubos positivos, la presencia de cocos Gram + en cadena observados durante la tinción nos confirma la presencia de enterococos fecales.

Prueba presuntiva

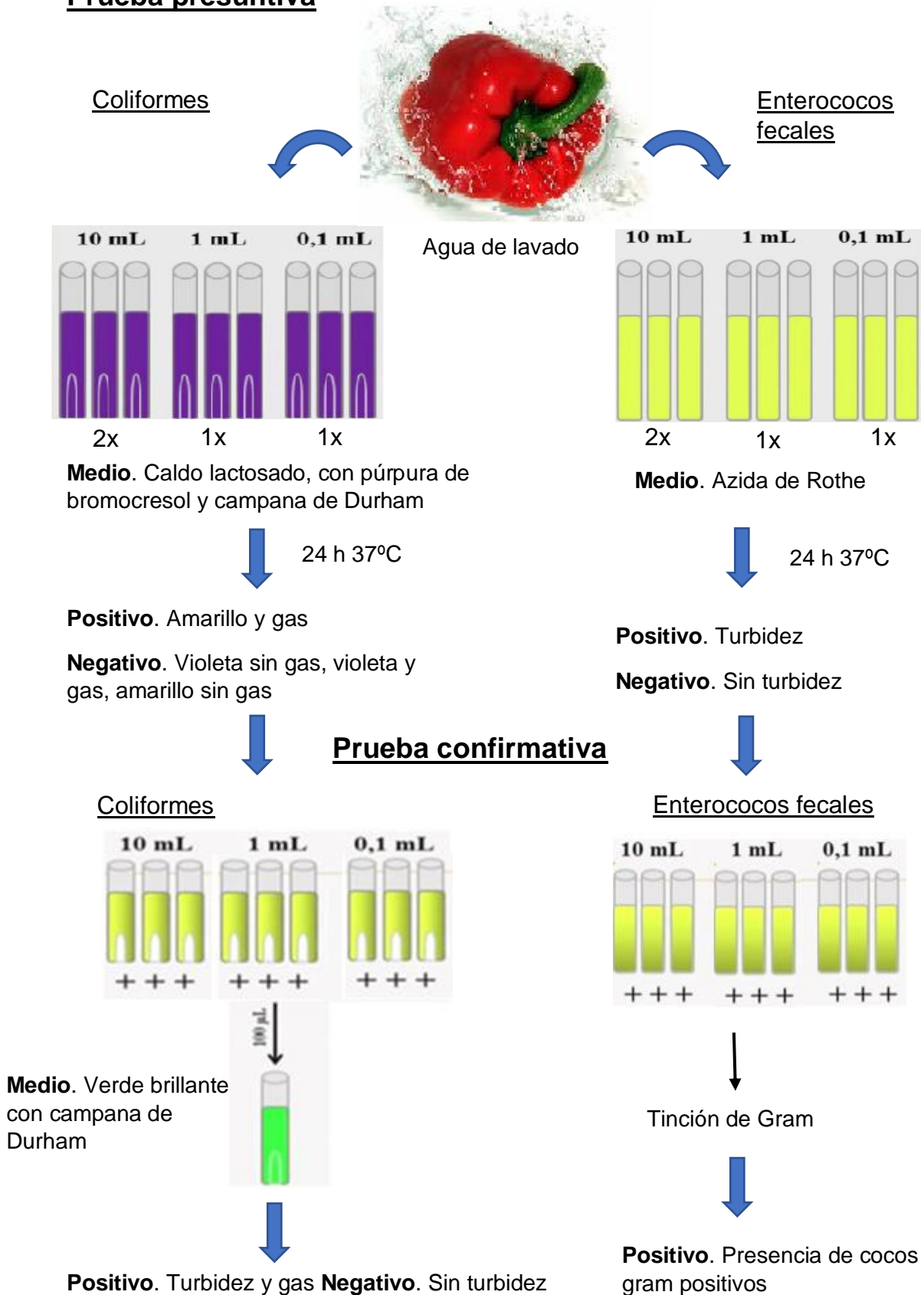


Figura 17. Esquema general de las pruebas presuntivas y confirmativas.

2.2.2.4 Medios selectivos y diferenciales para la identificación de microorganismos: MacConkey y TSI.

Para este estudio se utilizaron colonias bacterianas gran negativas procedentes del lavado del pimiento. Dichas colonias se aislaron previamente realizando una siembra en zonas en agar nutritivo. Para ello, la placa se dividió en zonas [5]. Se cogió biomasa con el asa estéril y se realizó un zigzag en la primera zona. Luego, se esterilizó el asa y se hizo un segundo zigzag tocando parte de la primera zona y así hasta realizar el 4 zigzag que no deben tocar la primera zona.

Estas colonias aisladas se sembraron en medios selectivos y diferenciales. Se emplearon dos medios, el medio de MacConkey y el medio TSI. Posteriormente se emplearon las pruebas bioquímicas de VPRM y API 20E (Figura 18).

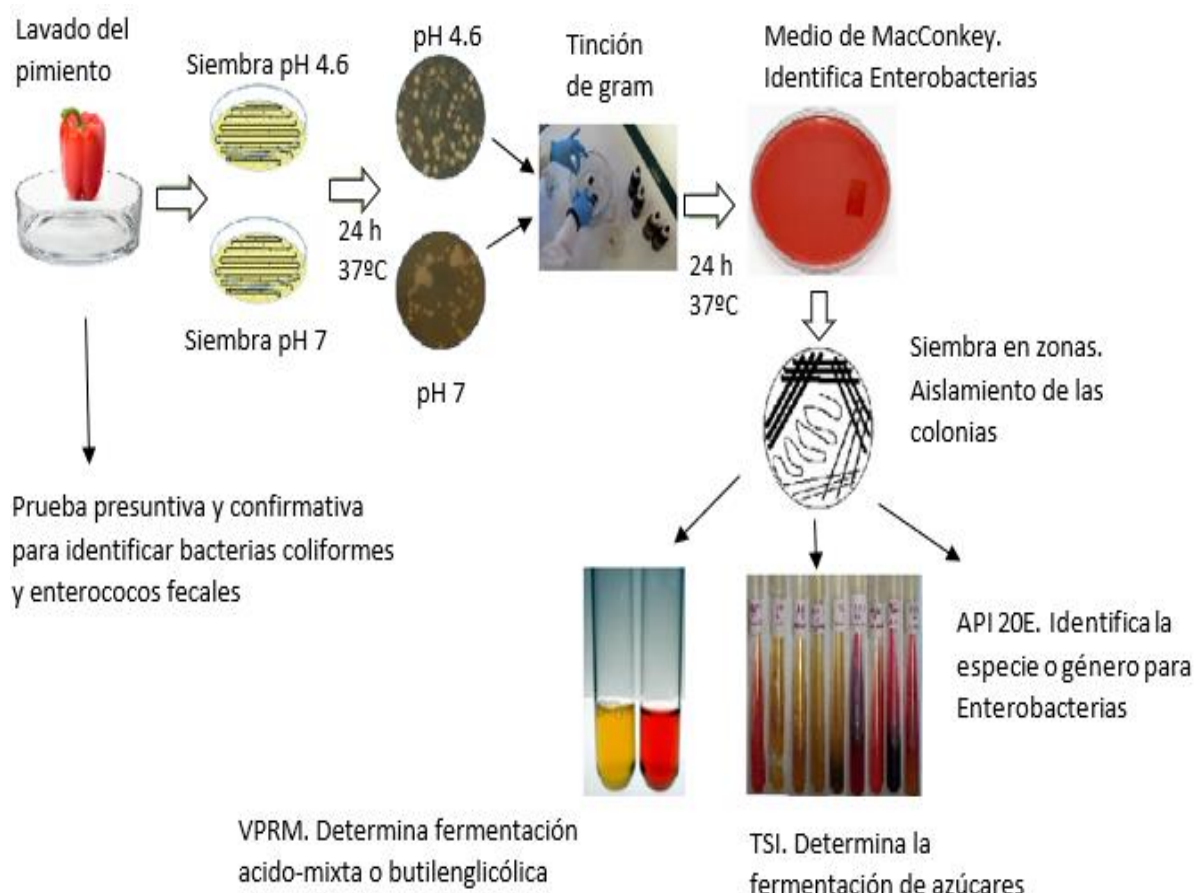


Figura 18. Esquema del proceso utilizado para la identificación de microorganismos presentes en el lavado del pimiento

- Medio de MacConkey. Este medio se utilizó para la identificación de enterobacterias (bacterias gram negativas) presentes en la muestra obtenida del lavado del pimiento. La siembra se realizó en zonas y se incubó durante 24 horas a 37°C.

El medio de MacConkey sólo deja crecer a las bacterias gramnegativas. Las bacterias gram positivas no crecen porque el cristal violeta y las sales biliares inhiben el crecimiento, junto con el hecho de que las sales biliares inhiben el crecimiento de algunas bacterias gramnegativas que no son enterobacterias.

Además, presenta un indicador de pH rojo neutro que nos permite diferenciar enterobacterias fermentadas de lactosa de las no fermentadoras.

- Medio TSI. Este medio se utilizó para determinar si las bacterias eran capaces de fermentar los azúcares: glucosa, lactosa y/o sacarosa, esto se consigue mediante la presencia de un indicador de pH, el rojo de fenol. Si el medio es de color rojo indica que el pH es alcalino y por lo tanto no hay fermentación de azúcares. Si el color es amarillo indica que el pH es ácido y por lo tanto hay fermentación de azúcares. La siembra se realizó cogiendo biomasa con una aguja, se pinchó hasta el fondo del tubo que contenía el medio TSI y se hizo un zigzag sobre la superficie del agar. Los tubos se incubaron durante 24 horas a 37°C.

2.2.2.5 Pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos: VPRM y API 20E

Al igual que en el apartado anterior, para este estudio se utilizaron colonias bacterianas gramnegativas procedentes del lavado del pimiento. Las colonias se aislaron previamente en zonas en un medio de agar nutritivo. A

continuación, se sembraron en un tubo VPRM (Voges Proskauer Rojo de Metilo) y en una galería de Api 20E para la identificación de enterobacterias [1].

- Prueba VPRM. Esta prueba se realizó para determinar si las bacterias eran capaces de fermentar la glucosa con producción de ácido por la vía ácido mixta o con producción de un producto final neutro (acetoína) por la vía butilenglicólica [5].

La siembra se realizó tomando biomasa bacteriana con un asa y agitando el tubo que contiene el caldo VPRM. Se dejó incubar durante 24 horas a 37°C. Para su lectura, se le añadió unas gotas de rojo de metilo.

- Prueba API 20E. Se emplea para la identificación de enterobacterias. La galería API 20E consta de 20 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados (Figura 19).



Figura 19. Galería API 20E con 20 microtubos

Para realizar la prueba del API 20E, se cogió la colonia bacteriana y se resuspendió en 5 ml de agua estéril y seguidamente se agitó con ayuda de un agitador vórtex. Antes de inocular la galería, se llenaron con agua los alveolos para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación.

En cada tubo se pueden diferenciar dos partes: el tubo en sí y la cúpula. Todos los tubos se llenan sólo hasta la base de la cúpula con las siguientes excepciones: en los llamados VP, GEL y CIT la suspensión bacteriana también se añade a la cúpula. En el caso de los tubos ADH, LDC, ODC, H₂S y URE, la cúpula se rellena con parafina líquida para conseguir condiciones anóxicas en el tubo. A continuación, se incubó a 37 °C durante 24 horas.

Se pueden realizar 20 pruebas bioquímicas distintas, algunas de ellas son de lectura directa tras la inoculación en la galería y la posterior incubación durante

24 horas a 37°C. Sin embargo, para la lectura de otras pruebas es necesario añadir una serie de reactivos.

Las pruebas bioquímicas son las siguientes [17]:

ONPG: Se investiga la presencia de β -galactosidasa. El medio contiene orto-nitrofenil-galactósido (ONPG) que es incoloro. La β -galactosidasa rompe este galactósido produciendo orto-nitrofenol que es de color amarillo. Por ello, el color amarillo indica una reacción positiva, en tanto que la reacción negativa es incolora.

ADH: Si la bacteria presenta esta enzima (arginina dihidrolasa), transformará la arginina en ornitina, amoníaco y CO_2 , originando una subida del pH que hará que el indicador de pH (rojo fenol) vire a color rojo. La ausencia de la enzima (reacción negativa) dará un color amarillo.

LDC: Si la bacteria presenta la enzima lisina descarboxilasa, a partir de lisina producirá cadaverina y CO_2 , con la consiguiente alcalinización del medio y viraje a rojo del indicador (rojo fenol). La reacción negativa se detecta por el color amarillo.

ODC: Si la bacteria tiene la enzima ornitina descarboxilasa, producirá putresceína y CO_2 a partir de ornitina. La consecuente subida del pH dará lugar a la aparición de un color rojo (el indicador es nuevamente el rojo fenol). El valor negativo se detectará por un color amarillo.

CIT: Se investiga la capacidad de la bacteria de crecer con citrato como única fuente de carbono. La utilización del citrato sódico del medio origina una subida de pH que hace que el indicador azul de bromotimol vire a color azul. La prueba negativa se detectará por un color verde.

H₂S: Si la bacteria produce sulfuro a partir de tiosulfato sódico que hay en el medio, reaccionará con hierro que hay en el medio y dará un precipitado negro. La no aparición del precipitado se dará como resultado negativo.

URE: Se estudia si la bacteria tiene ureasa. Su presencia se demostrará por la aparición de un color rojo en el medio (indicador rojo fenol) debido a la hidrólisis de la urea con producción de CO_2 y amoníaco y consiguiente alcalinización del medio. El color amarillo indicará la ausencia de la enzima.

GEL: Se estudia si la bacteria puede hidrolizar la gelatina. En tal caso, la degradación de la gelatina liberará un pigmento negro que difundirá por el medio. En caso negativo, no difundirá

Utilización de azúcares: Se averigua si la bacteria utiliza diversos azúcares [glucosa (**GLU**), manosa (**MAN**), inositol (**INO**), sorbosa (**SOR**), ramnosa (**RHA**), sacarosa (**SAC**), melibiosa (**MEL**), amigdalina (**AMY**) y arabinosa (**ARA**)]. En todos los casos, en el medio hay un indicador de pH (azul de bromotimol) de tal forma que cuando la bacteria utiliza el azúcar produce ácido y baja el pH. El color amarillo indica una utilización del azúcar (positivo) y el color azul significa una reacción negativa.

Las pruebas que requieren un revelado, mediante la adición de ciertos reactivos para su prueba son:

TDA: Si la bacteria tiene triptófano desaminasa, transformará el triptófano en indolpirúvico y amoniaco. Una vez crecida la bacteria, se añadirá cloruro férrico, caso de que haya ácido indolpirúvico aparecerá una coloración pardo-rojiza. Si el color es amarillo o anaranjado, la prueba será negativa.

IND: Se estudia si la bacteria degrada el triptófano con la producción de indol, ácido pirúvico y amoniaco. Una vez esté crecida la bacteria se añadirá reactivo de Kovacs que reaccionará con el indol apareciendo un anillo rojo. Si el anillo es amarillo la prueba será negativa.

VP: Es la prueba de Voges Proskauer y consiste en determinar si la bacteria lleva a cabo una fermentación de tipo butilén-glicólica. En este caso se producirá un intermediario, la acetoína, cuya presencia se detectará por la aparición de un color rojo, tras la adición al cultivo de unas gotas de KOH y de α -naftol, debido a la producción de diacetilo. El valor negativo se corresponderá con un color amarillo (esperar 10 minutos antes de dar un valor negativo).

Reducción de nitratos. Se realiza en el pocillo de glucosa, se determina si la bacteria tiene la enzima nitrato reductasa y en consecuencia produce nitrito.

Se le añade al pocillo una gota del ácido sulfanílico y otra de alfa-naftilamina. Se espera 2-3 minutos, si es de color rojo la reacción es positiva, la bacteria tiene la enzima nitrato reductasa.

Si el tubo permanece amarillo, la prueba sería negativa, no hay nitrito en el medio, de modo que hay dos posibilidades, o bien todo el nitrato ha pasado a nitrógeno molecular de forma que tiene tanto nitrito como nitrato reductasa o por si al contrario no contiene ninguna y permanece en forma de nitrato.

Para ello se añade polvo de zinc que reduce químicamente de nitrato a nitrito. Si tras esperar 10, el pocillo sigue amarillo hay una reacción positiva hay nitrógeno molecular, si el pocillo pasa a rojo, la prueba es negativa, es el zinc el que ha producido la reacción no la bacteria por la presencia de las enzimas (Figura 20).

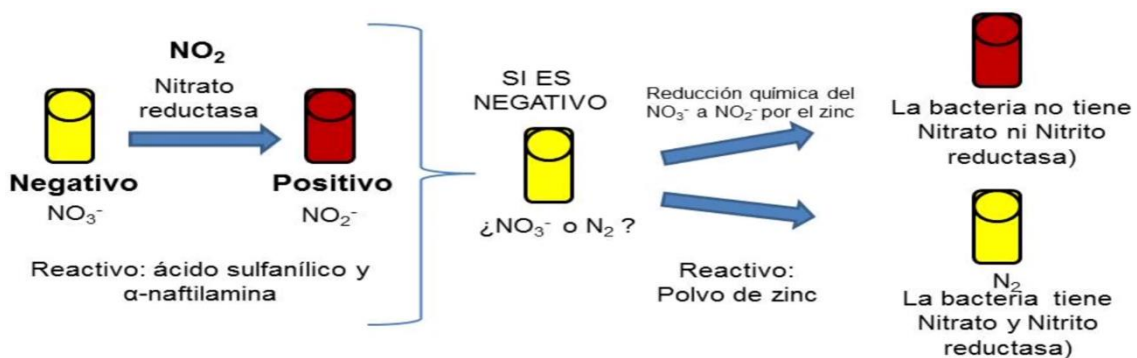


Figura 20. Prueba de reducción de nitratos

La interpretación de los resultados se basa en la observación de las coloraciones desarrolladas, mediante la comparación del color obtenido en cada microtubo con el que muestra la carta de colores.

La identificación de la bacteria de interés es obtenida mediante un perfil numérico que se genera de la siguiente manera:

Los tubos se ordenan en tripletes (Figura 21) en los que tienen valores de 1, 2 y 4. Para cada triplete de pruebas tendremos un dígito resultante de la suma de los valores de los tubos en los que se ha obtenido un resultado positivo, de modo que este valor oscilará entre 0 (todas las pruebas negativas) y 7 (todas las pruebas positivas). Se obtiene así un número de 7 dígitos (en el séptimo se cuentan los dos últimos tubos y la prueba de la oxidasa) que, utilizándose un

libro de claves, nos indicará a qué especie bacteriana pertenece la bacteria, así como la calidad de la determinación.

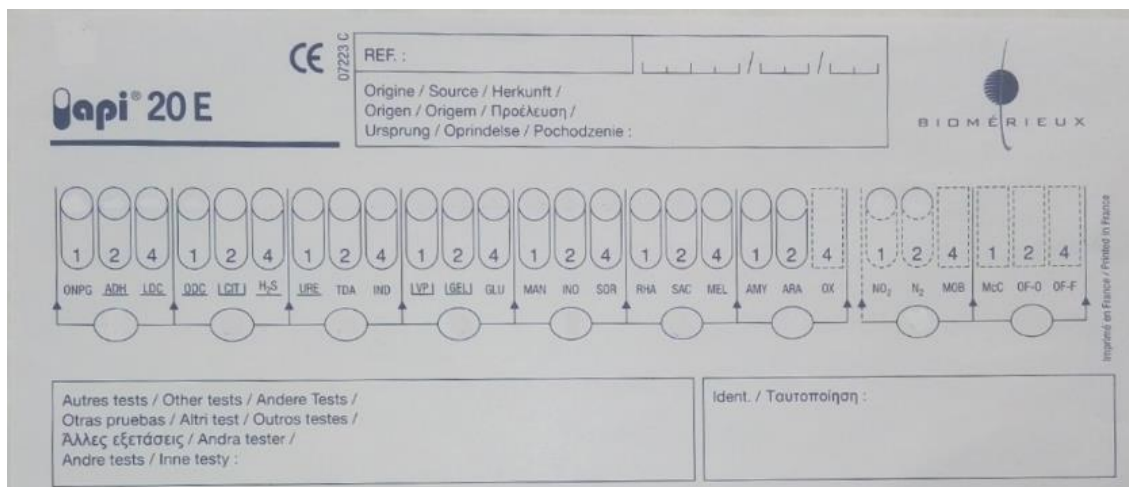


Figura 21. Ficha identificadora para API 20E.

2.2.3 Estudio microbiológico durante las etapas de elaboración de la conserva del pimiento: cortado, escaldado y envasado.

- Cortado del pimiento. Se tomaron diferentes piezas de pimientos que se colocaron en un frasco de cristal previamente esterilizado y se llevaron al departamento de Microbiología donde se realizó el estudio microbiológico en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar [14].

Para la toma de muestras se trituraron las piezas de pimientos en un mortero estéril. A continuación, se sembraron en césped dos placas de agar nutritivo a pH=4,6 y pH=7 con 200 µl del pimiento triturado cada una y se incubaron durante 24 horas a 37°C. El empleo de estos valores de pH, se debe a que interesaba conocer la presencia de microorganismos neutrófilos y acidófilos.

- Escalado. Se tomaron diferentes piezas de pimiento durante la etapa de escalado que se trituraron y se siguió el mismo procedimiento que el punto anterior.
- Envasado. Muestras del líquido de gobierno empleado en el proceso, en nuestro caso es el mismo que se empleó durante el escalado. Se tomaron 100 ml que se depositaron en un bote estéril y se llevaron al departamento de Microbiología, donde se realizó el estudio microbiológico. Se sembraron en césped dos placas de agar nutritivo a pH=4,6 y pH=7 con 0.2 µl del líquido de gobierno cada una y se incubaron durante 24 horas a 37°C.

2.3 Estudio de la estabilidad microbiológica en la conserva de pimiento una vez abierta.

Para determinar la estabilidad microbiológica de la conserva de pimiento, los botes de pimiento se abrieron a las tres semanas de haber elaborado la conserva. El estudio se realizó utilizando dos métodos diferentes:

1. Recuento en placa para determinar el número de microorganismos presentes.
Los botes tratados con las diferentes condiciones de appertización 100°C y 95°C durante 5, 10, 20 y 50 minutos, tras transcurrir 3 semanas fueron abiertos. Se cogieron 100 µl del líquido de gobierno de cada uno de los botes y se realizó una siembra en césped a pH=7 en placas de agar nutritivo que se incubaron durante 24 horas a 37°C.
Al cabo de las 24 horas se hizo el recuento del número de colonias bacterianas que se expresó como UFC/ ml, que consiste en multiplicar el número de colonias observadas por el factor de dilución empleado.

En aquellos casos en los que hubo un crecimiento bacteriano muy alto que imposibilitara el recuento, se procedió a la realización de diluciones seriadas. Se procede a elaborar una dilución formada con 900 μl de agua destilada y 100 μl con la solución que contiene las colonias bacterianas. Esta suspensión se le conoce como la primera dilución (10^{-1}). A partir de esta dilución, se preparan diluciones en serie (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}).

La segunda dilución (10^{-2}) se obtiene transfiriendo con una pipeta estéril 100 μl de la primera dilución a un tubo que contiene 900 μl de agua destilada estéril (Figura 22). Esta operación se repite varias veces hasta lograr obtener una serie de diluciones (10^{-1} hasta el número de dilución de interés).

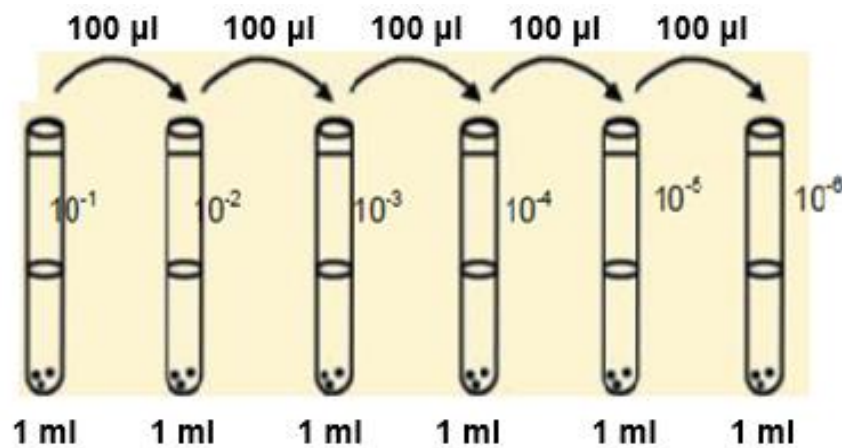


Figura 22. Diluciones bacterianas.

Estos botes se abrieron sin mantener las condiciones de esterilidad para simular la manipulación normal de una conserva por el consumidor. Una vez abiertos los botes, se cerraron y se mantuvieron en el frigorífico a 4°C durante el resto de la experimentación. Solamente se abrieron para recoger muestras, con la finalidad de determinar el tiempo de inocuidad microbiana de la conserva simulando condiciones normales de consumo.

2. Medida de la densidad óptica.

Este estudio se realizó en paralelo con el apartado anterior. Una vez abierto los botes se cogió 1 ml del líquido de gobierno, de cada uno de los botes tratados en las diferentes condiciones de apertización. Este líquido de

gobierno se hizo pasar por un filtro estéril (Figura 23) para eliminar posibles fragmentos de pimientos que pudieran interferir en la posible medida de la densidad óptica. Esta medida se realizó con ayuda de un espectrofotómetro, empleando como blanco, el líquido de gobierno estéril.



Figura 23. Bote estéril con los filtros de papel envueltos en papel de plata.

Este es un procedimiento que se realizó de forma regular cada cierto tiempo para conocer la situación de la carga microbiana en la conserva una vez abierta. Las conservas de pimiento se conservaron en el frigorífico como se indicó en el anterior punto.

Este estudio nos permitió determinar el tiempo de inocuidad de la conserva una vez abierta, así como representar la curva de crecimiento microbiano de la conserva.

3. RESULTADOS y DISCUCIÓN

3.1 Elaboración de una conserva de pimiento en su jugo

Este estudio se realizó en el departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química.

El balance de materia se realizó para determinar la cantidad en gramos de pimientos rojos necesario para llevar a cabo el proceso de elaboración de conservas de pimientos.

Considerando que se envasaran 17 botes, junto con el hecho de que el pimiento tiene un rendimiento de un 40%, datos establecidos por el BEDCA [20], se realizó el siguiente cálculo:

$$140 \times 17 \times 100 / 40 = \mathbf{5950g}$$
 de pimientos rojos.

Serán necesarios 5950 gramos de pimientos para la preparación de la conserva y los estudios microbiológicos.

Los botes contienen un volumen en torno a los 212ml., como se observa en la figura 24.



Figura 24. Botes para el envasado

Los valores de pH y grados brix del pimiento que se tomaron durante el proceso de elaboración de las conservas en las etapas de cortado, escaldado y envasado (Figura 25 y 26) se pueden observar en la tabla 6. Estas etapas corresponden con las mismas etapas a las cuales se les realizó el estudio microbiológico.

Tabla 6. Medias de valores de pH y grados brix

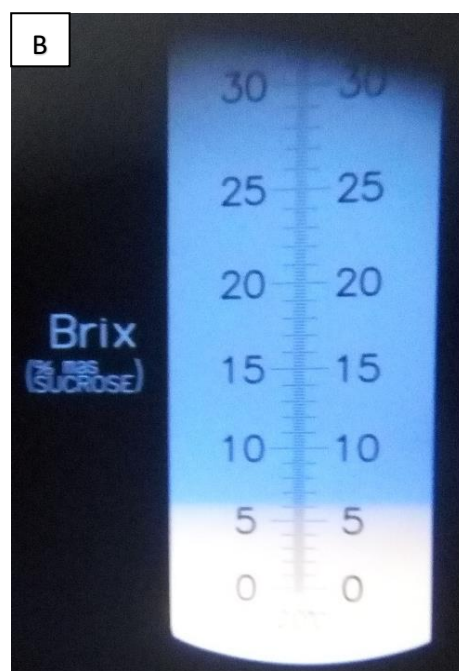
Medidas	pH	Grados brix
Cortado	5,2	6
Escaldado	4,9	3,1
Envasado (líquido de gobierno)	3,1	-

Se observa una disminución de la materia seca soluble (grados brix) debido al efecto de la dilución en el agua y ácido cítrico. En cambio, el pH se mantiene casi igual debido a que no ha habido tiempo para que se produzca un equilibrio en el pH, entre el líquido de gobierno y las piezas de pimiento.

La media del líquido de gobierno corresponde a una disolución de agua con ácido cítrico, que se envasó a más de 80° C.



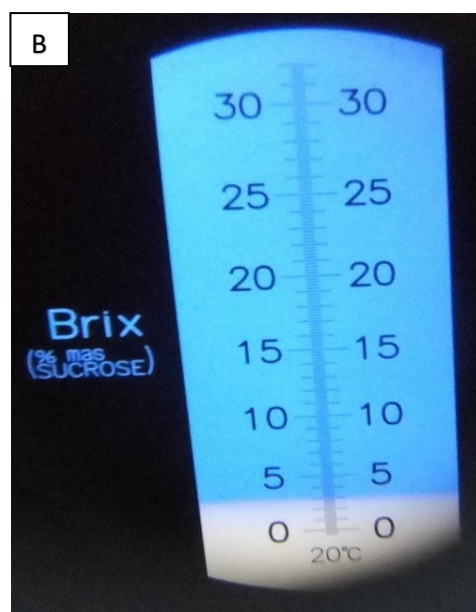
Figura 25. A. pH etapa de cortado



B. grados brix etapa de cortado



Figura 26. A. pH etapa de escaldado



B. grados brix etapa de escaldado

Caracterización de los botes tras finalizar el periodo de almacenamiento técnico de 3 semanas (para que se produzcan los equilibrios químicos)

Para la caracterización de la conserva (conforme a la Orden del 21 de noviembre de 1984) se vació la conserva, sobre un embudo colador con una luz de malla de 5mm durante 2 minutos, pesando las piezas de pimiento, obteniéndose el peso escurrido (PE). El peso neto se calcula por diferencia con la tara del tarro más la tapa. Se midió el pH y los °Brix del líquido de gobierno y del producto homogeneizado (líquido de gobierno y piezas de pimiento). Los datos recogidos de la caracterización se recogen en la tabla 7 y 8:

Tabla 7: Caracterización de las conservas con proceso térmico a 95°C

Botes	Peso Bruto(g) (peso de toda la conserva)	Peso tarro + tapa	Peso neto (g) (peso pimiento+ líquido de gobierno)	Peso escurrido (g) (peso pimiento)	Líquido de Gobierno		Producto final homogeneizado	
					pH	°Brix	pH	°Brix
5´	343	152,64	190,36	164,04	4,6	3	4,6	3
10´	350,61	153,27	197,34	163,64	4,5	2,9	4,5	2,9
20´	349,66	154,22	195,44	162,96	4,5	2,9	4,5	2,9
50´	350,94	154,81	196,13	158,38	4,6	2,9	4,6	2,9

Tabla 8: Caracterización de las conservas con proceso térmico a 100°C

Botes	Peso Bruto(g) (peso de toda la conserva)	Peso tarro + tapa	Peso neto(g) (peso pimiento+ liquido de gobierno)	Peso escurrido (g) (peso pimiento)	Líquido de Gobierno		Producto final homogeneizado	
					pH	°Brix	pH	°Brix
5´	354,5	154,4	200,1	161,63	4,5	2,8	4,5	2,8
10´	351,97	154,17	197,8	168,82	4,5	2,9	4,5	2,9
20´	350,68	155,21	195,47	162,2	4,5	2,8	4,5	2,8
50´	348,42	154,6	193,82	154,68	4,5	2,9	4,5	2,9

A partir de los resultados obtenidos, se observa que el peso neto de nuestra conserva cumple con el valor mínimo presentando valores desde 190.36 gramos y un máximo de 200,1 gramos, superando el mínimo permitido de 185 gramos.

El valor del peso escurrido también es superior al mínimo permitido (125 gramos) con un valor mínimo de 154.68 gramos y un valor máximo de 168.82.

Se observa cómo el valor del pH del pimiento inicial que era de 5.2, una vez equilibrado con el líquido de gobierno ha conseguido reducir sus valores. El valor máximo corresponde con 4.6, que es el valor máximo exigido por BOE nº44 de 11/02/1987, para el proceso de esterilización térmica que no impliquen el uso de autoclaves ($T \leq 100^\circ \text{C}$), para evitar el crecimiento del *Clostridium botulinum*, que crece con valores de pH superiores y es perjudicial para el consumidor por la producción de una neurotoxina [11]

Los grados brix se han reducido a la mitad, desde los 6.1 inicial pimiento a entorno 2,9-3, debido al escaldado producido y a la estabilización con el líquido de gobierno, esto se traduce en una menor cantidad de materia seca soluble en la hortaliza que puede ser medio de crecimiento para microorganismos.

Los valores de pH y grados Brix del producto homogeneizado fueron los mismos que el del líquido de gobierno.

Con todos estos datos podemos decir que esta conserva se encuentra apta para su comercialización. El equilibrio se alcanza ya que el pH y los grados Brix del líquido de gobierno y del producto final que es el producto homogeneizado, son iguales.

3.2 Estudio microbiológico

Se realizarán diversos estudios mediante el empleo de medios diferenciales (MacConkey y TSI) y pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos presentes en la superficie del pimiento (VPRM y API 20E).

3.2.1 Identificación de microorganismos presentes en la superficie del pimiento

Se recogieron las muestras de la superficie del pimiento utilizando 3 métodos diferentes, detallado previamente en material y métodos:

- a) Recogida de muestras con un bastoncillo en agua estéril
- b) Recogida de muestras con un bastoncillo húmedo y posterior resuspensión.
- c) Recogida de la muestra del lavado completo del pimiento en agua estéril.

En los tres casos las muestras obtenidas se sembraron en césped en placas con agar nutritivo (pH=4.6 y pH=7) y se incubaron durante 24 horas a 37°C.

Con el primer método, se observó crecimiento en ambas placas, tanto en la placa de pH=7 como en la placa de pH=4.6 (Figura 27).

- A pH 7 se observa el crecimiento de una bacteria con morfología rugosa que llamaremos A y una bacteria más pequeña (Figura 27. Flecha).
- A pH 4.6 se observa el crecimiento de un hongo.

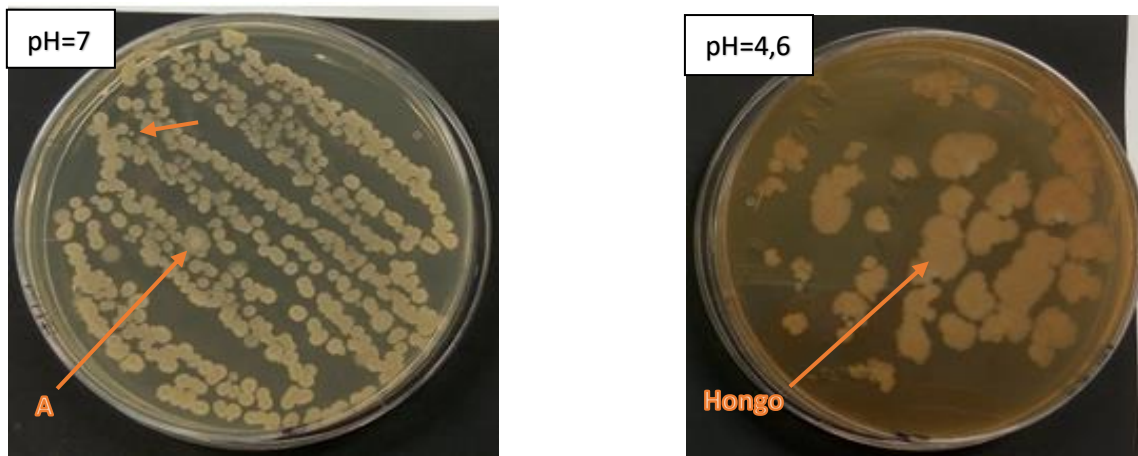


Figura 27. Crecimiento en placa de agar nutritivo mediante el primer método. Flecha: bacteria más pequeña.

Con el segundo método, Se observó crecimiento en ambas placas tanto a pH=7 como a pH=4.6. Se observa un mayor crecimiento que con el método primero debido a que se resuspendió la muestra en el resto de agua que quedó en el eppendorf. (Figura 28).

- A pH=7 se observa la bacteria A de forma irregular con un color más denso y otra bacteria más pequeña que está en mayor cantidad.
- Al igual que antes se observa el crecimiento de un hongo a pH=4.6.

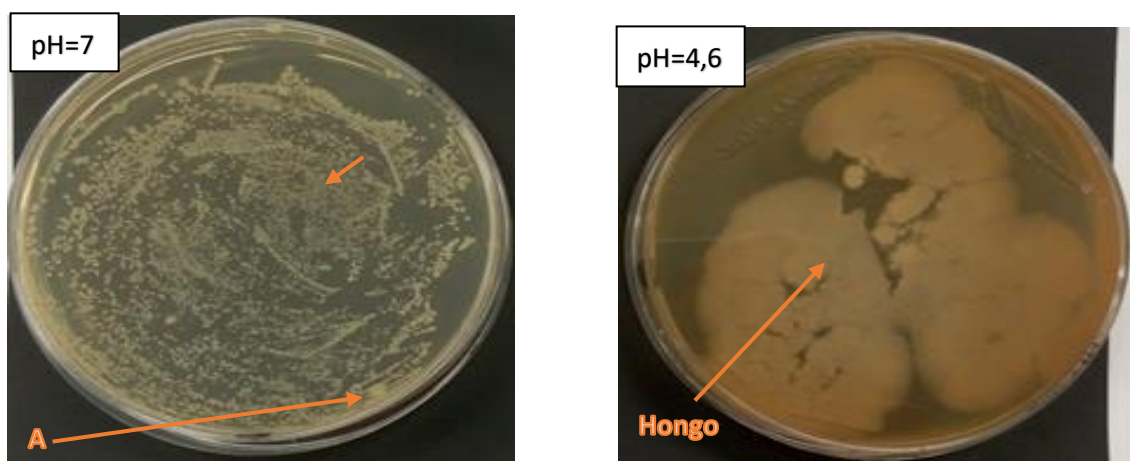


Figura 28. Crecimiento en placa de agar nutritivo mediante el segundo método. Flecha: bacteria más pequeña.

Con el tercer método, se observó crecimiento en ambas placas, con una mayor diversidad microbiana y más diferenciada (Figura 29), en gran parte debido a que se sometió al pimiento a un lavado completo.

➤ A pH=7 se pueden observar 4 tipos de bacterias:

- Una bacteria con forma de rugosa, similar a la observada previamente que hemos considerado como A.
- Una bacteria de morfología difusa, que denominaremos B.
- Una bacteria de tamaño mediano, que denominaremos C.
- Una bacteria de tamaño más pequeño, que denominaremos D.

➤ A pH=4.6 se observan dos tipos de bacterias:

- Una bacteria que denominaremos E.
- Una bacteria que consideramos bacteria F de tamaño pequeño y redondeado

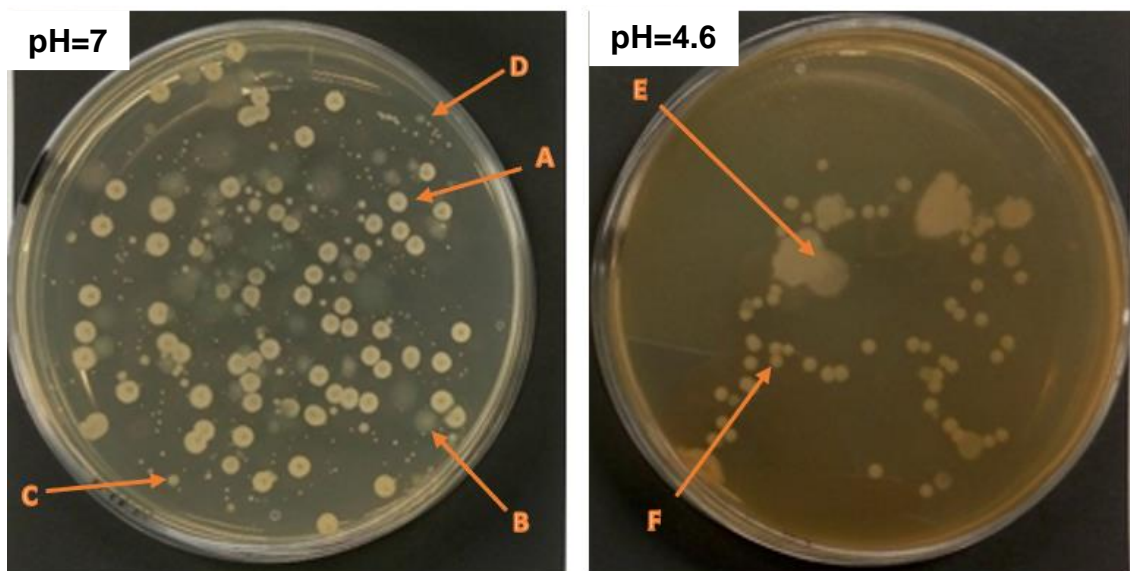


Figura 29. Crecimiento en agar nutritivo procedente del lavado del pimiento. pH=7: Bacterias: A, B, C, D. pH=4.6: Bacterias E y F.

Por lo tanto, podemos concluir que en la superficie del pimiento se ha detectado la presencia de microorganismos neutrófilos que crecen a pH=7 y acidófilos a pH=4.6

Al observar en la lupa, el crecimiento en placa a pH=7 procedente del agua de lavado, se pueden apreciar las 4 bacterias mencionadas de forma más detallada (Figura 30).

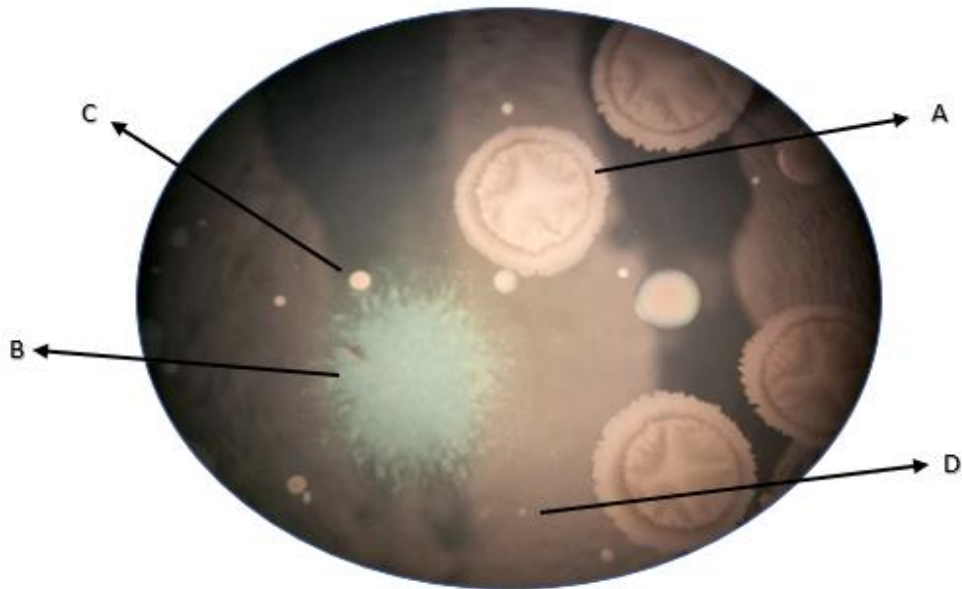


Figura 30. Observación con lupa de las bacterias del lavado a pH=7

Como se puede apreciar en la figura 30, hay una gran diversidad de microorganismos presentes en la superficie del pimiento. Se observan colonias morfológicamente diferentes, con bordes irregulares y otros con bordes regulares. Respecto al color y el tamaño también hay una gran diversidad de colonias.

Para determinar si los microorganismos aislados de la superficie del pimiento, a los que hemos denominado A, B, C, D, E y F eran bacterias grampositivas o gramnegativas se les realizó la tinción de Gram (Figuras 31-36). Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Olympus BX6 del CITIUS.

Se estableció la presencia de las siguientes bacterias:

A pH=7 se puede observar 4 tipos de bacterias:

- Bacteria A
- Bacteria B
- Bacteria C
- Bacteria D

A pH=4.6 se observa dos tipos de bacterias:

- Bacteria E
- Bacteria F

Bacteria A

Bacilos grampositivos obtenidos del lavado (Figura 31). Esta bacteria crece en medio de agar nutritivo (pH=7), por lo tanto, es neutrófila. Presenta aspecto rugoso con bordes redondeados en forma de cráter (Figura 30). En la figura 31, se pueden observar restos más decolorados debido a que la tinción de Gram, con el tiempo puede decolorarse un poco debido a la pérdida de color del cristal violeta.

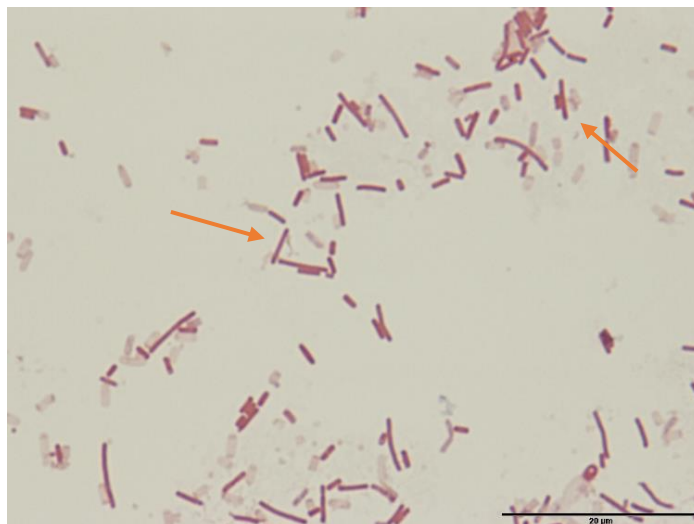


Figura 31. Tinción de Gram. Bacteria A (grampositiva). Flechas

Bacteria B

Bacilos gramnegativos, obtenidos del lavado (Figura 32). Esta bacteria crece en medio de agar nutritivo (pH=7), por lo tanto, es neutrófila. Presenta aspecto difuso, color celeste y borde irregular

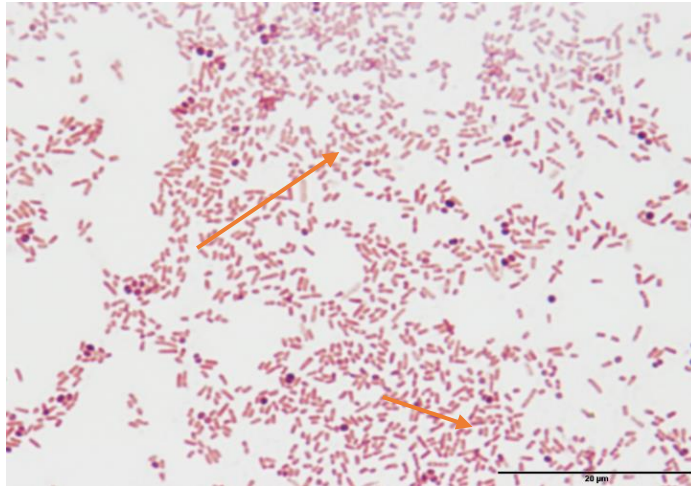


Figura 32. Tinción de Gram. Bacteria B (grampositiva). Flechas

Bacteria C

Cocos grampositivos, normalmente estafilococos obtenidos del lavado (Figura 33). Esta bacteria crece en medio de agar nutritivo (pH=7), por lo tanto, es neutrófila. Presenta borde uniforme y redondeado.

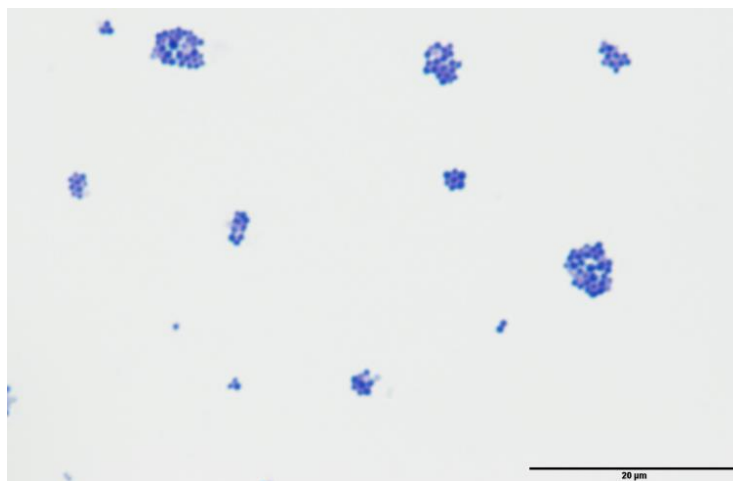


Figura 33. Tinción de Gram. Bacteria C (grampositiva).

Bacteria D

Cocos grampositivos, normalmente estafilococos obtenidos del lavado (Figura 34). Esta bacteria crece en medio de agar nutritivo (pH=7), por lo tanto, es neutrófila

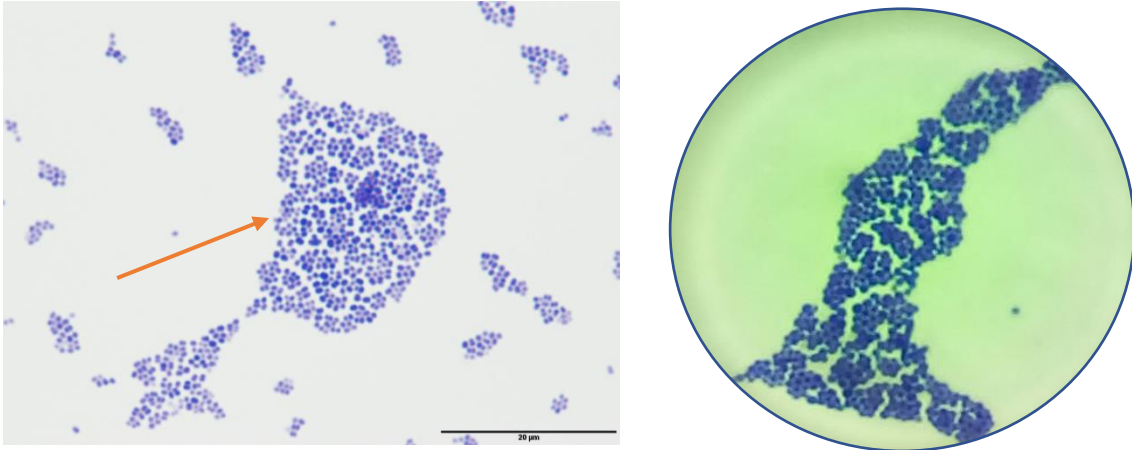


Figura 34. Tinción de Gram. Bacteria D (grampositiva). Flecha

Bacteria E

Bacilos gramnegativos, obtenidos del lavado (Figura 35). Esta bacteria crece en medio de agar nutritivo (pH=4,6), por lo tanto, es acidófila. Presenta bordes redondeados.

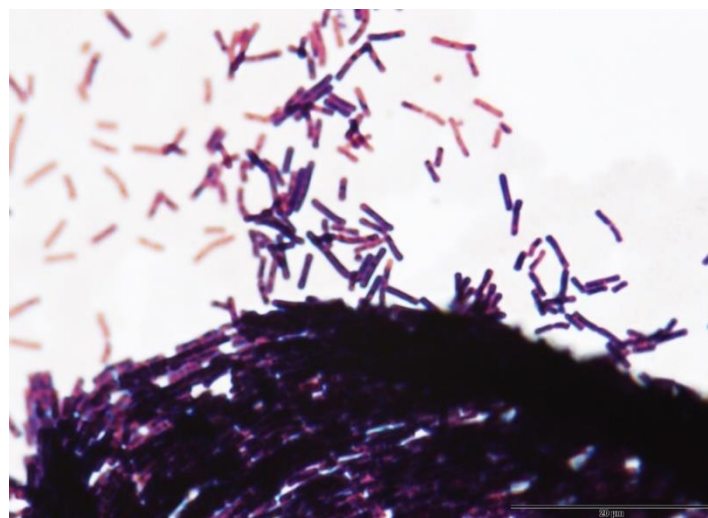


Figura 35. Tinción de Gram. Bacteria E (grampositiva)

Bacteria F

Bacilo-cocos gramnegativos, obtenidos del lavado (Figura 36). Esta bacteria crece en medio de agar nutritivo (pH=4,6), por lo tanto, es acidófila.

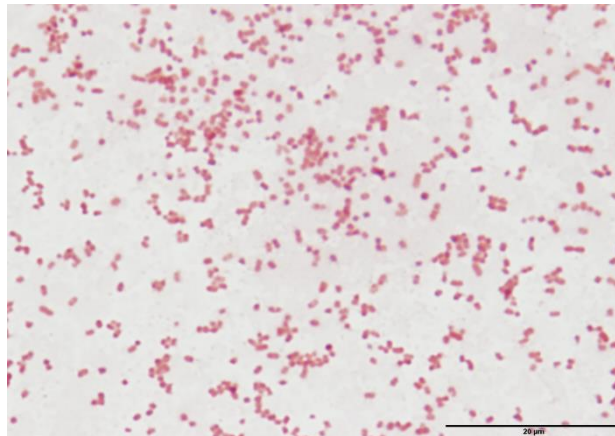


Figura 36. Tinción de Gram. Bacteria F (gramnegativa).

Las pruebas realizadas para la identificación de bacterias coliformes y enterococos fecales [6] a partir del agua de lavado, fueron las siguientes:

- Identificación de bacterias coliformes:

-Prueba presuntiva. Para esta prueba se utilizaron 9 tubos que contenían como medio caldo lactosado, con púrpura de bromocresol (indicador de pH) y campana de Durham. Este medio presenta una coloración morada. Tres de estos tubos contenían doble concentración (2x), los cuales fueron inoculados con 10 ml del agua de lavado. Los otros 6 tubos restantes, con concentración sencilla (1x) fueron inoculados, tres de ellos con 1 ml de agua de lavado y otros 3 con 100 μ l. Se dejaron incubando a 37°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación hay que observar si hubo producción de gas en la campana de Durham y si el medio había tomado un color amarillo, en ese caso sería positivo. La ausencia de color y gas en los tubos sería negativa la prueba.

Tras la incubación de 24 horas, se observó crecimiento en todos los tubos, ya que presentaban turbidez, coloración amarilla y presencia de gas (Figura 37). A continuación, se procedió a realizar las pruebas confirmativas.

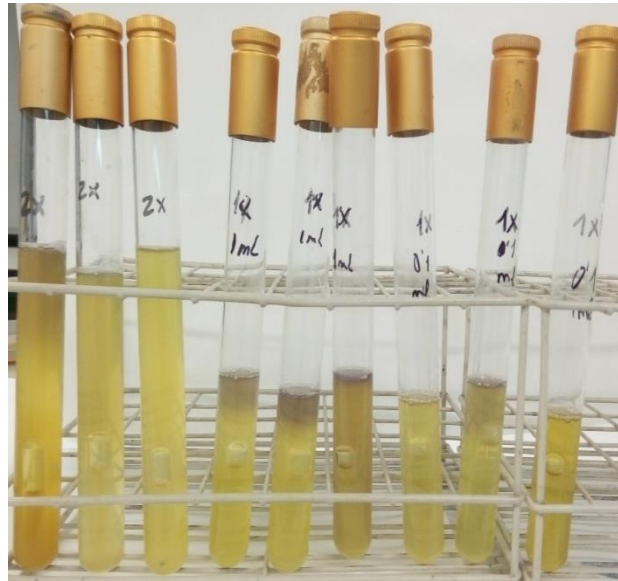


Figura 37. Prueba presuntiva para bacterias coliformes.

-Prueba confirmativa. A partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva para coliformes, se inocularon 100 μ l en los tubos con caldo de bilis lactosa verde brillante (BLVB) y campana de Durham como se muestra en la figura 17. Se incubaron a 37°C y se examinaron a las 24-48 horas.

Tras la incubación de 24 horas, se observó crecimiento en todos los tubos, ya que presentaban turbidez y gas (Figura 38A). Al comparar un tubo sin inocular (control) con uno inoculado (Figura 38B), se puede apreciar con más detalle la turbidez y la presencia de gas, por lo tanto, se puede confirmar la presencia de coliformes en la superficie del pimiento

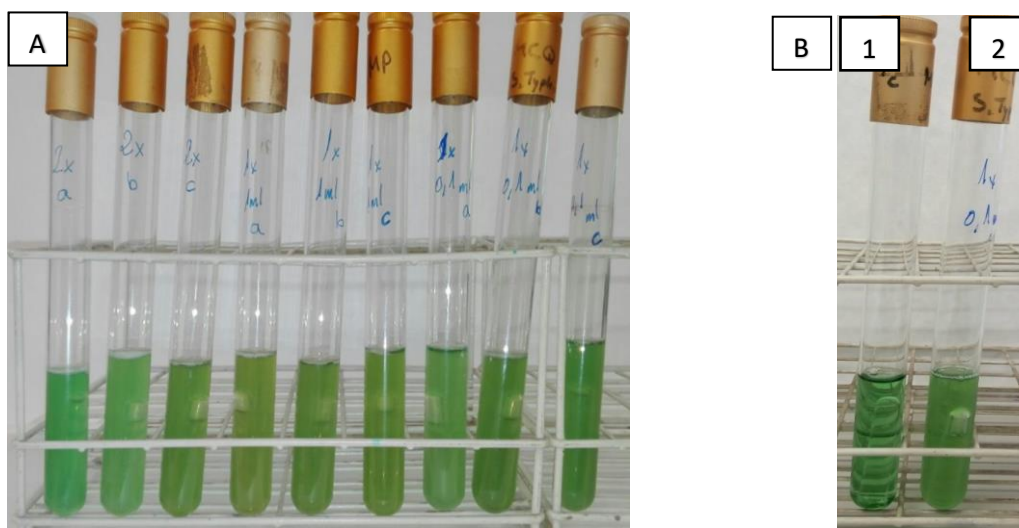


Figura 38. Prueba confirmativa para bacterias coliformes.

A. Crecimiento y gas en todos los tubos. B. Tubo inoculado (1). Tubo sin inocular (2, control)

Si observamos la tabla 9, para la obtención del número más probable NMP/100 ml [5] podemos deducir que al ser positivo los 9 tubos, se establece con un intervalo de confianza del 95%, el índice número más probable (NMP/100 ml) mayor a 2400.

Tabla 9. Tabla para la obtención del número más probable (NMP) [5]

Número de tubos que dan reacción positiva			Límite de confianza del 95%		
3 tubos de 10 ml	3 tubos de 1 ml	3 tubos de 0,1 ml	NMP _{/100ml}	Límite inferior	Límite superior
0	0	1	3	< 0,5	9
0	1	0	3	< 0,5	13
1	0	0	4	< 0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	36
2	1	0	15	3	37
2	1	1	20	7	44
2	2	0	21	4	89
2	2	1	28	10	47
3	0	0	23	4	149
3	0	1	39	7	120
3	0	2	64	15	130
3	1	0	43	7	379
3	1	1	75	14	210
3	1	2	120	30	230
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1.300
3	3	1	460	71	2.400
3	3	2	1.100	150	4.800
3	3	3	> 2.400	—	—

- Identificación de enterococos:

-Prueba presuntiva. Para esta prueba se utilizaron 9 tubos que contenían como medio caldo de azida de Rothe. Este medio tiene coloración amarilla. Tres de estos tubos contenían doble concentración (2x), los cuales fueron inoculados con 10 ml del agua de lavado. Los otros 6 tubos restantes, con concentración sencilla (1x) fueron inoculados, tres de ellos con 1 ml de agua de lavado y otros 3 con 100 µl. Se dejaron incubando a 37°C durante 24 horas. Se consideran positivos aquellos tubos que presenten turbidez.

Tras la incubación de 24 horas todos los tubos, presentaban turbidez (Figura 39A). Existía un mayor crecimiento en los tubos con doble concentración de medio.

Si se compara un tubo sin inocular que se considere como control, con uno sin inocular (Figura 39B), se aprecia con más detalle la turbidez. Considerando esta prueba positiva

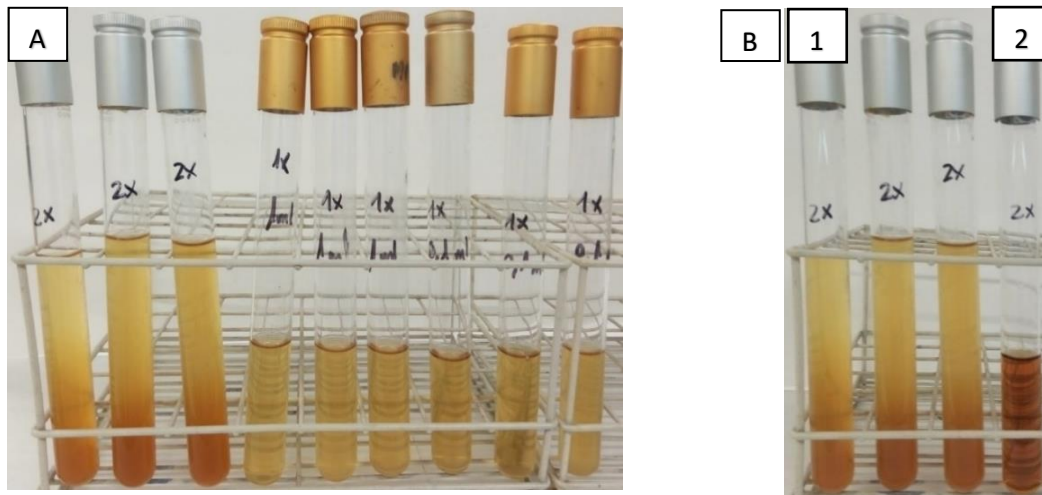


Figura 39. Prueba presuntiva para enterococos fecales.

A. Turbidez en todos los tubos. B. Tubo inoculado (1). Tubo sin inocular (2, control)

-Prueba confirmativa. Para esta prueba se realizaron tinciones de Gram a los tubos positivos de la prueba presuntiva. La presencia de cocos, diplococos y enterococos, de color violeta en todas las tinciones realizadas confirmó la presencia de enterococos fecales (Figura 40).

Si miramos la tabla 9 que nos muestra el número más probable NMP/100 ml de microorganismos. Podemos decir que al ser los 9 tubos positivos se establece con un intervalo de confianza del 95%, el índice número más probable (NMP/100 ml) mayor a 2400 (Tabla 9)

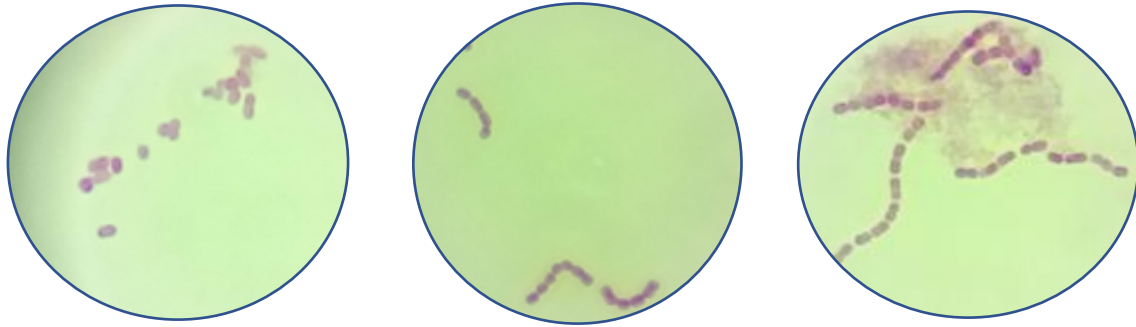


Figura 40. Prueba confirmativa para enterococos fecales. Tinción de Gram. Micrografías de cocos, diplococos y estreptococos, grampositivos.

Una vez realizadas las tinciones de Gram y las pruebas para identificación de las enterobacterias para las bacterias obtenidas del lavado del pimiento, se procedió a continuar el proceso de identificación de las bacterias B y F (al ser estas gramnegativas) mediante las pruebas de MacConkey, TSI y las pruebas bioquímicas VPRM y API 20.

Las bacterias B y F procedente del lavado del pimiento se sembraron por zonas en un medio de agar nutritivo para su aislamiento, de forma que fuera más fácil su identificación y conservación.

- Medio de MacConkey.

Es un medio selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento e identificación de enterobacterias (bacterias gramnegativas) fermentadoras y no fermentadoras de lactosa.

Si la lactosa es fermentada las colonias se observarán de color rosado. Si no fermentan lactosa las colonias se observarán amarillas.

En una placa de medio de MacConkey que se dividió en 4 cuadrantes (Figura 41), se sembraron en zigzag bacterias procedentes de las pruebas confirmativas de coliformes (cuadrante I) y de enterococos fecales (cuadrante II), así como la bacteria B (cuadrante III) y bacteria F (cuadrante 4) procedente del lavado del pimiento.

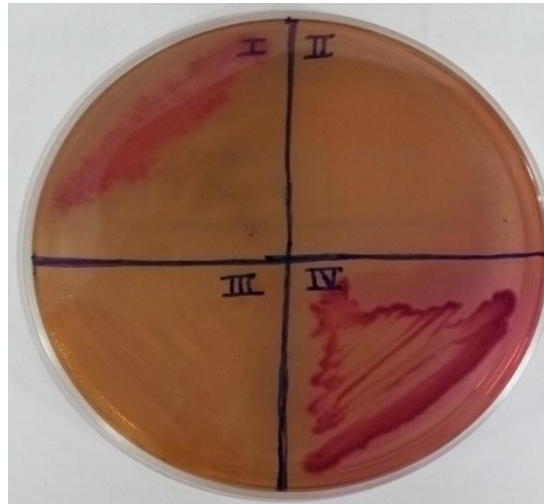


Figura 41. Crecimiento en medio de MacConkey. I) Bacterias coliformes. II) Enterococos. III) Bacteria B. IV) Bacteria F

Si se observa la figura 41 podemos apreciar crecimiento en los cuadrantes I, III y IV:

- El cuadrante I, correspondiente a las bacterias coliformes, este presenta una parte que fermenta lactosa y otra que no. Esto podríamos explicarlo porque hay un pull de bacterias pertenecientes al lavado, por lo que habría bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa.
- El cuadrante II, corresponde a la siembra de enterococos, en este no hay crecimiento, ya que son bacterias gramnegativas y este medio inhibe el crecimiento de dichas bacterias.
- El cuadrante III, corresponde a la siembra de la bacteria B, bacteria gramnegativa que no fermenta lactosa ya que presenta colonias amarillas.
- El cuadrante IV, corresponde a la siembra de la bacteria F, bacteria gramnegativa fermentadora de lactosa ya que presenta colonias de color rojo

En la **Tabla 10** se resumen los resultados obtenidos del crecimiento en medio de MacConkey para las bacterias obtenidas del lavado del pimiento, como puede apreciarse las bacterias denominadas A, C, D y E aisladas tras hacerles la tinción de Gram revelaron ser grampositivas, por esta razón no presentan crecimiento

en medio de MacConkey, ya que este medio inhibe el crecimiento de las bacterias grampositivas. Las bacterias B y F son bacterias gramnegativas, que presentan crecimiento en medio de MacConkey por lo que son enterobacterias siendo la bacteria B no fomentadora de lactosa y la bacteria F si fermentadora de lactosa.

Tabla 10. Microorganismos de la superficie del pimiento. Tinción de Gram. Crecimiento en medio de MacConkey.

Bacterias	Tinción de Gram	Crecimiento en MacConkey	Enterobacteria	Fermentación de lactosa
A	grampositiva	-	-	
B	gramnegativa	+	+	-
C	grampositiva	-	-	
D	grampositiva	-	-	
E	grampositiva	-	-	
F	gramnegativa	+	+	+

A continuación, se procedió a tratar de identificar las bacterias B y F empleando para ello el medio diferencial y selectivo TSI y las pruebas bioquímicas VPRM y API 20.

- El medio TSI se utiliza para detectar si las bacterias son capaces de fermentar de lactosa, sacarosa y/o glucosa, con formación de ácido y gas. La siembra se realizó cogiendo biomasa con una aguja, se pinchó hasta el fondo del tubo que contenía el medio TSI y se hizo un zigzag sobre la superficie del tubo. Los tubos se incubaron durante 24 horas a 37°C. La presencia de color rojo, indica que no hay consumo de azúcares (lactosa, sacarosa y/o glucosa), por lo que no se produce fermentación, si hay color amarillo, el pH baja y existe fermentación de azúcares.

- La prueba VPRM (Voges Proskauer-Rojo de Metilo), se utiliza para determinar si las bacterias son capaces de realizar una fermentación vía ácido mixta o la vía butilenglicólica. La siembra se realizó tomando biomasa bacteriana con un asa y agitando el tubo que contiene el caldo VPRM. Se dejó incubar durante 24 horas a 37°C. Para su lectura, se le añadió unas gotas de rojo de metilo. Una coloración roja, indicadora de la presencia de ácidos provenientes de la fermentación de la glucosa, constituye un resultado positivo, indicando que se produce una fermentación ácido mixta. Una coloración amarilla constituye una reacción negativa, indicando que se produce una fermentación butilenglicólica.

La bacteria B, presenta un color rojo en el medio TSI tras su inoculación e incubación a 37°C durante 24 horas (Figura 42B), de forma que nos indica que no fermenta azúcares, coincidiendo este dato con el obtenido en el medio de MacConkey que no fermenta lactosa.

La prueba bioquímica VPRM para la bacteria B, presenta un color amarillo tras la adición de rojo de metilo (Figura 42A), lo que nos informa que tiene fermentación butilenglicólica.

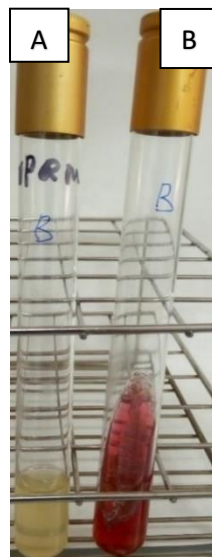


Figura 42. Bacteria B obtenida del lavado del pimiento. A. Prueba VPRM
B. Prueba TSI

La bacteria F, presenta una coloración amarilla en el medio TSI tras su inoculación e incubación a 37°C durante 24 horas (Figura 43A). Esto nos indica que puede fermentar azúcares como lactosa, glucosa y sacarosa.

La prueba bioquímica VPRM para la bacteria F, presenta un color amarillo tras la adición de rojo de metilo (Figura 43B), lo que nos informa que realiza fermentación butilenglicólica.



Figura 43. Bacteria B obtenida del lavado del pimiento. A. Prueba TSI. B. Prueba VPRM

- La prueba API 20E, Se emplea para la identificación de enterobacterias. Se realizaron 20 pruebas bioquímicas distintas a partir de las cuales se identificaron las bacterias B y F. Para realizar la prueba del API 20E, se cogió la colonia bacteriana y se resuspendió en 5 ml de agua estéril y seguidamente se agitó con ayuda de un agitador vórtex. Antes de inocular la galería, se llenaron con agua los alveolos para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación. En cada tubo se pueden diferenciar dos partes: el tubo en sí y la cúpula. Todos los tubos se llenan sólo hasta la base de la cúpula con las siguientes excepciones: en los llamados VP, GEL y CIT la suspensión bacteriana también se añade a la cúpula. En el caso de los tubos ADH, LDC, ODC, H₂S y URE, la cúpula se rellena con parafina líquida para conseguir condiciones anóxicas en el tubo. A continuación, se Incubó a 37 °C durante 24 horas.

Se pueden realizar 20 pruebas bioquímicas distintas, algunas de ellas son de lectura directa tras la inoculación en la galería y la posterior incubación durante 24 horas a 37°C. Sin embargo, para la lectura de otras pruebas es necesario añadir una serie de reactivos, como se indica en material y métodos.

La interpretación de los resultados se basa en la observación de las coloraciones desarrolladas, mediante la comparación del color obtenido en cada microtubo con el que muestra la carta de colores.

La identificación de la bacteria de interés es obtenida mediante un perfil numérico que, mediante un libro de claves, nos indicará a qué especie bacteriana pertenece la bacteria.

Los resultados de las pruebas bioquímicas del API 20E para la **bacteria B** tras la inoculación de la galería Api 20E y la incubación durante 24 horas a 37°C se muestran en la figura 44.



Figura 44. Prueba del API 20E para la bacteria B tras añadir los reactivos.

A continuación, se detallará el resultado de cada una de las pruebas realizadas en el API 20E para la bacteria B. Estableciendo como reacciones positivas las escritas en color rojo (Tabla 11).

Tabla 11. Tabla de resultados para el API 20E para la bacteria B

PRUEBA	REACCIÓN / ENZIMAS	NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	beta-galactosidasa	sin color	amarillo
ADH	arginina deshidrolasa	amarillo	rojo o naranja
LDC	lisina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
ODC	ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
CIT	utilización del citrato	verde	azul oscuro o turquesa
H ₂ S	producción de H ₂ S	sin precipitado negro	precipitado negro
URE	ureasa	amarillo	rojo o naranja
TDA	triptófano desaminasa	amarillo	marrón-rojo
IND	producción de indol	amarillo	color rosa o anillo rosa-rojo
VP	producción de acetoina (Voges-Proskauer)	sin color	rosa-rojo
GEL	gelatinasa	sin difusión	difusión de pigmento
GLU	fermentación/oxidación de glucosa	azul o verde	Amarillo
MAN	fermentación/oxidación de manitol	azul o verde	Amarillo
INO	fermentación/oxidación de inositol	azul o verde	Amarillo
SOR	fermentación/oxidación de sorbitol	azul o verde	Amarillo
RHA	fermentación/oxidación de ramnosa	azul o verde	Amarillo
SAC	fermentación/oxidación de sacarosa	azul o verde	Amarillo
MEL	fermentación/oxidación de melobiosa	azul o verde	Amarillo
AMY	fermentación/oxidación de amigdalina	azul o verde	Amarillo
ARA	fermentación/oxidación de arabinosa	azul o verde	Amarillo
OX	citocromo oxidasa		

La prueba del nitrato se realizó en el pocillo de la glucosa, para determinar si esta bacteria presenta nitrato y/o nitrito reductasa. Tras la adición del reactivo, ácido sulfaníico y alfa-naftilamina la prueba fue negativa dando color amarillo, indicando que no había nitrato reductasa. Para conocer si la bacteria tenía nitrito reductasa o carecía de las dos enzimas se le añadió polvo de zinc. Después de 10 minutos se hizo la lectura y la prueba dio negativa, indicando que la bacteria no presenta tampoco nitrito reductasa (Figura 45A).

Una vez obtenido el código de identificación tras realizar las pruebas bioquímicas del API 20E (Figura 45A) se puede determinar la especie o el género de la bacteria. Para ello, se comparó el código obtenido con la guía de identificación de la galería API 20E (Figura 45B), según esta guía podría tratarse con una mayor probabilidad de identificación a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

A

api® 20E

CE 07223 C

REF: _____

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie: **Bacteria B**

BIOMÉRIEUX

1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
ONPG	ADH	LDC	SDC	LDH	H ₂ S	URE	TDA	IND	VPZ	LGEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	APA	OX	NO ₂	N ₂	MDB	MCC	OF-O	OF-F												
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
2			2			0			6			0			0			2																				

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

B

2 206 002	GOOD LIKELIHOOD BUT LOW SELECTIVITY IDENTIFICATION, SEC NOTE 3.
CDC GROUP V E=1	1/ 427. [ONPG 86.5][GEL 13.5]
PS. AERUGINOSA	1/ 2335. [AHA 10.9][OXI 98.6]
CHROMOBACTERIUM	1/682627. [AHA 0.0][OXI 95.8]

Figura 45. Identificación de la bacteria B.

A. Código obtenido de la prueba del API 20E. B. Guía de identificación para API 20E (Biomérieux)

Comparando los resultados de las pruebas realizadas MacConkey, TSI, VPRM y API 20E para la bacteria B (Tabla 12), podemos concluir que:

- La prueba VPRM presenta un color amarillo (Figura 42A), que nos informa que tiene fermentación butilenglicólica.
- La prueba TSI se observa de un color rojo (Figura 42B), de forma que nos indica que no fermenta azúcares lactosa, sacarosa y/o glucosa.

- El medio de MacConkey, presenta un color amarillo (Figura 41 III), lo que nos indica que no fermenta lactosa.
- La prueba del API 20E, nos indica que fermenta glucosa y arabinosa, aunque no fermentan el resto de azúcares.

El hecho de que se observe la fermentación de glucosa en la prueba del API 20E y no en la prueba TSI, nos hace indicar que sería necesario repetir esta prueba

Tabla 12. Resultados obtenidos de la bacteria B en las pruebas realizadas

	PH	COLOR	FERMENTACIÓN
MACCONKEY	Básico	Amarillo	No fermenta lactosa
TSI	Ácido	Rojo	No fermenta azúcares
VPRM	Ácido	Amarillo	Fermentación butilenglicólica
API 20E	-	Amarillo	Fermenta glucosa y arabinosa

Los resultados de las pruebas bioquímicas del API 20E para la **bacteria F** se muestran en la figura 46.



Figura 46. Prueba del API 20E para la bacteria F tras añadir los reactivos

A continuación, se detallará el resultado de cada una de las pruebas realizadas en el API 20E para la bacteria F. Estableciendo como reacciones positivas las escritas en color rojo (Tabla 13).

Tabla 13. Tabla de resultados para el API 20E para la bacteria F

PRUEBA	REACCIÓN / ENZIMAS	NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	beta-galactosidasa	sin color	amarillo
ADH	arginina deshidrolasa	amarillo	rojo o naranja
LDC	lisina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
ODC	ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
CIT	utilización del citrato	verde	azul oscuro o turquesa
H ₂ S	producción de H ₂ S	sin precipitado negro	precipitado negro
URE	ureasa	amarillo	rojo o naranja
TDA	triptófano desaminasa	amarillo	marrón-rojo
IND	producción de indol	amarillo	color rosa o anillo rosa-rojo
VP	producción de acetoina (Voges-Proskauer)	sin color	rosa-rojo
GEL	gelatinasa	sin difusión	difusión de pigmento
GLU	fermentación/oxidación de glucosa	azul o verde	Amarillo
MAN	fermentación/oxidación de manitol	azul o verde	Amarillo
INO	fermentación/oxidación de inositol	azul o verde	Amarillo
SOR	fermentación/oxidación de sorbitol	azul o verde	Amarillo
RHA	fermentación/oxidación de ramnosa	azul o verde	Amarillo
SAC	fermentación/oxidación de sacarosa	azul o verde	Amarillo
MEL	fermentación/oxidación de melobiosa	azul o verde	Amarillo
AMY	fermentación/oxidación de amigdalina	azul o verde	Amarillo
ARA	fermentación/oxidación de arabinosa	azul o verde	Amarillo
OX	citocromo oxidasa		

La prueba del nitrato se realizó en el pocillo de la glucosa, para determinar si esta bacteria presenta nitrato y/o nitrito reductasa. Tras la adición del reactivo, ácido sulfanílico y otra de alfa-naftilamina, el pocillo tomó un color rojo indicando una reacción positiva, por lo tanto, podemos deducir que esta bacteria presenta solo nitrato reductasa (Figura 46, 47A).

Tras realizar las pruebas bioquímicas del Api 20E se obtuvo un código de identificación como se muestra en la figura 47A. Para determinar la especie o el género de la bacteria se consultó la guía de identificación de la galería 20E de Biomérieux (Figura 47B). Según esta guía podría tratarse de ***Serratia rubidaea***.

A

07223 C

REF. : _____

Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie : *Bacteria F*

BIOMÉRIEUX

(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)		(+)	(-)							
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4			
ONPG	ADH	LDC	ODC	LCIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	LVP	IGEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO ₂	N ₂	MOB	McC	OF-0	OF-F
1				2		0			6			3			6			3								

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

B

```

206 363 *** SER. RUBIDAEA = VERY GOOD IDENTIFICATION ***
SER. RUBIDAEA 1/ 63.
ENT.AGGLOM.INC= SAC+ 1/ 7234. [GEL 1.7][RHA 79.7]
  
```

Figura 47. Identificación de la bacteria F. A) Código obtenido de la prueba del API 20E. B) Guía de identificación para API 20E (Biomérieux)

Comparando los resultados de las pruebas realizadas MacConkey, TSI, VPRM y API 20E para la bacteria F (Tabla 14), podemos concluir que:

- La prueba del TSI presenta una coloración amarilla (Figura 43A). Esto nos indica que puede fermentar azúcares que pueden ser lactosa, glucosa y/o sacarosa.
- La prueba VPRM presenta un color amarillo-anaranjado (Figura 43B), lo que nos informa que tiene fermentación butilenglicólica.
- El medio de MacConkey presenta un color rojo lo que nos indica que fermenta lactosa, confirmando la prueba TSI (Figura 41 IV),

- La prueba del API 20E, nos indica que fermenta glucosa, manosa, inositol, sacarosa, melobiosa, amigdalina y arabinosa, y realiza una fermentación butilenglicólica.

Tabla 14. Resultados obtenidos de la bacteria F en las pruebas realizadas

	PH	COLOR	FERMENTACIÓN
MACCONKEY	Básico	Rojo	Fermenta lactosa
TSI	Ácido	Amarillo	Fermenta azúcares glucosa, lactosa y/o sacarosa
VPRM	Ácido	Amarillo	Fermentación butilenglicólica
API 20E	-	Amarillo	Fermenta GLU, MAN, INO, SAC, MEL, AMY y ARA

3.2.2 Estudio microbiológico llevado a cabo en las etapas de elaboración de la conserva del pimiento: cortado, escaldado y envasado

- Cortado del pimiento. Se cogieron varias piezas de pimientos que se trituraron en un mortero estéril, luego se sembraron en césped dos placas de agar nutritivo a pH=4,6 y pH=7 con 200 µl del pimiento triturado cada una y se incubaron durante 24 horas a 37°C.

Transcurrido este tiempo se observó crecimiento microbiano a ambos pH. Indicando la presencia de neutrófilos (pH=7) y acidófilos (pH=4.6), mostrando un mayor crecimiento los neutrófilos (pH=7). Como se puede observar en la figura 48, aparecieron 4 colonias morfológicamente similares a las encontrados en el lavado del pimiento (Bacterias A, B, C, D).

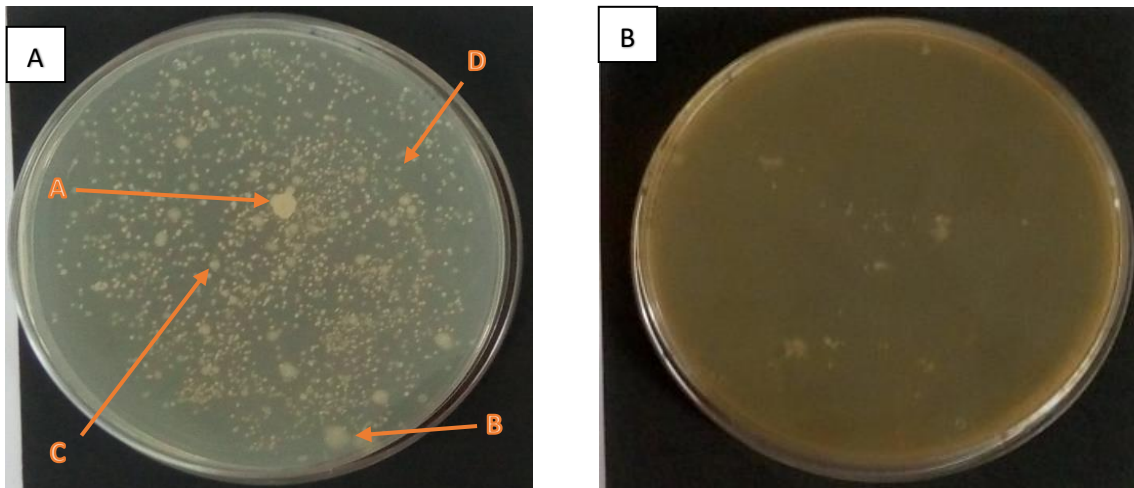


Figura 48. Muestra del cortado del pimiento. A. Crecimiento de bacterias neutrófilas (A, B, C, D) B. Crecimiento de acidófilos

Si se compara la muestra del cortado del pimiento con la muestra del lavado, se puede apreciar como la bacteria A se presenta en una cantidad inferior en el lavado que en el cortado (Figura 49).

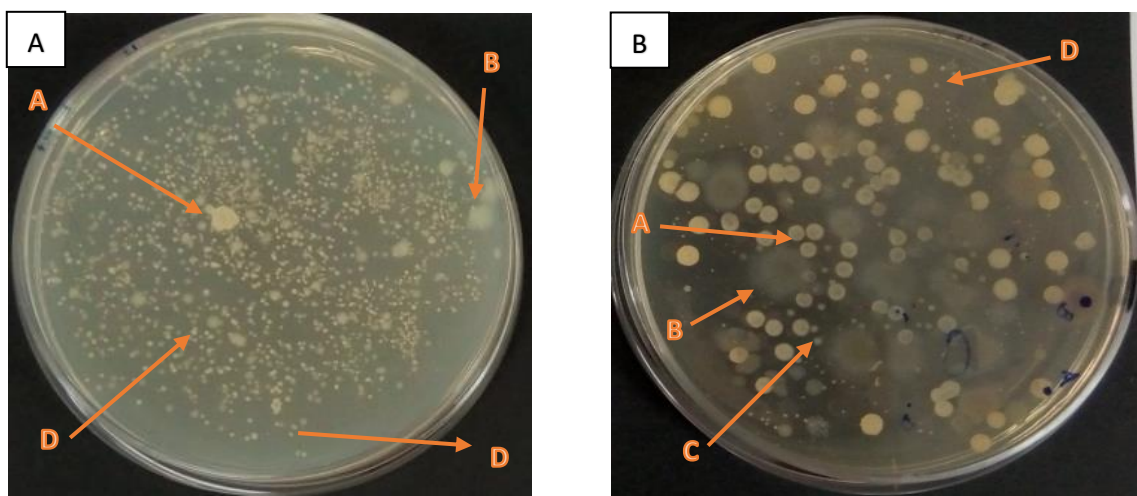


Figura 49. Crecimiento en agar nutritivo. Comparación del crecimiento procedente del cortado (A) y del lavado del pimiento (B): bacterias A, B, C, D.

- Escaldado. Se cogieron diferentes piezas de pimientos que se trituraron en un mortero estéril y, se sembraron en césped dos placas de agar nutritivo a pH=4,6 y pH=7 con 200 μ l del pimiento triturado cada una y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Las muestras del escaldado, no presentaron crecimiento a

ningún pH (Figura 50). Podemos deducir que con este tratamiento a 100°C durante 2 minutos se consigue eliminar la mayoría de microorganismos presentes en el pimiento.

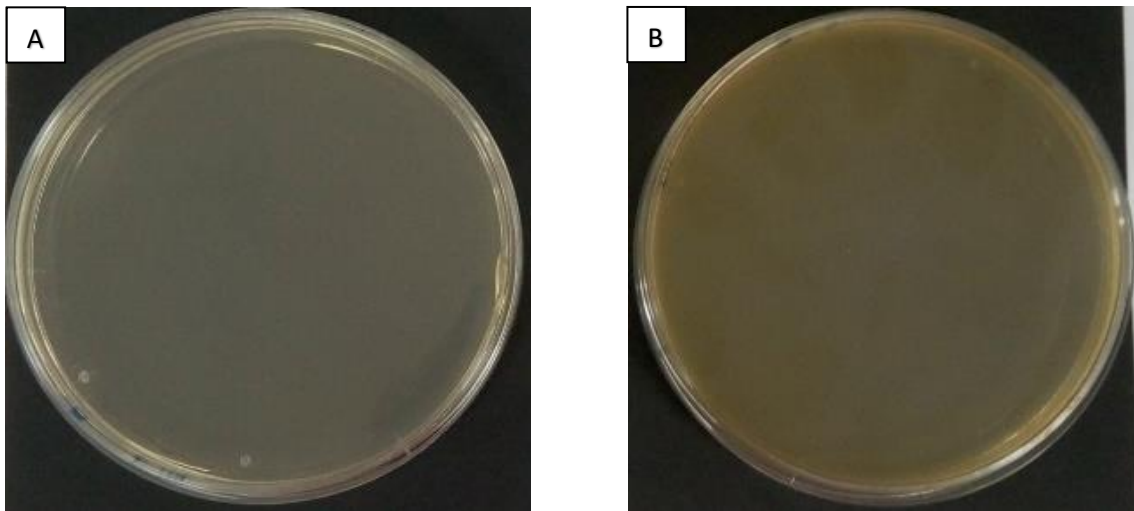


Figura 50. Muestra del escaldado: A. pH=7 B. pH=4.6

- **Envasado.** Se tomaron muestras del líquido de gobierno, en nuestro caso es el mismo que se empleó durante el escaldado (solución acuosa de ácido cítrico pH=3.1). Se sembraron en césped dos placas de agar nutritivo a pH=4,6 y pH=7 con 200 µl cada una y se incubaron durante 24 horas a 37°C.

Las muestras del envasado no presentaron crecimiento al igual que el escaldado, como era de esperar.

3.2.3 Estudio de estabilidad microbiológica de la conserva una vez abierta

Para determinar la estabilidad microbiológica de la conserva, los botes de pimiento se abrieron a las tres semanas de haber elaborado la conserva. Se realizaron dos métodos diferentes:

Recuento en placa para determinar el número de microorganismos presentes. Los botes sometidos a diferentes tiempos y temperaturas de appertización (95°C y 100°C durante 5,10,20 y 50 minutos) se abrieron a las 3 semanas del envasado. Se cogieron 0.1 ml del líquido de gobierno de cada uno de los botes y se realizó una siembra en césped en placas de agar nutritivo que se incubaron durante 24 horas a 37°C. Al cabo de las 24 horas se hizo el recuento del número de colonias bacterianas que se expresó como UFC/ ml. En el caso de un gran crecimiento que imposibilitara el recuento, se realizaron diluciones, como se ha indicado en material y métodos.

En las figuras 51, 52 y 53 se muestran los resultados obtenidos de la siembra en placa en agar nutritivo trascurrido 1,3 y 4 días después de la apertura de la conserva a los tratamientos de 95°C y 100°C durante 5,10,20 y 50 minutos.

Como puede apreciarse no se observa crecimiento de microorganismos en ninguno de los tratamientos realizados 1 día después de la apertura de la conserva (Figura 51), indicando que la conserva está en perfecto estado para su consumo, incluso en la tratada a 95°C durante 5 minutos.

A los 3 días de la apertura de la conserva (Figura 52), comienzan a aparecer algunas colonias, incluso habiendo permanecido a 4°C por lo que a partir de ese día no es conveniente su consumo.

A los 4 días (Figura 53) se observa un crecimiento considerable de microorganismos en todos los tratamientos, por lo que la conserva no se debe consumir ya que podría ser perjudicial para el consumidor.

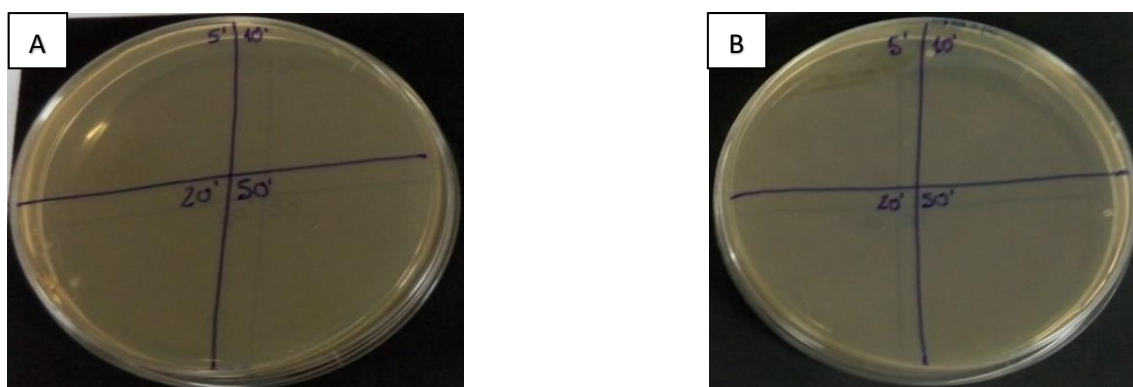


Figura 51. **1 día** después de la apertura de la conserva. A. Tratamiento appertización a 95°C durante 5,10,20 y 50 minutos. B. Tratamiento de appertización a 100°C durante 5,10,20 y 50 minutos.

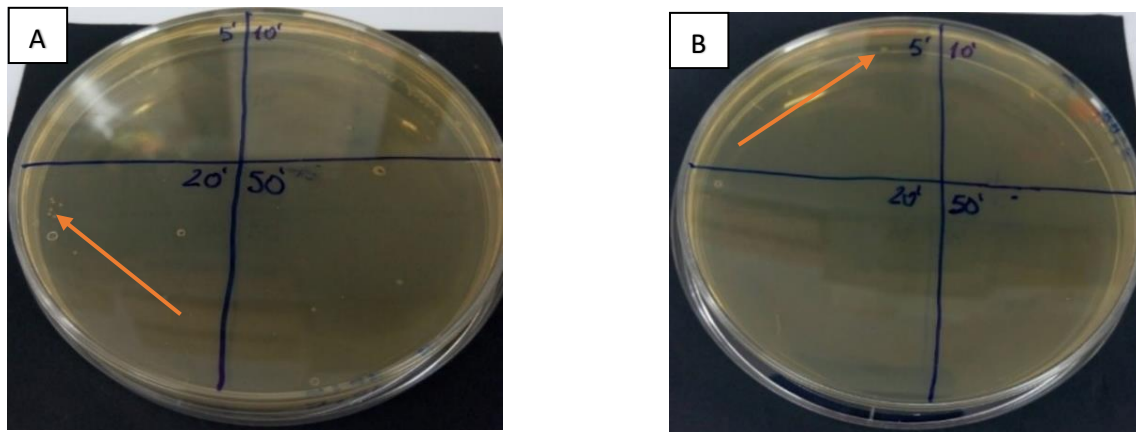


Figura 52. **3 día** después de la apertura de la conserva. A. Tratamiento appertización a 95°C durante 5,10,20 y 50 minutos. B. Tratamiento de appertización a 100°C durante 5,10,20 y 50 minutos. Flechas: colonias de bacterias

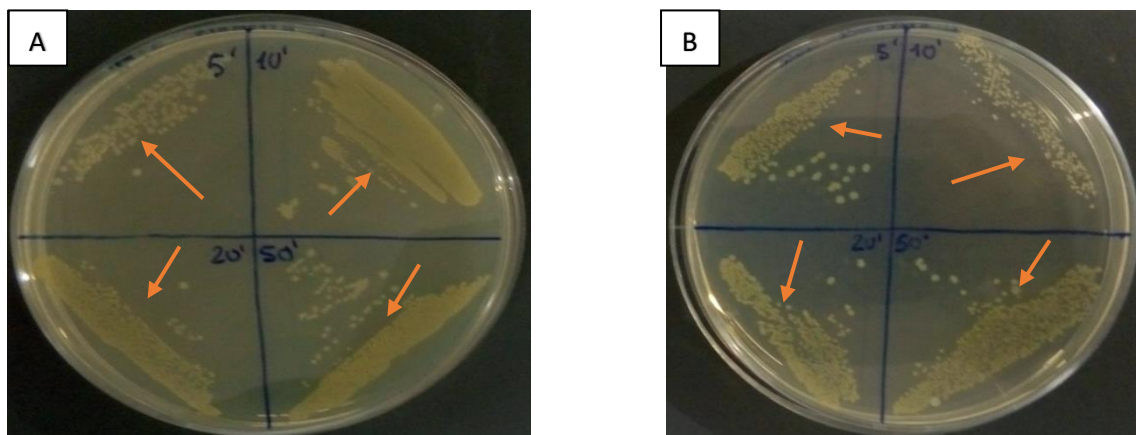


Figura 53. **4 día** después de la appertización de la conserva. A. Tratamiento appertización a 95°C durante 5,10,20 y 50 minutos. B. Tratamiento de appertización a 100°C durante 5,10,20 y 50 minutos. Flechas: colonias de bacterias

Para realizar el recuento, las muestras del líquido de gobierno se tomaron a lo largo de varios días durante un periodo de un mes aproximadamente. Los valores obtenidos del recuento en placa se muestran en las tablas 15 y 16.

Con los datos obtenidos se hizo la representación gráfica de las curvas de crecimiento de las conservas sometidas a appertización de 95°C y 100°C durante 5, 10, 20 y 50 minutos; una vez abiertas (Figuras 54 y 55).

Tabla 15 Crecimiento (bacterias/mililitro) en conservas apertizadas a 95° C

Tª 100°C	Día 1	Día 4	Día 5	Día 7	Día 8	Día 12	Día 14	Día 15	Día 19	Día 21	Día 22	Día 26	Día 28	Día 33
5 minutos	0	0	2,86 10 ²	2,042 10 ⁴	3,388 10 ⁶	1,2589 10 ¹²	3,98 10 ¹²	5,623 10 ¹²	2,69 10 ⁹	8,71 10 ⁷	3 10 ⁷	2,4 10 ⁷	2,1 10 ⁷	7 10 ⁶
10 minutos	0	0	5,143 10 ³	4,371 10 ⁵	1,44 10 ⁸	4,4669 10 ¹²	2,24 10 ¹³	1,82 10 ¹³	6 10 ¹⁰	2,09 10 ⁹	3.31 10 ⁸	3 10 ⁶	6 10 ⁶	1,1 10 ⁷
20 minutos	0	0	1,143 10 ³	1,029 10 ⁵	9,55 10 ⁶	2,073 10 ¹¹	9,19 10 ¹¹	9,81 10 ¹¹	5,13 10 ⁸	2,51 10 ⁷	1 10 ⁷	1,8 10 ⁷	2,1 10 ⁷	2 10 ⁶
50 minutos	0	0	0	1,864 10 ⁵	2,29 10 ⁶	9,65 10 ¹⁰	3,97 10 ¹²	2,81 10 ¹²	1 10 ¹¹	7,94 10 ⁸	6 10 ⁷	1,7 10 ⁷	6,1 10 ⁷	1,4 10 ⁷

Tabla 16. Crecimiento (bacterias /mililitro) en conservas apertizadas a 100° C

Tª 100°C	Día 1	Día 4	Día 5	Día 7	Día 8	Día 12	Día 14	Día 15	Día 19	Día 21	Día 22	Día 26	Día 28	Día 33
5 minutos	0	0	4,29 10 ²	8,2571 10 ⁴	1,698 10 ⁵	8.71 10 ⁶	4,47 10 ⁷	1,476 10 ⁸	2,19 10 ⁸	7 10 ⁷	3,5 10 ⁷	7 10 ⁷	1,7 10 ⁸	3 10 ⁷
10 minutos	0	0	0	5,0429 10 ⁴	4,5610 10 ⁴	1,38 10 ⁵	1,26 10 ⁹	1,99 10 ⁹	2 10 ⁸	1,3 10 ⁸	5,2 10 ⁷	3,63 10 ⁷	3 10 ⁷	6,66 10 ⁶
20 minutos	0	0	0	1,05143 10 ⁵	8,75 10 ⁵	1,26 10 ⁵	1,32 10 ¹⁰	1,78 10 ¹⁰	1,8 10 ⁹	1,4 10 ⁸	1,61 10 ⁸	1,3 10 ⁷	2,6 10 ⁸	2,3 10 ⁸
50 minutos	0	0	7,14 10 ²	1,50429 10 ⁵	1,02030 10 ⁵	2,511 10 ⁷	7,94 10 ⁷	1,26 10 ⁸	1,26 10 ⁹	1,8 10 ⁹	1,10 10 ⁹	7,08 10 ⁷	2 10 ⁷	1,76 10 ⁷

Se representó la concentración celular con respecto al tiempo. Pudiéndose apreciar las diferentes etapas del crecimiento: fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte

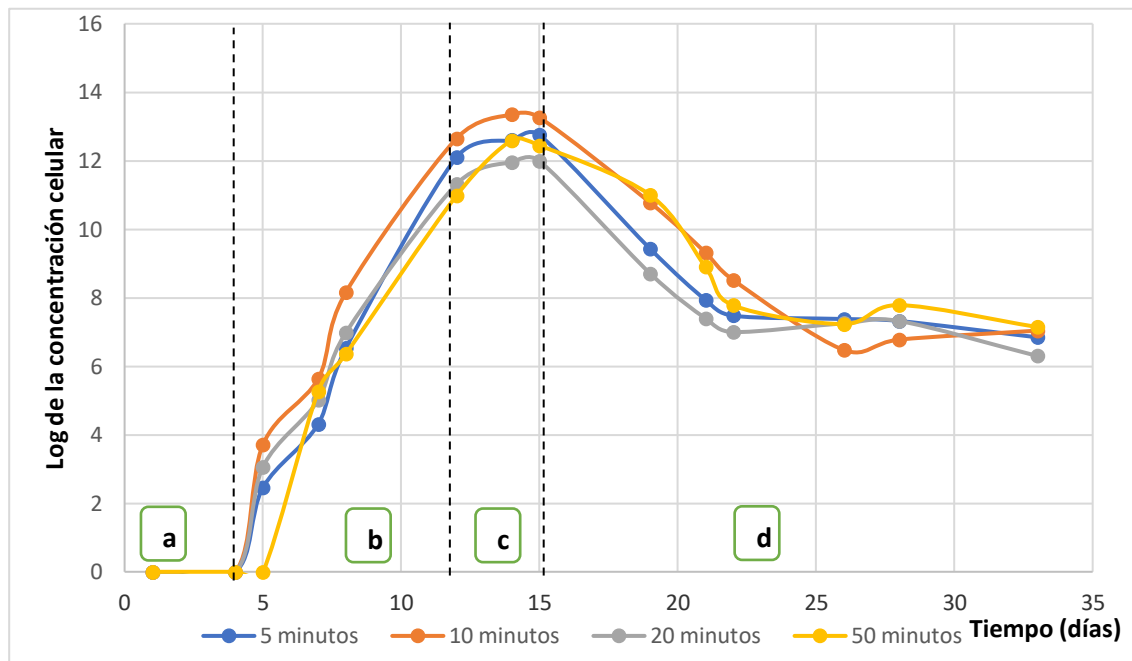


Figura 54. Curva de crecimiento microbiana de la conserva appertizada a 95°C a diferentes tiempos 5, 10, 20 y 50 minutos una vez abierta. a. Fase de latencia, b. Fase exponencial, c. Fase estacionaria y d. Fase de muerte

En la figura 54, se representa la curva de crecimiento para las conservas sometidas a 95°C de appertización durante 5, 10, 20 y 50 minutos. En ella, se observa una fase de latencia corta de alrededor de 4 días, donde los microorganismos comienzan a adaptarse al medio. Una fase exponencial más larga, de aproximadamente 11 días donde los microorganismos crecen y se multiplican de forma exponencial. Una fase estacionaria muy corta de 4 días y una fase de muerte muy prolongada.

Como se puede observar en la tabla 15 y figura 54, no hay crecimiento hasta el 5 día, lo que indica que el proceso de appertización a 95°C ha sido efectivo para eliminar toda la carga microbiana presente en el pimiento antes y durante el periodo de elaboración de la conserva, incluso a los 5 minutos de tratamiento.

Si comparamos los 4 tiempos de appertización no se observan diferencias significativas, pudiendo concluir que el crecimiento de microorganismos una vez abierta la conserva es bastante similar en todos los casos analizados independientemente del tiempo de duración del proceso de appertización

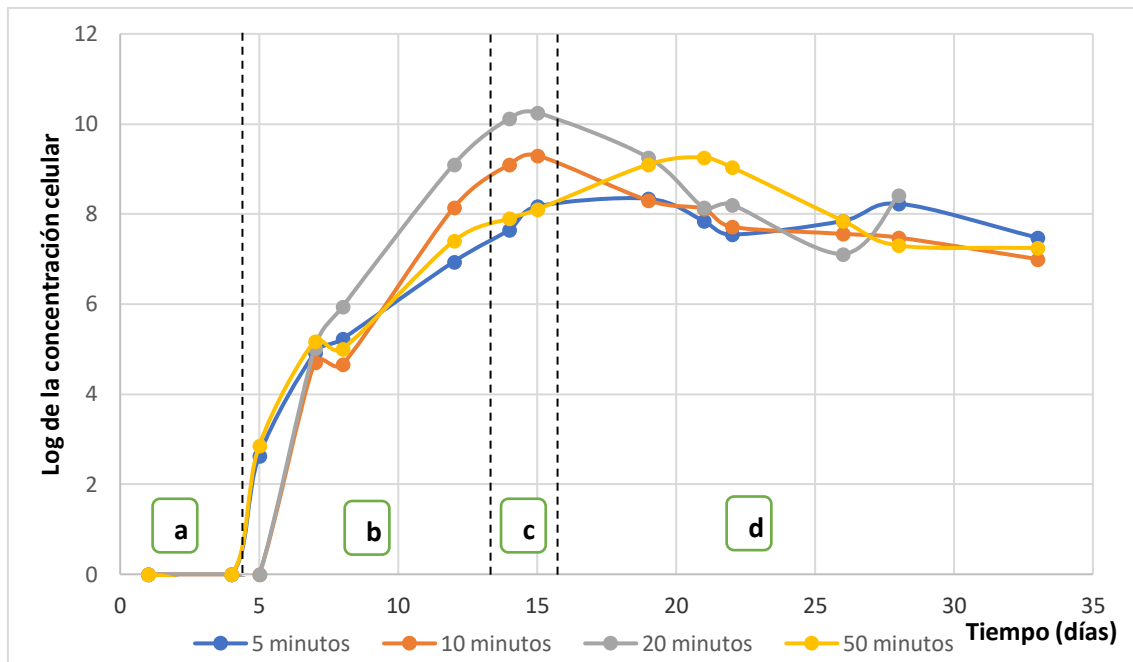


Figura 55. Curva de crecimiento microbiana de la conserva appertizada a 100°C a diferentes tiempos 5, 10, 20 y 50 minutos una vez abierta. a. Fase de latencia, b. Fase exponencial, c. Fase estacionaria y d. Fase de muerte

En la figura 55 se representa la curva de crecimiento de las conservas sometidas a un proceso de appertización de 100° C durante 5,10,20 y 50 minutos. En ella, se observa una fase de latencia corta de unos 4 días, similar a la observada en las conservas tratadas a 95°C. La fase exponencial es más larga de unos 10 días aproximadamente, y una fase estacionaria más corta de unos 2 días seguida de una fase de muerte más prolongada con un leve descenso de la concentración celular incluso hasta un mes después de su apertura.

Si comparamos los 4 tiempos de appertización no se observan diferencias significativas, pudiendo concluir que el crecimiento de microorganismos una vez

abierta la conserva es bastante similar en todos los casos analizados independientemente del tiempo de duración del proceso de appertización.

Comparando los resultados obtenidos podríamos decir que la appertización a 95°C es tan efectiva como la realizada a 100°C incluso con un tratamiento de 5 minutos, por lo tanto, se consigue una optimización del proceso de appertización, al poder reducir la temperatura y el tiempo del tratamiento consiguiendo la total eliminación de los microorganismos.

Medidas de la densidad óptica. Este estudio se realizó en paralelo con el apartado anterior. Una vez abiertos los botes se cogió 1 ml del líquido de gobierno de cada uno de los botes con los diferentes tratamientos de appertización. Se filtró y se midió la densidad óptica con un espetómetro, para ello se usó como blanco el líquido de gobierno estéril.

Las medias de las densidades ópticas se hicieron a lo largo de varios días después de la apertura de las conservas a los tratamientos de 95°C y 100°C durante 5,10,20 y 50 minutos. Estos valores se muestran en las tablas 17 y 18.

Tabla 17. Valores de densidad óptica en conservas appertizadas a 95° C

Tª 95°C	Día 1	Día 2	Día 5	Día 7	Día 13	Día 14
5 minutos	0,028	0,043	0,095	0,046	0,852	0,764
10 minutos	0,002	0	0,029	0	0,637	0,602
20 minutos	0	0	0,062	0,057	0,204	0,184
50 minutos	0,068	0,047	0,032	0,004	0,454	0,489

Tª 95°C	Día 19	Día 24	Día 25	Día 26	Día 27	Día 29
5 minutos	0,055	0,524	0	0	0	0
10 minutos	0,164	0,477	0,201	0,17	0,427	0,277
20 minutos	0,045	0,164	0,038	0,114	0,241	0,025
50 minutos	0,018	0,38	0,223	0,231	0,452	0,416

Tabla 18. Valores de densidad óptica en conservas appertizadas a 100° C

Tª 100°C	Día 1	Día 2	Día 5	Día 7	Día 13	Día 14
5 minutos	0,084	0	0,018	0,009	0,109	0,128
10 minutos	0	0	0,022	0,032	0,305	0,289
20 minutos	0	0,049	0,084	0,071	0,402	0,464
50 minutos	0	0	0,029	0	0,084	0,099

Tª 100°C	Día 19	Día 24	Día 25	Día 26	Día 27	Día 29
5 minutos	0,007	0,172	0,177	0,367	0,279	0,259
10 minutos	0,057	0,254	0,192	0,195	0,158	0,25
20 minutos	0,546	1,302	1,047	1,038	1,368	1,548
50 minutos	0,16	0,322	0,296	0,369	0,508	0,469

Como se observa en las tablas 17 y 18, un día después de la apertura se aprecia una baja densidad óptica. Sin embargo, en las placas sembradas el mismo día no tubo crecimiento alguno como se muestra en las tablas 15 y 16.

La presencia de ciertos valores de densidad óptica, en los primeros días de la apertura de la conserva se puede deber al efecto de los pigmentos del pimiento que interfieren en la medida.

Por lo tanto, sería necesario hacer un nuevo estudio en relación a las medidas de densidad óptica. El hecho de haber realizado un estudio paralelo mediante el recuento en placa nos ha permitido establecer los días de la estabilidad de la conserva.

4. CONCLUSIONES

1. La superficie del pimiento presenta microorganismos neutrófilos que crecen a pH=7, así como microorganismos acidófilos, siendo todos ellos mesófilos porque crecen a 37°C.
2. Los tres métodos empleados para la recogida de microorganismos en la superficie del pimiento fueron eficaces. Siendo el tercer método del lavado del pimiento el más eficaz, al poder aislar una mayor diversidad de microorganismos.
3. Existe una gran diversidad de microorganismo en la superficie del pimiento, detectando bacilos grampositivos (A y E), cocos grampositivos (C y D), bacilo-cocos gramnegativos (F) y bacilos gramnegativos (B).
4. La bacteria B es una enterobacteria, realiza fermentación butilenglicólica, no fermenta lactosa, pero si azúcares como glucosa, y arabinosa. Según las pruebas de identificación puede tratarse de ***Pseudomonas aeruginosa***.
5. La bacteria F es una enterobacteria, realiza fermentación butilenglicólica, fermenta lactosa, glucosa, manosa, inositol, sacarosa, melobiosa, amigdalina y arabinosa. Según las pruebas de identificación puede tratarse de ***Serratia rubidaea***.
6. El proceso de escaldado es suficiente para eliminar toda la carga microbiana presente en el pimiento. No obstante, es necesario el proceso de appertización para asegurar la destrucción total de microorganismos.

7. No se observan diferencias significativas entre la appertización a 100°C y a 95°C en los tiempos de tratamientos, , eliminando la totalidad de los microorganismos, incluso en el tratamiento de 95°C durante 5 minutos.
8. Los estudios sobre la estabilidad microbiológica de la conserva una vez abierta, nos indican que ésta se puede consumir en unos 4 días manteniéndola a 4°C, pasado este tiempo hay crecimiento de microorganismos por lo que no se aconseja su consumo.
9. El método utilizado para la elaboración de la conserva es suficientemente efectivo como para ser empleado de forma tradicional en el hogar, ya que incluso una vez abierto y conservado en el frigorífico, no presenta crecimiento de microorganismo, pudiéndose consumir hasta varios días después de la apertura como cualquier conserva realizada a nivel industrial.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Camacho Garrido S (2014). Ensayos microbiológicos. Ed Síntesis
2. Campbell-Platt G (2016). Ciencia y tecnología de los alimentos. Ed Acribia
3. Forsythe, S. J and Hayes P.R. (2012). Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP (2ª ed.). Ed Acribia
4. Galiano C (2013). Comprar, Conservar y Congelar nuestros alimentos desde la A hasta la Z.
5. Gamazo C, López Goñi I and Diaz R (2005). Manual práctico de microbiología (3ª ed.). Ed Masson
6. García Manrique P (2016) Control microbiológico y sensorial de los alimentos. Ed Síntesis.
7. Gunther Müller (1981). Microbiología de los alimentos vegetales. Ed Acribia
8. Jay J.M, Martin J.L and Golden D.A (2009). Microbiología moderna de los alimentos (5ª ed.). Ed Acribia
9. Kern, D.Q. (1999). Procesos de transferencia de calor. Trigésima primera edición. Ed. CECSA. México. 14-16p.
10. López-Jácome L.E, Hernández-Durán M, Colín-Castro Cl.A, Ortega-Peña S, Cerón-González G and Franco-Cendejas R. (2014) Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología.
<http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf>

11. Madigan M.T, Martinko J.M, Bender K. S, Buckler D.H and Stahl D.A (2015). Brock BIOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS (14 ed). Ed Pearson
12. Matthews K.R (2008) Microbiología de las frutas y las verduras frescas. Ed Acribia
13. Montville T.J and Matthews K.R (2009). Microbiología de los alimentos: introducción. Ed Acribia
14. Mossel, D. A. A, Moreno García B and Struijk C.B (2003). Microbiología de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos (2ª ed.). Ed Acribia
15. Ray B and Bhunia A (2010). Fundamentos de microbiología de los alimentos . Ed McGraw-Hill Interamericana
16. Santana, F., Duarte, P.E. and Cristianini, M. (2011). Determination of the convective heat transfer coefficient (h) in the sterilization of retortable pouches. International Journal of Food Engineering. 7: 3-14.
17. Vandevenne C.A and Marta Escolá Ribes M (2002). Métodos de análisis microbiológicos de alimentos. Ed Díaz de Santos
18. Willey J.M., Sherwood L.M. and Woolvorton C.J (2013). Prescott's MICROBIOLOGY (9º ed). Ed Mc Graw Hill.
19. Yousef A.E and Carlstrom C (2006). Microbiología de los alimentos: manual de laboratorio . Ed Acribia

Enlaces web

20. Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA).

<http://www.bedca.net/bdpub/index.php>. Consulta: 18 agosto de 2017.

21. Boletín Oficial del Estado (BOE). https://www.boe.es/diario_boe/

22. Código Alimentario Español (CAE).

<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1967-16485>