

ESTUDIO DEL EFECTO BACTERICIDA Y/O BACTERIOSTÁTICO DE
OLIGOSACÁRIDOS DE QUITOSÁN SOBRE *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*



Por

LUIS ALBERTO PÉREZ DEL ANGEL

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo Coahuila a Marzo de 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

... ha sido brindado la oportunidad de realizar mis estudios y por
ESTUDIO DEL EFECTO BACTERICIDA Y/O BACTERIOSTÁTICO DE
OLIGOSACÁRIDOS DE QUITOSÁN SOBRE *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*

... gracias al Angel Cárdenas por haberme dado la vida, a mi familia
... gracias a mi familia por haberme dado toda su confianza y apoyo

POR

LUIS ALBERTO PÉREZ DEL ANGEL

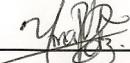
TESIS

... y profesores a todos los del departamento de alimentos y
... a la consideración del H. jurado examinador como requisito parcial
para obtener el título de

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

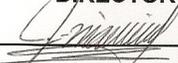
El trabajo realizado ha sido dirigido por el siguiente comité

Dr. Ana Verónica Charles Rodríguez



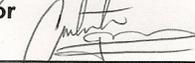
DIRECTOR

M.C. Juan Enrique Mauricio Benavides



Asesor

M.C. Antonio Francisco Aguilera Carbó



Asesor



Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"

ING. JOSÉ RODOLFO PEÑA ORANDAY
Coordinador de la División de ciencia animal.



Saltillo Coahuila, Marzo, 2009

COORDINACION DE
CIENCIA ANIMAL

AGRADECIMIENTOS

A “DIOS” por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios y por haber puesto en mi camino a personas que me han ayudado a ser lo que soy.

A mi madre Francisca del Angel Cárdenas, por haberme dado la vida, **a mi tío** Abdon Marcial Cárdenas por haberme dado toda su confianza y apoyo incondicional.

A mi escuela y profesores a todos los del departamento de alimentos y departamentos que lo fortalecen. Hago una mención muy especialmente a la doctora Ana Verónica Charles Rodríguez y cDr. Juan Enrique Mauricio Benavides por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos, por toda su enseñanza, por la paciencia que me tuvieron.

DEDICATORIA

A MIS FAMILIARES

Para mi abuela Tomasa Cárdenas Lazcano, tíos Abdon, Amado, Bernardo, Claudio Marcial Cárdenas, tías Teodora, Apolonia, Vicenta, Pascualita, a mi primo Tomas porque todos me brindaron ese apoyo y confianza familiar que siempre se necesita para seguir adelante.

A MIS HERMANOS

Santi y Beni del Angel que con su carácter me han enseñado a evitar los fracasos pero sobretodo a cumplir las metas.

A mi primer sobrino Alex que con solo verlo me dio más fuerza para lograr mi objetivo.

A MIS AMIGOS: Francisco, Ezequiel Oviedo Campos dos personas que en estos últimos años han sido mis hermanos, Patricia de la Fuente Estupiñan a Itzelinga un hermoso ángel que me brindo su inocente cariño. Hago una mención especial para Marbella Romero Reyes, Belén Azucena Pedraza Cruz dos mujeres que me dieron su apoyo y cariño incondicional con quien pase momentos hermosos y siempre estuvieron con migo en las buenas y malas y de quienes aprendí mucho con los consejos que me dieron., a Wendy, Amira, Lety, a mi amigo Joel de quien aprendí a madurar como persona quien me soporto como compañero de cuarto durante varios años, a Pedro en quien encontré un amigo diferente en varios aspectos, a Toño, Donald, Jesús, Nahum, Jairo Lee, Ricardo y Javier de La Cruz Vicencio, Edgar, Maira, Lolita, Laura, Joaquín, Tomas excelentes como personas y mejor aun como compañeros.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	
Antecedentes	3
Hipótesis	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
Justificación	6
REVISIÓN DE LITERATURA	
Capítulo I Oligosacáridos de quitosán	
1. Descripción de quitina	7
1.1 Estructura química de la quitina	7
1.2 Aplicaciones de la quitina y quitosán	9
1.2.1 Efecto antioxidante	9
1.3 Caracterización del Mercado Mundial de Quitina y Quitosano	9
1.4 Efectos de la quitina sobre bacterias	11
2. Oligosacáridos de quitosán.	11
2.1 Métodos de obtención de OQ.	12
2.2 Propiedades.	12
2.2.1 Grado de acetilación	12
2.2.2 Peso molecular y viscosidad	13
2.2.3 Solubilidad	13
2.2.4 Biodegradabilidad	13
2.2.5 Propiedades antimicrobianas	14
Capítulo II Métodos de conservación de alimentos	
1. Generalidades	15
1.1 Envasado	15

1.2 Congelación	16
1.3 Secado y deshidratación	16
1.4 Métodos diversos	17
Capítulo III Microorganismos	
1. Definición de microorganismo	19
1.1 Características	19
2. Definición de bacteria	20
2.1 Tipos de bacterias	20
2.1.1 Bacterias Gram positivas (G+)	20
2.1.2 Bacterias Gram negativas (G -)	20
2.1.3 Estructura de pared celular	21
3. Mecanismos de reproducción	21
4. Crecimiento bacteriano	21
5. Principales métodos de identificación de microorganismos	22
6. Generalidades de microorganismo <i>E. coli</i>	22
6.1 Clasificación	24
6.2 Propagación	25
6.3 Patogenia <i>E. coli</i>	26
6.4 Tratamiento	27
7. Generalidades de microorganismo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
7.1 Clasificación	28
7.2 Propagación	29
7.3 Patogenia	30
7.4 Tratamiento <i>Ps. aeruginosa</i>	31
8. Pruebas de identificación bioquímica de microorganismos bacterianos	32
8.1 TSI (Triple Sugar Iron)	32
8.2 Indol	32
8.3 Agar hierro de Kligler (KIA)	32
8.4 Citrato de Simmons	33
8.5 LIA (Lysine iron agar)	33

8.6 Descarboxilación de lisina y ornitina	34
8.7 Movilidad	34
8.8 Ureasa	35

MATERIALES Y MÉTODOS

ETAPA I: Identificación y caracterización físico-química de las cepas

1. Identificación de los microorganismos	36
1.1 Características microscópicas de las cepas empleadas de acuerdo a sus propiedades de tinción	36
1.2 Proliferación y mantenimiento	37
1.2.1 Preparación agar P y F para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
1.2.2 Preparación de agar EMB para <i>E. coli</i>	37
1.2.3 Crecimiento en medio sólido	37
1.2.4 Crecimiento en medio líquido	37
2. Identificación de las cepas mediante pruebas bioquímicas	38
2.1 TSI	38
2.2 KIA	38
2.3 Citrato de Simons	38
2.4 MIO	38
2.5 LIA	39
2.6 Urea	39
2.7 SIM	39

ETAPA II: Estudio del efecto inhibitor de los oligosacáridos de quitosán

1. Proliferación de <i>E. coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con inhibidor (OQ)	39
1.1 Preparación de medio sólido con el inhibidor	39
1.2 Preparación de medio líquido con OQ	40

RESULTADOS

ETAPA I: Identificación y caracterización físico-química de las cepas

1. Identificación de los microorganismos	41
1.1 Tinción de Gram	41
1.2 Proliferación y mantenimiento	42
1.3 Crecimiento en medio líquido	43
2. Identificación de las cepas mediante pruebas bioquímicas	47
2.1 <i>E. coli</i>	47
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48

ETAPA II: Estudio del efecto inhibitor de los oligosacáridos de quitosán

1. Proliferación de <i>E. coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con el inhibidor (OQ)	49
1.1 Preparación de medio sólido con el inhibidor	49
1.2 Preparación de medio líquido con inhibidor	52

CONCLUSIONES 55

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA 56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la celulosa, quitina y quitosán.	8
Figura 2 Producción de la quitina y sus derivados a nivel mundial	10
Figura 3 Curva de crecimiento	21
Figura 4. Crecimiento celular de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en agar F	42
Figura 5. Crecimiento celular de <i>E. coli</i> en agar EMB	43
Figura 6. Cinética de crecimiento celular de <i>E. coli</i> en caldo nutritivo	44
Figura 7. Determinación de la velocidad específica de crecimiento de <i>E. coli</i>	45
Figura 8. Cinética de crecimiento celular de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en caldo nutritivo	46
Figura 9. Determinación de velocidad específica de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
Figura 10 Efecto sobre <i>E. coli</i> en medio sólido con 0.5 % de inhibidor	50
Figura 11. Efecto sobre <i>E. coli</i> a concentración de 1.0 % de OQ.	50
Figura 12. Efecto sobre <i>E. coli</i> a concentración de 1.5 % de OQ.	50
Figura 13. Efecto sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a concentración de 0.5 % de OQ.	51
Figura 14. Efecto sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a concentración de 1.0 % de OQ.	51
Figura 15. Efecto sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a concentración de 1.5 % de OQ.	
Figura 16. Estudio del efecto del inhibidor a 0.5% sobre <i>E. coli</i>	52
Figura 17. Estudio del efecto del inhibidor a 0%, 0.5% y 1.0% sobre <i>E. coli</i>	53
Figura 18. Estudio del efecto del inhibidor a diferentes concentraciones sobre <i>Ps. aeruginosa</i>	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales características de <i>E. coli</i>	23
Tabla 2. Principales características de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
Tabla 3. Pruebas bioquímicas de <i>E. coli</i> a las 24 h	47
Tabla 4. Pruebas bioquímicas de <i>E. coli</i> a las 48 h	48
Tabla 5. Pruebas bioquímicas de <i>Aeromonas aeruginosa</i> a las 24 h	48
Tabla 6. Pruebas bioquímicas de <i>Aeromonas aeruginosa</i> a las 48 h	49

RESUMEN

La industria de alimentos es imprescindible para la obtención de productos con características constantes; sin embargo, es frecuentemente amenazada por bacterias contaminantes. En la actualidad es de gran interés emplear compuestos naturales antimicrobianos en alimentos y bebidas (Jeon, 2001).

El quitosán es el polisacárido soluble más importante derivado de la quitina que está recibiendo un aumento de interés. Esto es principalmente debido a sus propiedades policatiónica, biodegradable y baja antigenicidad (Roberts, 1991).

La actividad antimicrobiana de quitosán ha sido reconocida en contra de varias bacterias y hongos, y es influenciada por una serie de factores que incluyen el tipo de quitosán, el grado de polimerización y algunas otras propiedades físicas y químicas (Shibazaki, 1994).

El mecanismo de la actividad antimicrobiana no se ha determinado aún, pero varias hipótesis se han postulado. La hipótesis más factible se explica mediante un cambio en la permeabilidad celular debido a las interacciones entre el quitosán y las cargas policatiónicas electronegativas en la superficie de la célula (Chen, 1998). Otro mecanismo de acción antimicrobiana es la interacción de los productos de hidrólisis con el ADN microbiano, lo que conduce a la inhibición de la ARNm y síntesis de proteínas, quelación de metales, elementos de esporas y nutrientes esenciales (Hadwiger, 1986).

Se realizó siembra de ambos microorganismos en agar sólido y líquido.

Se utilizaron pruebas bioquímicas para determinar el metabolismo de los microorganismos. De acuerdo al comportamiento obtuvimos que el género y especie de los microorganismos sujetos a estudio fueron *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Se realizó una comparación del crecimiento de ambos microorganismos sembrados en agar sin oligosacáridos de quitosán (OQ) con los resultados de los mismos sembrados en agar sólido y líquido con las diferentes concentraciones de OQ.

El efecto de los oligosacáridos de quitosán se llevó a cabo utilizando concentraciones de 0.5%, 1.0%, 1.5%. para ambos microorganismos.

Los oligosacáridos de quitosán presentan un efecto bacteriostático sobre *Ps. aeruginosa* en concentraciones de 1.0 y 1.5%, obteniéndose un retraso en el crecimiento de 72 horas.

Los oligosacáridos de quitosán presentan un efecto bactericida sobre *E. coli* en concentraciones de 0.5 %.

El efecto inhibitorio de los oligosacáridos en medio líquido se aprecia mejor que en medio sólido, debido a que en este último se presenta el fenómeno de gradiente de concentración.

Palabras clave: oligosacáridos de quitosán, inhibición, E. coli, Ps. aeruginosa

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

El quitosán es un producto natural derivado de la quitina; es un polisacárido obtenido del exoesqueleto de crustáceos (camarón y cangrejo, principalmente), moluscos, diatomeas, insectos, algas, hongos y levaduras. Después de la celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza.

Químicamente hablando el quitosán es una sustancia natural similar a la celulosa, obtenido por la N-deacetilación de la quitina mediante métodos tanto químicos como enzimáticos (Jozel, 2003).

México es el séptimo productor de camarón en el mundo, así que muchas toneladas de cabezas del crustáceo regresan al mar cada año, y grandes cantidades de caparazones se tiran día a día en las marisquerías de todo el país (Conde, 2007).

Los oligosacáridos de quitosán (OQ) son amino azúcares no tóxicos de bajo peso molecular. Estos oligosacáridos son una mezcla de oligómeros de D-glucosamina con un grado de polimerización de 20.3 y un peso molecular de aproximadamente 2000 Da. Los oligosacáridos son obtenidos mediante una hidrólisis enzimática del quitosán con el empleo de la enzima quitosanasa. El desarrollo de las aplicaciones comerciales de la quitina y quitosán y sus derivados se han expandido recientemente. El uso de estos oligómeros es un mercado con un gran grado de explotación principalmente en 7 áreas: cuidado de la salud, alimentación y bebidas, cosméticos, agricultura, tratamiento de aguas, separación y recubrimiento de alimentos, inmovilización y cultivo celular (Castro, 2000.)

El quitosán se puede clasificar principalmente en tres categorías, de acuerdo con su pureza:

- Grado técnico para agricultura y tratamiento de aguas
- Grado puro para alimentos y cosméticos
- Grado ultra-puro para uso bio-farmacéutico

El quitosán ha sido aplicado para inhibir el crecimiento contra varias bacterias como *Pediococcus*, *Candida*, *Actinobacillus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* (Devlieghere, 2004).

Los OQ tienen un efecto antimicrobiano contra dos bacterias patógenas orales tales como *Actinobacillus*, y *Streptococcus mutans* a bajas concentraciones y tiempos muy cortos. El efecto tiene una variabilidad significativa de la primera bacteria sobre la segunda (Choi, 2001).

Hipótesis

Los oligosacáridos de quitosán tienen efecto bactericida y/o bacteriostático sobre *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Objetivo General

Demostrar la capacidad inhibidora y/o reductora de los oligosacáridos de quitosán sobre microorganismos bacterianos responsables de la descomposición de productos alimenticios.

Objetivos Específicos

Etapa 1: Identificación y caracterización físico-química de las cepas

- Preparación y determinación de curvas de crecimiento en medios selectivos para cada cepa.
- Caracterización de las cepas mediante pruebas bioquímicas.

Etapa 2: Estudio del efecto inhibitorio de los OQ.

- Monitoreo de crecimiento microbiano en medio sólido.
- Monitoreo de crecimiento microbiano en medio líquido.
- Estudio del efecto inhibitorio de los OQ sobre las cepas estudiadas.

Justificación

El quitosán, en la industria de alimentos, un derivado de la quitina, se utiliza para dar consistencia y viscosidad a los aderezos para ensaladas y mayonesas, mientras que en las frutas y verduras frescas sirve como un protector antimicrobiano, la adición de oligosacáridos de quitosán a los alimentos no modifica en manera alguna las características de sabor, color y olor, además de ser un conservador natural que no presenta riesgos a la salud como lo hacen en muchas ocasiones los conservadores químicos. En el estómago humano, atrapa grasas como el colesterol y los triglicéridos, a los que conduce por los intestinos capturados hasta evacuarlos y debido a esto se aplica en la industria farmacéutica como regulador del peso corporal, además sirve también como regulador de la presión arterial (Conde 2007).

"México es el séptimo productor de camarón en el mundo, así que muchas toneladas de cabezas del crustáceo regresan al mar cada año, y grandes cantidades de caparazones se tiran día a día en las marisquerías de todo el país, además de que la industria de estos polisacáridos en nuestro país es prácticamente nula para fines alimenticios, por lo que representa una alternativa de uso como conservador en la industria de los alimentos.

El quitosán y sus derivados presentan un efecto inhibitorio en el crecimiento de hongos fitopatógenos y bacterias; reduce la resistencia de hongos, virus e infecciones virales en plantas. Además presenta un efecto antimicrobiano contra algunos patógenos y contra microorganismos que provocan el deterioro de los alimentos. El quitosán reduce los cambios indeseables de las propiedades emulsificantes, la capacidad de retención de agua en la formación de geles, y cabe mencionar que los OQ son compuestos que a diferencia de la quitina son solubles en agua (Se-Kwon, 2005).

Por lo que es importante probar nuevos métodos de conservación naturales para la inhibición de microorganismos patógenos que dañan los alimentos perecederos.

REVISIÓN DE LITERATURA

CAPÍTULO I

Quitosán y sus Derivados

1. Descubrimiento de la quitina

La primera persona que consiguió describir correctamente la estructura química de la quitina fue Albert Hofmann, el conocido químico suizo, padre del L.S.D. (Wasson.1978).

No obstante, la base del aislamiento de la quitina data desde el principio del siglo XIX, cuando en el año 1811 el profesor Henri Braconnot, aisló una fracción llamada *fungine* de las membranas celulares de las setas. Más tarde, en 1823, el nombre “fungine” cambió a quitina, casi tres décadas antes del aislamiento de la celulosa (Conde, 2007).

1.1 Estructura química de la quitina

La quitina es un polisacáridos de alto peso molecular, el cual químicamente está estructurado de la siguiente forma: unidades de N-acetil-D-glucosamina (N acetil-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranososa) conectadas por enlaces β -D (1 \rightarrow 4). Se trata de un muy insoluble material parecido a la celulosa con baja solubilidad y reactividad química.

La quitina puede considerarse como la celulosa con un grupo acetoamido; en la posición C-2 sustituye al grupo hidroxilo de la celulosa. Al igual que la celulosa, funciona como un polisacárido estructural. Al hacer una deacetilación a la quitina el grupo acetoamido pierde el grupo cetónico quedando sólo un grupo amino (Figura 1).

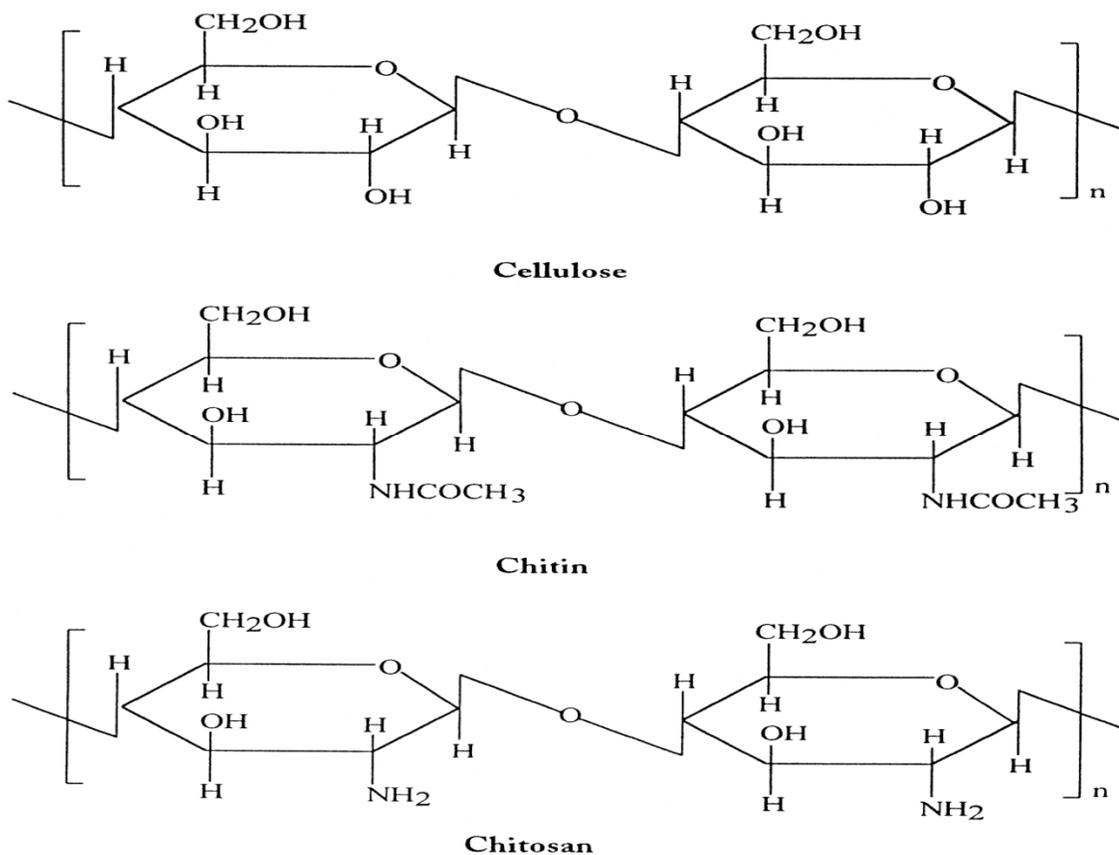


Figura 1. Estructura química de la celulosa, quitina y quitosán.

La quitina es el polímero más abundante en los crustáceos, insectos y hongos. Es de color blanco, de consistencia dura, inelástica, es un polisacárido nitrogenado (6.89%) causante de la contaminación de aguas superficiales de zonas costeras (Encarta, 2009).

1.2 Aplicaciones de la quitina y quitosán

La quitina y quitosán tienen una amplia gama de aplicaciones. Ellos pueden ser empleados, para resolver numerosos problemas en el medio ambiente y la ingeniería biomédica. Los derivados de la quitina, (incluidos los desacetilados parcialmente como quitosán), pueden ser fácilmente moldeados a diversas formas, y sus derivados son digeridos en vivo por enzimas lisosomales (Gupta, 2000)

En la actualidad el uso de la quitina ha adquirido mayor interés debido a que se obtiene de una fuente natural, teniendo como principales propiedades ser un subproducto renovable, no tóxico y no alergénico, antifúngico y antimicrobiano (Conde, 2007).

1.2.1 Efecto antioxidante de la quitina

La quitina tiene un efecto antioxidante sobre cebollas, este efecto es atribuido a los grupos hidroxilo y amino; al sustituir un grupo podría destruirse la estructura del quitosán disminuyendo la adherencia intermolecular del hidrógeno por lo tanto, ayuda a incrementar la actividad antioxidante de los derivados del quitosán. (Sun Tao, Xie Wenming, Xu Peixin Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives, 28 October 2004)

Las diferencias de actividad antioxidante de los derivados del quitosán podría ser atribuida a los diferentes contenidos de hidróxidos activos y grupo amino en su aportación polimérica (Sun, 2004).

1.3 Caracterización del Mercado Mundial de Quitina y Quitosán

La producción de quitina se mide en base a la producción de cangrejo y conchas de camarón que son desechados por la industria pesquera en los estados de Oregón, Washington, Virginia y en el Japón y por diversas flotas pesqueras en la Antártida. Varios países poseen grandes recursos sin

explotación de crustáceos (por ejemplo, Noruega, Chile y México) (Muzzarelli, 1987).

El mercado mundial de oferentes de quitina y quitosán está formado por diferentes actores. Liderando el mercado se encuentran Estados Unidos y Japón. Según un estudio realizado por la Sociedad Asiática de Quitina (1996), el mercado mundial de quitosán en 1994 era de 1000 Ton. de las cuales 800 Ton. eran utilizadas en Japón, esto demuestra la gran importancia de este país como productor y consumidor tal como lo muestra figura numero producción de la quitina y sus derivados a nivel mundial, esta situación puede explicarse si se tiene en cuenta que este país estuvo a la vanguardia en la producción de éstos biopolímeros ya que inició sus actividades en la década del 70's. Actualmente el panorama mundial se ha visto modificado y por lo tanto, la producción y el consumo se encuentran descentralizados con respecto a la situación anteriormente mencionada, en donde no solo ha aumentado el volumen de producción con la participación de nuevos actores globales, sino también los nuevos campos de aplicación han encontrado nuevos mercados que poseen un potencial de desarrollo futuro muy promisorio. (Caprile, 2004).

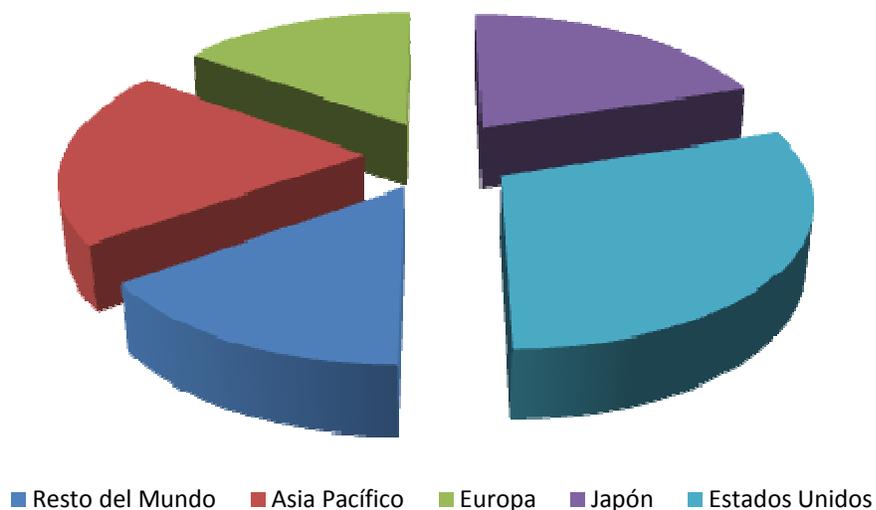


Figura 2. Producción de la quitina y sus derivados a nivel mundial.

1.4 Efectos de la quitina sobre las bacterias

Se ha reportado en la literatura el efecto de la quitina sobre alimentos, destacando el antimicrobiano, el cual puede ser de 2 tipos:

- Bacteriostático: (no mata la bacteria, sólo inhibe su crecimiento). Efecto secundario, menos tóxico y bactericida: hace a la bacteria no vital, es decir, la mata.
- Bactericida: (hace a la bacteria no vital, es decir, la mata). La hipótesis más factible se explica mediante un cambio en la permeabilidad celular debido a las interacciones entre el quitosán y las cargas policatiónicas electronegativas en la superficie de la célula (Chen, 1998). Otro mecanismo de acción antimicrobiana es la interacción de los productos de hidrólisis con el ADN microbiano, lo que conduce a la inhibición de la ARNm y síntesis de proteínas, quelación de metales, elementos de esporas y nutrientes esenciales (Hadwiger, 1986).

2. Oligosacáridos de quitosán

Los OQ son polímeros de hasta 20 monosacáridos. La unión tiene lugar mediante enlaces glucosídicos. Se ha establecido un límite arbitrariamente de 20 unidades para definir a los OQ (Tombs, 1998).

Los OQ son amino azúcares de bajo peso molecular. Estos oligosacáridos son una mezcla de oligómeros de D-glucosamina con un grado de polimerización de 20.3 y un peso molecular de aproximadamente 2000 Da (Park, 2002).

2.1 Métodos de obtención

Los principales métodos desarrollados son:

- 1) empleo de enzimas como: celulasas y quitosanasas (Lee, 2000; Jeon, 2002);
- 2) empleo de métodos químicos, como el uso de reacciones con nitrato de sodio (Ha, 2000);
- 3) métodos físicos como: ultrafiltración (Somogyi, Nelson, 1956).

2.2 Propiedades

Los OQ han sido empleados ampliamente en la liberación de fármacos, estimulación de mecanismo de defensa en plantas, estimulación de crecimiento celular y regeneración de tejidos (Muzzareli, 1989), efecto hipocolesterolémico y actividad de lípidos (Sugano 1978; Nagyvary, 1979), prevención y tratamiento de úlceras gástricas (Ito, 2000), atrapamiento de ADN para liberación de células, acción antitumoral (Suzuki, 1986), efecto antimicrobiano (Park, 2004).

2.2.1 Grado de acetilación

Químicamente, la quitina y el quitosán son poliglucosaminas que son distinguidas solamente por el grado de la acetilación de los grupos amino. Las quitinas típicas tienen generalmente grado de acetilación entre 70-95% que corresponde a un contenido de acetilo de un 15-20.7%, mientras que el quitosán tienen comúnmente un grado de acetilación entre 15-25% que corresponde 3.2 - 5.3 % del contenido de acetilo. El grado de acetilación es probablemente el parámetro más importante de estos polisacáridos y determina grandemente sus características funcionales y fisiológicas (Beltrán 1998).

2.2.2 Peso molecular y viscosidad

El quitosán es un producto altamente viscoso similar a las gomas naturales. La viscosidad puede variar en solución, debido a su comportamiento polielectrolítico, en dependencia de la fuerza iónica del medio, se comporta de manera diferente, lo cual influye notablemente en la viscosidad de la disolución.

Debido a la alta viscosidad del quitosán en sistemas de pH < 5.5 puede emplearse como espesante, estabilizante o agente de dispersión (Beltrán, 2004).

2.2.3 Solubilidad

La quitina es insoluble en los solventes comunes, el quitosán es soluble en ácidos minerales y orgánicos diluidos. El quitosán no es soluble a pH > 6.0 y funciona solamente en sistemas ácidos, siendo una propiedad relevante para su aplicación en alimentos. Debido a la alta densidad de cargas positivas el quitosán se comporta en soluciones ácidas acuosas como una molécula policatiónica. Este comportamiento no es típico para la quitina debido a su alto grado de acetilación.

El quitosán es insoluble en H₂SO₄ y de solubilidad limitada en H₃PO₄. Además es soluble en mezclas de alcohol y agua (Beltrán, 2004).

2.2.4 Biodegradabilidad

La quitina y el quitosán tienen una propiedad importante ya que es degradada por enzimas esta es considerada ya que muchas de las aplicaciones en alimentos se relacionan directa o indirectamente con la capacidad de las enzimas para despolimerizarse. Entre las enzimas (o complejo enzimático) que han sido reportados para ejercer actividad hidrolítica en la quitina y el quitosán se encuentran: quitinasa, quitosanasas, lisozima, celilasa, hemicelulasa, pectinasa, lipasa, dextranasa e iguales proteasas tales como pancreatina, pepsina y papaína (Beltrán, 2004).

2.2.5 Propiedades antimicrobianas

Se ha reportado que el quitosán controla el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras y ha sido aplicada para suprimir estos organismos en tejidos de plantas y alimentos (Beltrán, 2004).

CAPÍTULO II

MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS

1. Generalidades

Hay muchos agentes que pueden destruir las peculiaridades sanas de la comida fresca. Los microorganismos, como las bacterias y los hongos, estropean los alimentos con rapidez. Las enzimas, que están presentes en todos los alimentos frescos, son sustancias catalizadoras que favorecen la degradación y los cambios químicos que afectan, en especial, la textura y el sabor. El oxígeno atmosférico puede reaccionar con componentes de los alimentos, que se pueden volver rancios o cambiar su color natural. Igualmente dañinas resultan las plagas de insectos y roedores, que son responsables de enormes pérdidas en las reservas de alimentos. No hay ningún método de conservación que ofrezca protección frente a todos los riesgos posibles durante un periodo ilimitado de tiempo. Los alimentos enlatados almacenados en la Antártida cerca del polo sur, por ejemplo, seguían siendo comestibles al cabo de 50 años, pero esta conservación a largo plazo no puede producirse en el cálido clima de los trópicos. Además del enlatado y la congelación, existen otros métodos tradicionales de conservación como el secado, la salazón y el ahumado. La desecación por congelación o liofilización es un método más reciente. Entre las nuevas técnicas experimentales se encuentran el uso de antibióticos y la exposición de los alimentos a la radiación nuclear (Vanaclocha, 2003).

1.1 Envasado

El proceso de envasado recibe a veces el nombre de esterilización porque el tratamiento por calor al que se somete a los alimentos ya que elimina todos los microorganismos que pueden echarlos a perder, así como aquellos que pueden ser perjudiciales para la salud como las bacterias patógenas y

aquellas que producen toxinas letales. La mayoría de las operaciones de envasado comercial se basan en el principio de que la destrucción de bacterias. Los alimentos expuestos a temperaturas elevadas durante unos pocos minutos o segundos conservan una mayor parte de su sabor natural. En el proceso Flash 18, un sistema continuo, los alimentos se esterilizan casi de forma instantánea en una cámara a presión para impedir que hiervan al ser introducidos en los recipientes. No es necesaria esterilización ulterior alguna (Vanaclocha, 2003).

1.2 Congelación

Aunque el hombre prehistórico almacenaba la carne en cuevas de hielo, la industria de congelados tiene un origen más reciente que la del envasado. El proceso de congelación fue utilizado comercialmente por primera vez en 1842, pero la conservación de alimentos a gran escala por congelación comenzó a finales del siglo XIX con la aparición de la refrigeración mecánica.

La congelación conserva los alimentos impidiendo la multiplicación de los microorganismos. Dado que el proceso no destruye a todos los tipos de bacterias, aquellos que sobreviven se reaniman en la comida al descongelarse, y a menudo se multiplican mucho más rápido que antes de la congelación (Gutiérrez Bello, José ciencia biológica: principios generales de los alimentos 2000.)

1.3 Secado y Deshidratación

Aunque ambos términos se aplican a la eliminación del agua de los alimentos, en la tecnología de los alimentos el término secado se refiere a la desecación natural, como la que se obtiene exponiendo el alimento a la acción del sol, mientras que el término de deshidratación designa el secado por medios artificiales, como una corriente de aire caliente. En la desecación por congelación o liofilización, se somete a los alimentos congelados a la acción del

vacío en una cámara especial hasta lograr la sublimación de la mayor parte de su contenido en agua. La eliminación del agua ofrece una excelente protección frente a las causas más comunes de deterioro de los alimentos (Maypoy, 2001).

1.4 Métodos diversos

Se pueden usar otros métodos o combinaciones de ellos para conservar los alimentos. La salazón del pescado y el cerdo es una práctica muy antigua. La sal penetra en los tejidos, fija el agua, inhibiendo así el desarrollo de las bacterias que deterioran los alimentos. Otro método muy empleado es el ahumado, que se utiliza a menudo para la conservación del pescado, el jamón y las salchichas. El humo se obtiene por la combustión de madera, con una aportación limitada de aire. En este caso, parte de la acción conservadora se debe a agentes bactericidas presentes en el humo, como el metanol, así como por la deshidratación que se produce durante el proceso. El ahumado suele tener como finalidad de dar sabor al producto, además de conservarlo (Maypoy, 2001).

El azúcar, uno de los principales ingredientes de las mermeladas y las jaleas, es otro agente conservador. Para que el método sea eficaz, el contenido total de azúcar debe ser al menos de un 65% del peso total del producto final. El azúcar, que actúa de un modo muy similar al de la sal, inhibe el crecimiento bacteriano una vez calentado el producto.

Debido a su elevado grado de acidez, el vinagre (ácido acético) actúa como conservador en los encurtidos y otros productos calentados con antelación. La fermentación producida por ciertas bacterias que generan ácido láctico es la base de la conservación del *chucrut* o col fermentada y las salchichas fermentadas.

El benzoato de sodio, cuya concentración no puede exceder el 0.1%, se usa en productos derivados de la fruta para protegerlos contra las levaduras y los mohos. El dióxido de azufre, otro conservador químico, ayuda a mantener el

color de los alimentos deshidratados. El propionato de calcio se añade a veces a los productos de repostería y panadería para inhibir el crecimiento de hongos.

Otro método para la conservación de frutas y verduras es mediante un tratamiento anaeróbico inmediato con gases como el dióxido de carbono, el monóxido de carbono y el nitrógeno. También está en estudio el tratamiento de productos envasados esterilizados como la leche (Gutiérrez Bello, José ciencia biológica: principios generales de los alimentos 2000.)

Debido a la creciente preocupación por el uso de productos químicos que pueden ser tóxicos, podrían utilizarse radiaciones ionizantes. La irradiación retarda la maduración de la fruta y la verdura, inhibe la germinación en bulbos y tubérculos, desinfecta el grano, los cereales, las frutas frescas y secas, y elimina los insectos de las verduras; también destruye las bacterias en la carne fresca. No obstante, la preocupación del público acerca de la seguridad de la radiación ha limitado su uso a gran escala (Gutiérrez Bello, José ciencia biológica: principios generales de los alimentos 2000.).

CAPITULO III

MICROORGANISMOS

1. Definición

Los microorganismos son seres vivo que, debido a su pequeño tamaño, sólo se pueden observar utilizando microscopios ópticos o electrónicos. La microbiología es la ciencia que estudia estos organismos microscópicos, que incluyen virus, bacterias, algas, hongos y protozoos. Los microorganismos pueden vivir aislados o agruparse formando colonias.

1.1 Características

La principal característica que tienen en común todos los microorganismos es su tamaño diminuto. Como consecuencia de ello, los microorganismos poseen algunas ventajas:

- La disminución del tamaño supone un aumento de la relación superficie/volumen. Y, por ello, la superficie de contacto con el medio externo es mayor, lo que facilita un rápido intercambio de sustancias con el exterior.

- Las pequeñas dimensiones hacen que los compartimentos celulares estén muy próximos, por lo que las reacciones metabólicas son rápidas. Como consecuencia, los microorganismos consumen los nutrientes del medio con rapidez y originan muchos productos de desecho que son eliminados al exterior, alterando en poco tiempo el medio en el que viven.

- Se multiplican muy rápido.

- Pueden vivir en multitud de ambientes; algunos de ellos de los más inhóspitos en los que es capaz de crecer un ser vivo.

2. Bacterias

Son seres u organismos unicelulares y procariotas (no tienen núcleo); su tamaño es de 2-3 micras.

2.1 Características de las bacterias de acuerdo a la tinción de Gram

2.1.1 Bacterias Gram positivas (G+)

Algunas de las células son esféricas, en forma de bacilos de filamentos. La reproducción celular se da generalmente por fisión binaria; algunas producen esporas como forma resistente (endoesporas o esporas). Son procariotas no fotosintéticas; son quimiosintéticas heterótrofas que incluyen a las aerobias, anaerobias, anaerobias facultativas y microaerofílicas (Bergey, 2000).

2.1.2 Bacterias Gram negativas (G-)

Son células que contienen una capa delgada de peptidoglicano (contiene ácido murámico, presente en todas las bacterias), y una variedad de otros componentes entre la capa de peptidoglicano. La forma de las células puede ser esférica, ovalada, bacilos lineales ó curvos helicoidales ó filamentosos; algunas de estas formas pueden ser encapsuladas. Su reproducción se lleva a cabo mediante fisión binaria aunque *Pleurocapsales* muestra fisión múltiple. Los miembros de esta división pueden ser fototrópicos o no fototrópicos (litotróficos o heterotróficos) que incluyen a las bacterias aeróbicas, anaeróbicas anaeróbica facultativa y microaerofílicas (Bergey, 2009).

2.1.3 Estructura de pared celular

Puede ser de dos tipos:

- Gram (+), en su composición hay una estructura como una malla de pescar de naturaleza proteínica. Contiene peptidoglicano (mureína) y lípidos como el ácido lipoteicoico (tiene lípidos y alcoholes derivados de los glúcidos).
- Gram (-), estructura más compleja porque el peptidoglicano es más fino y consta de una membrana externa y entre ambos una espacio periplásmico. La membrana externa tiene proteínas y lipopolisacáridos.

3. Mecanismos de reproducción

Se reproducen por: división binaria o bipartición, es decir, de una célula se forman dos.

4. Crecimiento bacteriano

La velocidad de crecimiento es igual a 1×2^n , si han crecido a partir de una bacteria van diferenciándose; n se llama a cada generación, es decir el nº de generaciones. El tiempo de duplicación es de cada 20 en todo tipo de bacterias (Figura 3).

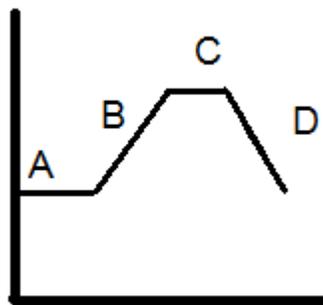


Figura 3. Curva de crecimiento

- A = latencia, adaptación
- B = logarítmica o exponencial
- C = estacionaria o mantenimiento
- D = mortalidad o descenso

5. Principales métodos de identificación de microorganismos

Existen dos métodos los macroscópicos: pigmentación y pruebas bioquímicas diferenciales que son llevadas a cabo inoculando las bacterias en agares específicos o diferenciales, al éstas realizar sus actividades metabólicas y movilidad para el caso de algunos agares de las pruebas bioquímicas (SIM, MIO) se observan características que al compararlas con la literatura nos ayudan a identificar a los microorganismos, el otro método es el microscópico: la tinción de Gram es el método más utilizado para identificar microorganismos de acuerdo a las características morfológicas que presentan.

6. Generalidades del microorganismo *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) fue descrita por primera vez en 1885 por Theodor von Escherich, bacteriólogo alemán, quién la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor. Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo. El hábitat natural es el intestino humano y de animales de sangre caliente. Las cepas de *E. coli* generalmente no son patógenas, sino indicadores de contaminación fecal. Su presencia en una muestra implica que otros microorganismos de origen fecal, incluyendo patógenos, pueden estar presentes en la misma. Sólo algunas cepas de *E. coli* son agentes etiológicos de infecciones gastrointestinales como por ejemplo *Escherichia coli* O157:H7, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterotoxigénica, entre otras (González, 1984).

Tabla 1. Principales características de *E. coli*

Características

Morfología: bacilos cortos que pueden crecer formando cadenas. La mayoría son móviles por sus flagelos peritricos generalmente fimbriados, posee pilis asexuales y fimbrias adhesivas. Poseen los antígenos O, H y K (no todos tienen el antígeno K, solo los que son resistentes a la fagocitosis y a la acción bactericida de los anticuerpos del complemento)

Tinción: Gram -

Tamaño: 2 a 3 micras

Incubación: 3 a 4 días

Respiración: anaerobia o aeróbica facultativa

Reproducción: gemación y fisión binaria.

Agentes metabólicos: reduce nitratos a nitritos, fermenta la glucosa, manitol y especialmente la lactosa. Utiliza el acetato como única fuente de carbono, hidroliza el triptófano.

Productos: las proteínas producidas por *E.coli* se llaman colisinas. Forman gas a partir de la glucosa, al fermentar azúcares forma ácido y gas. El principal ácido que forma es el láctico, fórmico y en menores cantidades es acético y acetílico. Produce lisina descarboxilasa. También produce hemolisina y bacteriosinas.

Cultivos: agar gelosa, sangre, EMB, agar- Mc. Conkey, sales biliares.

Morfología colonial: circular, convexas lisas con bordes definidos, con resplandor metálico, colonias planas verdosas no viscosa y presentan brillo verdoso en agar de eosina y azul de metileno.

Pared celular: presenta los antígenos "O" en el exterior de la membrana, antígenos K de manera más externa, a los O y presentan antígenos H en los flagelos.

6.1 Clasificación

En la literatura se menciona una clasificación de la especie *E. coli* de acuerdo a sus acciones metabólica y patogénica. Pertenece a la familia enterobacteriaceae (*enterobacterias*), al género *Escherichia*, especie *coli*. Las cepas existentes son:

- *E. coli* enteropatógena (ECEP): origina diarrea infantil en países en vías de desarrollo. (Garmendia, 2005). Interacciona con las células epiteliales produciendo una lesión histopatológica característica conocida como “adherencia / destrucción” o lesión (Kaper, 1998).

- *E. coli* enterotoxigénica (ECET): se parece mucho a *V. cholerae*, se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no la invade, y elabora toxinas que producen diarrea. No hay cambios histológicos en las células de la mucosa y muy poca inflamación. Produce diarrea no sanguinolenta en niños y adultos (Mariazza, 1990).

- *E. coli* enteroinvasiva (ECEI): coloniza el colon. Las propiedades de colonizar, invadir y destruir los enterocitos del colon se codifican genéticamente por ADN cromosomal y por plásmidos. Elaborada una citotoxina que se presenta con mayor intensidad en un medio bajo en hierro. Se adhiere al epitelio intestinal y causa muerte celular y una rápida respuesta inflamatoria. (Fernández, 2003).

- *E. coli* enterohemorrágica o verotoxigénica (ECEH): se adhiere a las células endoteliales y produce lesiones de unión estrecha y que se encuentran principalmente en el colon. Produce 2 tipos principales de toxinas: Verotoxina 1 (VT-1) y Verotoxina 2 (VT-2). La toxina produce inhibición de la síntesis proteica y muerte celular sin invasión del enterocito. Es la primera causa de síndrome

hemolítico urémico (SHU) en la niñez, y una de las principales causas de insuficiencia renal aguda (IRA). (Fernández, 2003).

- *E. coli* enteroagregativa (ECEA): coloniza el colon. Se adhiere a las células epiteliales del colon con fimbrias de adherencia. Produce toxina termolábil y termoestable pero se desconoce el papel que desempeña en la patogenia. También se le denomina *E. coli* enteroaglutinante (Fernández, 2003).

- *E. coli* adherencia difusa (ECAD): produce diarrea acuosa. Puede haber pérdida significativa de agua y electrolitos. Se asocia con frecuencia a diarrea persistente. Este serotipo se ha aislado en algunos pacientes con diarrea con sangre (Fernández, 2003).

6.2 Propagación

Los brotes a menudo ocurren cuando la bacteria *E. coli* llega a los alimentos. Esta bacteria puede mezclarse accidentalmente con la carne molida antes de ser empaquetada. La bacteria puede propagarse en la carne que no ha sido cocida lo suficiente, aunque la carne se vea y huela normal. *E. coli* puede también vivir en las ubres de las vacas y puede llegar a la leche que no está pasteurizada (Teo Jesús, Cuevas Oscar, Navarro Carmen, Aracil Belén, Campos José y todos los miembros de la red REVERA-EARSS.resistencia a multiples antibióticos en *E. coli*. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid 2001-2007.)

Los vegetales crudos, los germinados y las frutas que se cultivaron o se lavaron con agua sucia pueden ser portadores de *E. coli* O157:H7. Esta bacteria puede encontrarse en el agua potable, los lagos o las piscinas con aguas residuales. También puede propagarse a través de las personas que no se lavan las manos después de ir al baño. La podemos encontrar en carne, cuando contiene la bacteria *E. coli* O157:H7 todavía tiene buen olor y apariencia, puede sobrevivir en la carne molida que no esté bien cocida.

Puede causar daños en los riñones permanentemente. Aunque esto no le ocurre a la mayoría de las personas, los niños menores de 5 años y las personas mayores de 65 años de edad enfrentan un mayor riesgo que los demás de sufrir problemas del riñón. (Teo Jesús, Madrid 2001-2007.)

6.3 Patogenia

La vía de transmisión *E. coli* es por contaminación fecal en alimentos, por procesos penetrantes (en especial por procesos penetrantes como lo son la meningitis neonatal), partos con traumatismo o prematuros con uso de instrumental contaminado. Auto infección de vías urinarias.

El sitio de acción es el intestino delgado en niños menores a 5 años, tracto urinario (un 90% de mujeres jóvenes), tracto intestinal, pulmones, meninges, peritoneo y en sepsias.

Virulencia: **1) mecanismo de adhesión:** antígeno K de las fimbrias, factores de colonización (CFA/I) y (CFA/II), fimbrias resistentes a manosa, fimbrias sensibles a manosa, adhesivas superficiales que no son fimbrias. **2) Endotoxinas (LPS):** Enterotoxinas termolábiles y termoestables, antígenos capsulares K, Agresina, Siderocromos, factores séricos de resistencia, factores de resistencia al complejo anticuerpo-complemento. **3) hemolisinas:** la alfa es atóxica para leucocitos pero inhibe la quimiotaxis y fagocitosis. **4) características especiales:** las fimbrias P disminuyen la posibilidad de ser fagocitadas, la exotoxina es causante de sepsis, la enterotoxina produce diarrea en el tubo digestivo, la termolábil provoca diarreas más fuertes que la termo estable. Las verotoxinas matan las células vero de los cultivos, esta última causa diarrea con sangre y síndrome hemolítico urémico.

6.4 Tratamiento

El uso de antibióticos es poco eficaz y casi no se prescribe. Para la diarrea se sugiere el consumo de abundante líquido y evitar la deshidratación. Sin embargo en algunas patologías como la pielonefritis hay que considerar el uso de alguna cefalosporina endovenosa.

El tratamiento es según el tipo de cepa que se trate pero generalmente se usa rehidratación TMP/MX (excepto en pielonefritis).

En 1999 se estimó que unas 73, 000 personas en los Estados Unidos se enfermarían cada año por *E. coli*. De estos casos se calcularon alrededor de 60 muertes y se cree que desde entonces el número de enfermedades y muertes ha disminuido. (T. Maldonado María, Betz Tom, 2005. texas department of state health services - infectious disease control unit. volume 65/No. 3)

La prevención se realiza usando técnicas de asepsia en métodos clínicos, evitar métodos innecesarios de penetración, vigilancia de consumo de agua potable, cocimiento perfecto de carnes, evitar consumir agua de lugares poco recomendables, el uso de agua fluoroquinolasa está indicada como profilaxis en individuos de alto riesgo.

7. Generalidades de microorganismo *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, pertenece a la familia *Pseudomonaceae*, del género *Pseudomonas* y especie *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa tiene tres formas de desplazarse, en medios líquidos se desplaza “nadando” mediante un único flagelo polar mientras que sobre las superficies tiene dos formas para moverse. Una de ellas es, independiente de la presencia del flagelo, por un mecanismo llamado de movilidad que depende de las fimbrias o pili tipo IV. La motilidad tipo nado se realiza en medios semi-sólidos y representa un movimiento concertado de las células en las que se vuelven alargadas y presentan flagelos (Soberón, 1996).

Tabla 2. Principales características de *Pseudomonas aeruginosa*

Características
Bacilos Gram-negativos
Mide de 0.5-1*2 um
Aerobio obligado
Móvil
Posee una cápsula de polisacáridos
No forma esporas
Crece bien en los medios comunes, agar simple, a 37-42 °C en condiciones aerobias (anaerobio en presencia de nitrato)
Reduce nitratos a nitritos
Forma colonias grandes y diseminadas, con bordes irregulares y consistencia buitrosa
Posee un olor similar a frutas o maíz
La oxidación de glucosas lleva a la formación de ácido
Es oxidasa positivo
No fermentativa
Produce pigmentos como: piocianina (azul oscuro), pioverdina (amarillo-verdoso), piomelanina (marrón-negro), piorubina (rojo)
Posee pilis produciendo diversas toxinas posee antígenos H y O

7.1 Clasificación

En el género *Pseudomonas* de acuerdo a la literatura se dividen en dos grupos por su acción metabólica.

- *Ps. fluorescens*: en este grupo encontramos a *Ps.aeruginosa*, *Ps.fluorescens*, *Ps.putida*.
- *Ps. no fluorescens*: *Ps. seudomallei*, *Ps.mallei*, *Ps.cepacia*, *Ps.maltophila*, *Ps.picketti*.

La capacidad para producir pigmentos como pioverdina (fluoresceína) y piocianina es una característica importante para la identificación de especies de *Pseudomonas*. Algunas de ellas elaboran sólo fluoresceína (ej. *Ps. fluorescens*) y otras ambos pigmentos (ej. *Ps. aeruginosa*). La piocianina solamente es producida por *Ps. aeruginosa* aunque no todas las cepas de esta especie la producen. Se han diseñado medios de cultivo que potencian la elaboración de uno de los pigmentos e inhiben la formación del otro.

El medio King A o *Pseudomonas* Agar P, potencia la elaboración de piocianina mientras que el King B o *Pseudomonas* Agar F, potencia la elaboración de fluoresceína e inhibe parcialmente la de piocianina. Estos pigmentos son solubles en agua y se difunden al medio. La piocianina es un pigmento azul-verde mientras que la fluoresceína es amarillo-verdoso y fluoresce cuando es expuesto a la luz UV ($\lambda=254$ nm). Existen pigmentos amarillo-verdosos producidos por algunas especies de *Pseudomonas* que no fluorescen (Soberón 1996).

7.2 Propagación

Presenta problemas en la industria alimentaria ya que puede descomponer los alimentos que se mantienen en refrigeración al mantener un metabolismo basal en estas condiciones y producir enzimas hidrolíticas. (Hardalo, 1997).

Generalmente, *Pseudomonas aeruginosa* es considerada como patógeno oportunista. Bajo ciertas condiciones esta bacteria puede infectar diferentes tipos de heridas, particularmente quemaduras, pero también el tracto urinario y respiratorio. Esta bacteria se asocia con neumonía, endocarditis, meningitis y algunas cepas producen grandes cantidades de polisacárido extracelular, las que se asocian a casos de fibrosis quística. (Callicó, 2004).

La virulencia de éstos agentes radica en su capacidad de colonizar varios sitios anatómicos humanos, la propiedad para invadir tejidos y producir daño tisular. Además de la tendencia característica de invadir torrente sanguíneo.

Ps. aeruginosa puede encontrarse produciendo: infecciones en piel de pacientes quemados, en esputos de pacientes con fibrosis quística y una gran variedad de infecciones (Hardalo 1997).

7.3 Patogenia

Es patógeno oportunista, existen 17 serotipos antigénicos. Posee pilis que le ayudan en la adhesión y colonización; las toxinas que produce son las siguientes:

Lipopolisacáridos de la pared celular con actividad antifagocítica y endotoxica, La toxina *leocosidina* que posee actividad contra leucocitos, hemolisinas extracelulares, termoestables (glucopéptido) y termolábiles (fosfolipasa C), La *erotoxina A*: determinante principal de virulencia, inhibe la síntesis de proteína por ADP ribosilación del factor de elongación 2. Su principal órgano blanco es el hígado. Exoenzimas S, enzimas proteolíticas (elastasa y proteasa).

La entidad clínica de esta bacteria son: neumonía, septicemia, dermatitis, endocarditis, afecta a pacientes con fibrosis quística, gastroenteritis, traqueobronquitis, bronconeumonía, necrotizante, infecciones en el oído, en quemaduras, tracto urinario, oculares y músculo esqueléticas.

En el género de *Pseudomonas* se encuentran también algunas otras especies como *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. syringae* y *Ps. alcaligenes*.

Ps. aeruginosa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza; se puede aislar de muestras de suelo, aguas contaminadas, así como de plantas y animales.

Se ha reportado el aislamiento de *Ps. aeruginosa* de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón (Hardalo, 1997).

La membrana externa de las bacterias Gram-negativas es una membrana semipermeable, formada principalmente por el lipopolisacárido, que permite la difusión de solutos hidrofílicos pequeños y tiene muy baja permeabilidad para los compuestos hidrofóbicos (Yoshimura, 1982). La permeabilidad de la membrana externa depende principalmente de las porinas, que son proteínas formadoras de poros con una baja especificidad, y de los sistemas de transporte específicos. La baja permeabilidad de las porinas de la membrana externa de *P. aeruginosa* tiene un papel importante en el alto nivel de resistencia natural a los antibióticos (Hancock, 1988).

Pseudomonas aeruginosa, al igual que otras bacterias cuenta con múltiples sistemas regulatorios que le permiten modificar la expresión de distintos genes en respuesta de cambios en el medio ambiente.

Cuando *Ps. aeruginosa* se adhiere a una superficie, las células se diferencian para formar micro colonias cubiertas por una matriz extracelular que eventualmente llegan a constituir una película (Hardalo, 1997).

Asimismo, *Ps. aeruginosa* presenta problemas en la industria alimentaria ya que puede descomponer los alimentos que se mantienen en refrigeración al mantener un metabolismo basal en estas condiciones y producir enzimas hidrolíticas (Hardalo, 1997).

7.4 Tratamiento

Cefalosporina de 3^o de generación, penicilina sintética, tobramicina, B-lactámico, antipseudomona (azlociclina, piperacilina o ceftazidim), ciprofloxacina, carbenicilina).

8. Pruebas de identificación bioquímica de microorganismos bacterianos

Las pruebas bioquímicas son un método utilizado para la identificación de bacterias de acuerdo a las características que presenta en sus acciones metabólicas.

8.1 TSI (Triple Sugar Iron)

El agar triple azúcar hierro es un medio nutriente y diferencial que permite estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa en un único medio. También permite la detección de la producción de H₂S. Es un medio útil para la identificación de enterobacterias.

8.2 Indol

El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La producción de indol es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos.

La prueba del indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando éste reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Esto es debido al principio activo del reactivo de Kovacs.

8.3 Agar hierro de Kligler (KIA)

Medio sólido y diferencial. El fundamento se basa en la capacidad de fermentación de dos azúcares (glucosa y lactosa), producción de ácido sulfhídrico (al entrar en contacto con el hierro del medio produce una coloración negra); además permite la detección de producción de gas.

8.4 Citrato de Simmons

La utilización de citrato como única fuente de carbono es una prueba útil en la identificación de enterobacterias. Esta se detecta en un medio de cultivo con citrato como única fuente de carbono mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento de pH se visualiza con el indicador azul de bromotimol que vira al alcalino a pH de 7.6.

El medio contiene citrato sódico, fosfato de amonio y azul de bromotimol como indicador; este se tornará azul cuando el medio se alcaliniza. Las bacterias que metabolizan el citrato liberan iones amonio al medio (degradación del fosfato amónico) lo que provoca que este se alcalinice y el indicador vire a azul.

8.5 LIA (Lysine iron agar)

Este ensayo permite diferenciar los microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina. Se puede detectar además la producción de H₂S. Es muy utilizado en las técnicas de búsqueda de *Salmonella*, principalmente para descartar otras bacterias que dan colonias de aspecto similar en los medios diferenciales utilizados durante el aislamiento selectivo.

Durante las primeras etapas de la incubación el fondo virará el indicador de pH del medio al ácido (amarillo) por la fermentación de glucosa. Luego, si el aminoácido es descarboxilado se formarán aminas que provocan un retorno al color original del medio o hacia un viraje al básico (color violeta).

En la desaminación se produce un ácido carboxílico y NH₃ y se visualiza en la superficie la aparición de un color rojo intenso. La producción de H₂S a partir de tiosulfato se visualiza por la precipitación de sulfuro ferroso de color negro.

Este medio pone de manifiesto:

- Si la bacteria posee la enzima descarboxilasa (LDC). El medio contiene como indicador púrpura de bromocresol, cuando la lisina se descarboxila, el medio se acidifica y el indicador vira a amarillo en el fondo.
- Si es productora de ácido sulfhídrico, en cuyo caso el precipitado negro nos impedirá ver si es LDC (+) o (-)
- Si es productora de gas

8.6 Descarboxilación de lisina y ornitina

La descarboxilación de aminoácidos es llevada a cabo por descarboxilasas y se forman aminas y CO₂. Cada descarboxilasa es específica para un aminoácido y la reacción es completa e irreversible. Los aminoácidos ensayados habitualmente para la identificación son lisina, ornitina y arginina.

El caldo descarboxilasa de Moeller es el medio base más comúnmente usado para la determinación de las descarboxilasas en enterobacterias. Se prepara un tubo con el medio conteniendo el aminoácido a ensayar y un tubo control con medio base sin aminoácido. Se cubren con una capa de aceite mineral (vaselina líquida) para hacer el medio anaerobio de manera que ocurra la fermentación de la glucosa que contiene. Durante las primeras etapas de la incubación en ambos tubos se observará viraje del indicador de pH del medio al ácido, por la fermentación de la glucosa. Luego, si el aminoácido es descarboxilado, se forman aminas que provocan un retorno al color original del medio o un viraje al alcalino.

8.7 Movilidad

Este es un medio semisólido que evalúa la capacidad motil de los microorganismos, ya que al sembrarse por picadura en el medio, si poseen la capacidad de dispersarse en la matriz del medio semisólido presentaran una turbidez que parte desde la zona de picadura, de no poseer motilidad, entonces el desarrollo del microorganismo se realizara solamente en la zona de picadura.

Los medios semisólidos que permiten detectar esta característica son los medios MIO (movilidad, indol ornitina) y SIM (azufre, indol movilidad), la evaluación de la utilización de la ornitina y detección de producción de indol se explicaron anteriormente. La inclusión de azufre en el medio SIM cumple con la finalidad de detectar la producción del mismo por medio de la formación de complejos oscuros del azufre con el hierro contenido en el medio

8.8 Ureasa

La urea es una diamida del ácido carbónico que puede ser hidrolizada con liberación de amoníaco y dióxido de carbono.

La ureasa es una enzima que poseen muchas especies de microorganismos que pueden hidrolizar urea de acuerdo a la siguiente reacción química:



El amoníaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, produciendo una alcalinización y aumento de pH del medio.

Pone de manifiesto la actividad de la enzima ureasa, para degradar la urea en dos moléculas de amoníaco. El medio lleva como indicador rojo fenol, que se torna amarillo cuando es negativo y rosa cuando es positivo. Hay que tener precaución por que también puede ocurrir que no se produzca cambio de coloración, en este caso es negativo. El medio posee un color rosáceo (mucho menos intenso que los verdaderos positivos) lo que puede llevarnos a error (considerar falsos positivos).

El caldo urea y agar urea de Christensen son los dos medios más comúnmente usados en los laboratorios para la detección de la ureasa de microorganismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

ETAPA I: Identificación y caracterización físico-química de las cepas

1. Identificación de los microorganismos

1.1 Características microscópicas de las cepas empleadas de acuerdo a sus propiedades de tinción

Se empleo la técnica de tinción de Gram para analizar las características microscópicas de los microorganismos empleados. Para ello se tomó una asada del cultivo y se suspendió en un portaobjetos que poseía una gota de agua destilada, se homogenizó la suspensión de bacterias y se extendió un poco en el portaobjetos; posteriormente se fijó la muestra con al calor.

Una vez fijada y seca la preparación, se cubrió por completo la superficie, donde se encontraba la muestra, con cristal violeta ó violeta de genciana dejándolo reaccionar por 1 minutos y se enjuagó suavemente al chorro del agua; se cubrió de nuevo la superficie con una solución de yodo (lugol) y se dejó reaccionar por 1 minuto; se enjuagó suavemente y se decoloró con una solución de alcohol-acetona (50/50 v/v) por unos cuantos segundos para después enjuagarse de inmediato. Finalmente se cubrió la superficie de la preparación con una solución de safranina y se dejó actuar por 1 minuto para finalmente enjuagar con agua destilada.

Se dejó secar la preparación por completo para después observar los microorganismos teñidos empleando un microscopio óptico (OLIMPUS) a 100X con aceite de inmersión.

1.2 Proliferación y mantenimiento de las cepas

1.2.1 Preparación agar P y F para *Pseudomonas aeruginosa*

Agar P y F (Bioxon) fueron preparados en cajas petri para su identificación morfológica, empleando 3.48 g/L de agar y 0.75 g de glicerol, y 2.85 g de agar adicionado de 0.75 g de glicerol para agar P y F, respectivamente. Ambos fueron esterilizados en una autoclave (PRESTO) a 121°C Y 15 lb de presión por 15 minutos.

1.2.2 Preparación de agar EMB para *E. coli*

Se pesaron 7.2 g/L de agar EMB (Bioxon) y se disolvieron en 200 ml de agua destilada. Una vez precalentado el agar se esterilizó empleando una autoclave (PRESTO) a 121°C por un tiempo de 15 min a 15 Lb de presión.

1.2.3 Crecimiento en medio sólido

Se sembró mediante la técnica de estría abierta cruzada. Las cajas fueron incubadas empleando una incubadora (LAB-LINE^RINCUBATOR-SHAKER) a una temperatura de 37°C monitoreando su crecimiento a las 24 y 48 horas.

1.2.4 Crecimiento en medio líquido

En 250 ml de caldo nutritivo a pH 7.0 se inocularon con 0.3 ml de una suspensión celular bacteriana obtenida de un cultivo puro en tubo; posteriormente se incubó a 37 °C con una agitación de 150 rpm, monitoreando la cinética a tiempos de 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas.

Cada una de las alícuotas tomadas (1.5 ml) fue leída mediante turbidez empleando un espectrofotómetro (Genesys 5) a 590 nm (región visible).

2. Identificación de las cepas mediante pruebas bioquímicas

El agar se prepara en forma de pico de flauta. Esto determina que existan dos cámaras de reacción dentro del mismo tubo. La porción inclinada (pico) expuesta en toda su superficie al oxígeno es aerobia y la porción inferior (fondo) está protegida del aire y es relativamente anaerobia.

2.1 TSI

Se pesaron 0.594 g/L del agar TSI (Sigma) y se disolvieron en un tubo de ensaye con 10 mililitros de agua, posteriormente se fundieron. Se esterilizó con calor húmedo en autoclave (PRESTO) a 121°C, por 15 minutos a 15 Lb de presión. Posteriormente se inclinó en forma de pico de flauta.

2.2 KIA

0.55 g/L de agar KIA (Sigma) fueron pesados, y se disolvieron en 10 ml de agua destilada. Se esterilizó con calor húmedo en autoclave a 121°C, por 15 minutos a 15 Lb de presión. Posteriormente se inclinó en forma de pico de flauta.

2.3 Citrato de Simons

En 10 ml de agua destilada se disolvieron 0.242 g/L de citrato de Simons (Sigma). Se esterilizó con calor húmedo en autoclave a 121°C, por 15 minutos a 15 Lb de presión. Posteriormente se inclinó en forma de pico de flauta.

2.4 MIO

El medio se preparó pesando 0.31 g/L del agar MIO (Sigma), disolviéndolos en 10 ml de agua destilada. Posteriormente se esterilizó con calor húmedo en autoclave a 121°C, por 15 minutos a 15 Lb de presión. Posteriormente se inclinó en forma de pico de flauta.

2.5 LIA

Se pesaron 0.345 g/L del agar LIA (Sigma), y se disolvieron en 10 ml de agua destilada. Posteriormente se esterilizó con calor húmedo en autoclave a 121°C, por 15 minutos a 15 Lb de presión. Posteriormente se inclinó en forma de pico de flauta.

2.6 Urea

En 10 ml de agua destilada se disolvieron 0.387 g/L de agar Urea (Sigma) Esta prueba hace la excepción del esterilizado ya que de lo contrario incurrimos en una desnaturalización.

2.7 SIM

Se pesaron 0.3 g/L de agar SIM (Sigma), y se disolvieron en 10 ml de agua destilada. Posteriormente se esterilizó con calor húmedo en autoclave a 121°C, por 15 minutos a 15 Lb de presión. Posteriormente se inclinó en forma de pico de flauta.

ETAPA II: Estudio del efecto inhibidor de los oligosacáridos de quitosán

1. Proliferación de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con el inhibidor (OQ)

1.1 Preparación de medio sólido con el inhibidor

El agar nutritivo fue adicionado con concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 % de OQ (Amicogen, Korea del Sur) con un peso molecular de 3 kDa. Para evitar problemas de contaminación los OQ fueron sometidos a radiaciones UV por 12 h antes de usarlos.

En 60 ml de agua destilada fue disuelto 1.38 g de agar nutritivo. El medio fue esterilizado con calor húmedo en autoclave (PRESTO) a 121°C, por 15 minutos a 15 Lb de presión. Una vez que el medio alcanzó temperatura por debajo de los 40°C, se adicionaron las diferentes concentraciones de OQ (0.5, 1.0 y 1.5%) filtrados por membranas de celulosa de 0.45 µm.

Se monitoreó el crecimiento microbiano por el número más probable a tiempos de 0, 12, 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C.

1.2 Preparación de medio líquido con O.Q

El caldo nutritivo fue adicionado con concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 % de OQ (Amicogen, Korea del Sur) con un peso molecular de 3 kDa. Para evitar problemas de contaminación los OQ fueron sometidos a radiaciones UV por 12 h antes de usarlos.

En 60 ml de agua destilada fue disuelto 0.32 g de caldo nutritivo. El medio fue esterilizado con calor húmedo en autoclave a 121°C, por 15 minutos a 15 Lb de presión. Una vez que el medio alcanzó temperatura por debajo de los 40°C, se adicionaron las diferentes concentraciones de OQ (0.5, 1.0 y 1.5%) filtrados por membranas de celulosa de 0.45 µm

Se monitoreó el crecimiento microbiano mediante turbidez empleando un espectrofotómetro (Genesys 5) a 590 nm.

RESULTADOS

ETAPA I: Identificación y caracterización físico-química de las cepas

1. Identificación de los microorganismos

Las cepas *E. coli* y *Ps. aeruginosa* fueron aisladas e identificadas por Mauricio-Benavides *et al.*, en el 2005 de agua de la Poza Azul (26° 59´ Norte, y 103° 3´ Oeste) de Cuatrociénegas Coahuila.

1.1 Tinción de Gram

E. coli y *Pseudomonas aeruginosa* son microorganismos Gram (-) ya que se tiñeron de color rojo, esto es debido a que poseen una pared celular muy compleja que contiene una capa delgada de peptidoglicano, el cual es incapaz de retener el colorante cristal violeta-yodo por lo que la célula se decolora. En el caso de las bacterias Gram positivas, a causa de las paredes celulares más espesas (tienen mas peptidoglicano y menos lípidos), no son permeables al disolvente ya que éste deshidrata la pared celular y cierra los poros, disminuyendo de esta manera los espacios ente las moléculas, y provocando que el complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular. Una vez que se realiza la decoloración con alcohol cetona las bacterias Gram positivas son todavía azules, pero las Gram negativas son incoloras por lo que se emplea a la safranina para dar contraste (Bergey, 2005).

La pared celular de las bacterias Gram negativas, por contener una capa delgada de peptidoglicano, se encuentra rodeada por una membrana exterior formada de fosfolípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas.

1.2 Proliferación y mantenimiento

Pseudomonas aeruginosa es uno de los patógenos más comúnmente aislado; es una especie clínica no fermentativa en forma de bacilo. Este microorganismo tiene la capacidad de producir pigmentos no solubles en agua, incluyendo el pigmento verde-amarillo o amarillo-café fluorescente denominado pioverdina. Cuando la pioverdina se combina con la piocianina (pigmento azul soluble en agua) se forma el color verde brillante que es característico de la cepa *Ps. aeruginosa*. El agar F resalta la producción de fluoreseína (Figura 4) producido por *Ps. aeruginosa* e inhibe la formación de piocianina. Ambos pigmentos son difundidos por las colonias de *Ps. aeruginosa* en el medio al momento de su crecimiento. Estos pigmentos pueden ser observados bajo la luz UV.



Figura 4. Crecimiento celular de *Pseudomonas aeruginosa* en agar F observada bajo luz UV

En la Figura 5 podemos observar la capacidad de oxidación de la eosina y la formación del compuesto verdoso brillante que caracteriza a *E. coli*. Se aprecian colonias de 2 a 4 mm de diámetro, con un centro grande de color oscuro e incluso de color negro; presenta brillo verde metálico cuando se observan bajo la luz polarizada. Este color metálico es debido a las grandes

cantidades de ácido que produce *E. coli* en el agar. El ácido causa la formación de un enlace amido entre la eosina y el azul de metileno otorgándole el brillo característico. El brillo es visible solamente cuando el microorganismo crece en abundancia, ya que cuando se presentan colonias aisladas no es visible (Bergey 2005).



Figura 5. Crecimiento celular de E. coli en agar EMB

1.3 Crecimiento en medio líquido

Las bacterias enfrentan constantes condiciones que limitan o impiden su crecimiento. La habilidad para colonizar un ambiente requiere de la capacidad del microorganismo para alternar periodos de rápida división celular y de crecimiento nulo. La curva normal de crecimiento bacteriano presenta 4 fases: a) fase de transición o “lag”, 2) fase logarítmica o exponencial, 3) fase de transición o estacionaria, y 4) muerte celular. En la primera fase (lag) nos indica el tiempo necesario para reiniciar el ciclo celular después de un periodo de ayuno nutricional. En la Figura 6 podemos observar que el cultivo celular de *E. coli* se inicia en los primeros minutos posteriores a la inoculación, donde se sugiere que cultivo recupera la tensión helicoidal del ADN y se incrementa la

expresión de los genes importantes para el crecimiento originándose la primera división de la mayoría de las células. En la fase exponencial se lleva a cabo un crecimiento balanceado, el cual está representado por un periodo donde se abundan los nutrientes y el microorganismo recupera el ciclo celular incrementando su número de manera exponencial. Existe también una fase de transición o de crecimiento no balanceado, la cual se inicia cuando disminuyen los nutrientes cambiando la pendiente de la curva de crecimiento exponencial disminuyendo la velocidad de síntesis de macromoléculas. Finalmente, cuando los nutrientes se agotan, las células entran a la fase de muerte.

Reportes en la literatura menciona que *E. coli* presenta una fase logarítmica a partir de las 3 h de fermentación prolongándose hasta las 30 h, por lo que estos resultados coinciden con los presentados por Santos (2005) ya que se observa la fase exponencial hasta las 24 h (Figura 7) con una velocidad específica de crecimiento de 0.0378 DO/h (Figura 6).

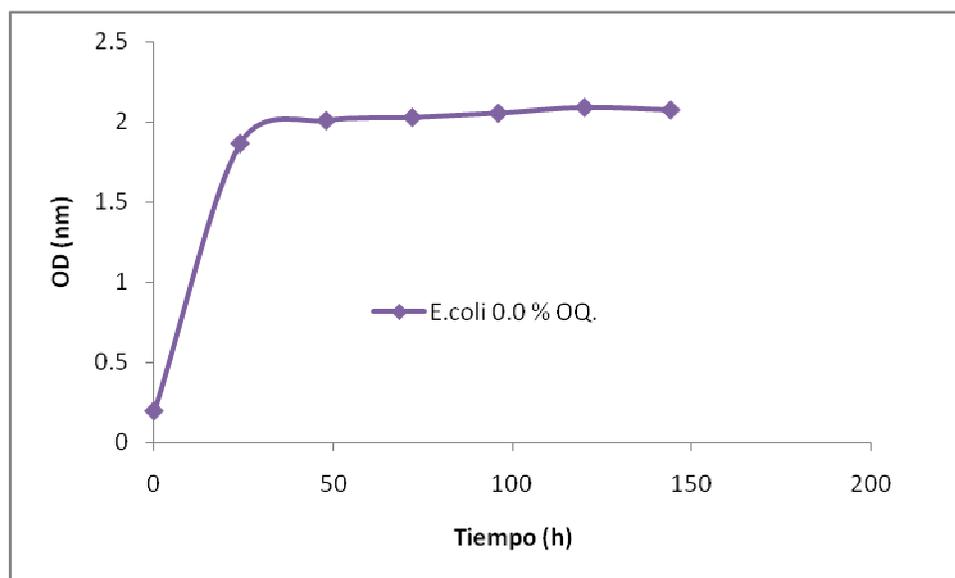


Figura 6. Cinética de crecimiento celular de *Pseudomonas aeruginosa* en caldo nutritivo

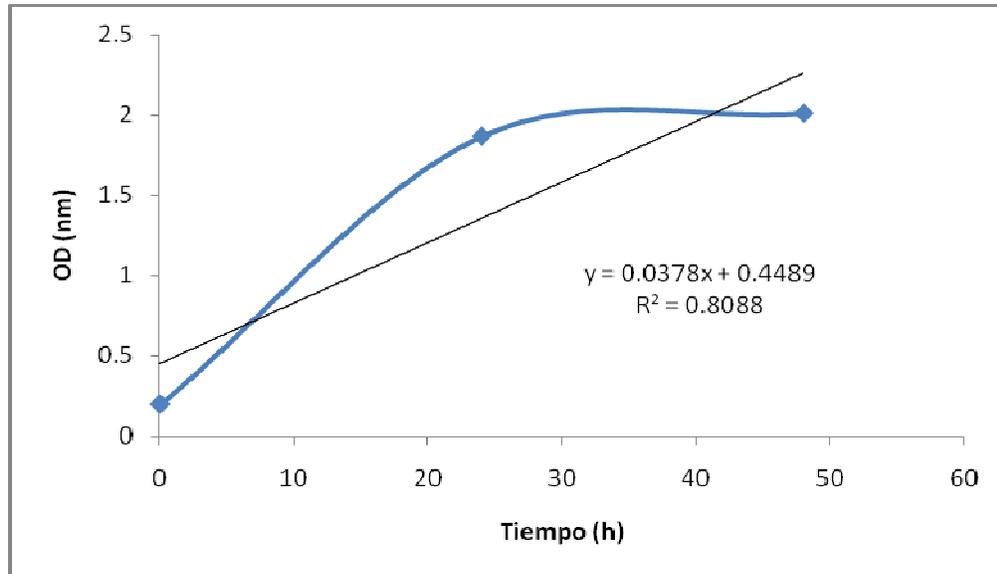


Figura 7. Determinación de velocidad específica de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*

Por otro lado, para *Pseudomonas aeruginosa* presenta una fase de crecimiento logarítmico a partir de las 4 h, teniendo su máximo a las 48 h de fermentación, sin embargo, en la Figura 8 se puede apreciar que a partir de las 50 h hay un decremento en el número de microorganismos. Este microorganismo presenta una velocidad específica de crecimiento de 0.0289 OD/h (Figura 9).

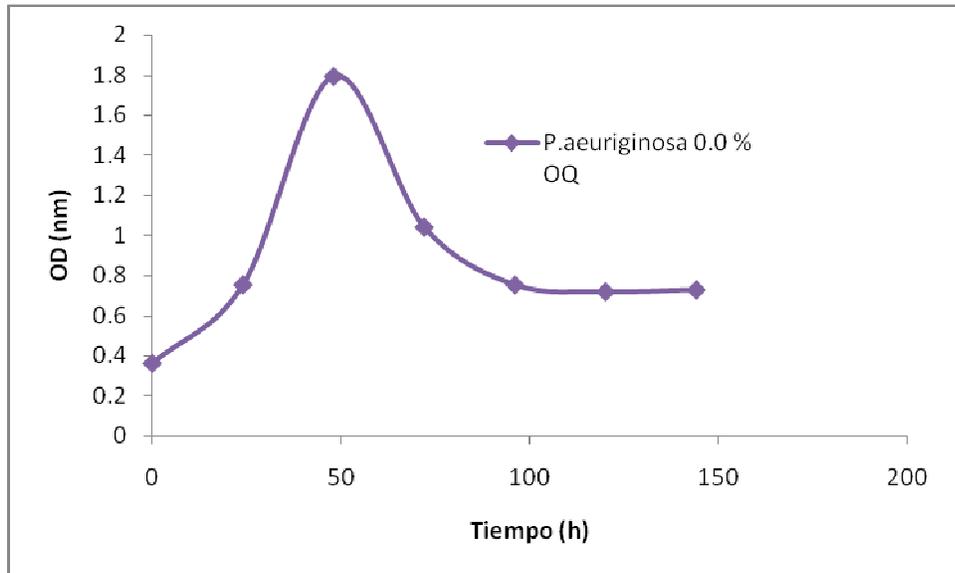


Figura 8. Efecto sobre *E. coli* en medio sólido con 0.5 % de inhibidor

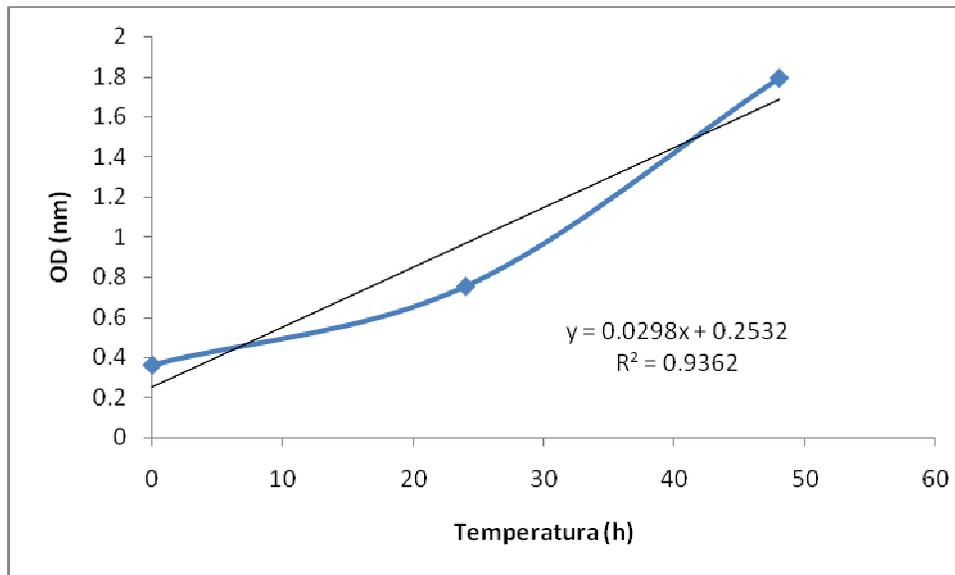


Figura 9. Efecto sobre *E. coli* a concentración de 1.0 % de OQ.

2. Identificación de las cepas mediante pruebas bioquímicas

2.1 *E. coli*

Las pruebas bioquímicas determinan la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer incorpora o no.

Las tablas 3 y 4 indican los resultados del metabolismo de *E. coli* mostrando que el microorganismo analizado es lisina descarboxilasa positiva, ornitina descarboxilasa dudosa, citrato negativo, H₂S negativo, indol positivo, glucosa positiva, reducción de nitratos a nitritos negativo, fermentativo y oxidativo, móvil (algunas veces inmóvil), oxidasa negativo y, urea negativo. Por lo que los resultados obtenidos coinciden con los presentados en la literatura para el metabolismo característico de *E. coli* (Bergey, 2005).

Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas para *E. coli* a las 24 h

Prueba bioquímica						
TSI	KIA	CITRATO	MIO	LIA	SIM	UREA
Sac-glu (-)	Glu (-)	(-)	Movilidad (+)	Descarboxilación	Indol (+)	(-)
Lact (+)	Lact (+)			(+)		
H ₂ S (-)	H ₂ S (-)		Indol	Desaminación (-)	H ₂ S (-)	
Gas (+)	Gas(+)		Ornitina(-)		Movilidad (+)	

Tabla 4. Resultados de la pruebas bioquímicas para E. coli a las 48 h

Prueba bioquímica						
TSI	KIA	CITRATO	MIO	LIA	SIM	UREA
Sac. (-)	Glu. (-)	(-)	Movilidad	Descarboxilación(+)	Indol (+)	(-)
Gluc (-)	Lact.(+)		(+)			
Lact(+)						
H ₂ S (-)	H ₂ S (-)		Indol (+)	Desaminación (-)	H ₂ S (-)	
Gas(+)	Gas(+)		Ornitina (+)		Movilidad(+)	

2.2 Pseudomonas aeruginosa

Las tablas 5 y 6 muestran los resultados obtenidos del metabolismo fermentativo de *Pseudomonas aeruginosa* a las 24 y 48 h respectivamente. Observamos que este microorganismo es no móvil; oxidación, urea, descarboxilación, H₂S, lisina y ornitina negativo; y citrato positivo. Por lo que coincide con el metabolismo presentado por *Pseudomonas aeruginosa* (Bergey, 2005).

Tabla 5. Resultados de las pruebas bioquímicas para Pseudomonas aeruginosa a las 24 h

Prueba bioquímica						
TSI	KIA	CITRATO	MIO	LIA	SIM	UREA
Sac(-)	Sac(-)	(+)	Movilidad	Descarboxilación	Indol (-)	(-)
Glu (-)	Glu(-)		(-)	(-)		
Lac(+)	Lact(+)					
H ₂ S(-)	H ₂ S (-)		Indol	Desaminación (-)	H ₂ S (-)	
Gas (-)			Ornitina(-)		Movilidad(-)	

Tabla 6. Resultados de la pruebas bioquímicas para Pseudomonas aeruginosa a las 48 h

Prueba bioquímica						
TSI	KIA	CITRATO	MIO	LIA	SIM	UREA
Sac-	Glu-	(+)	Movilidad	Descarboxilación	Indol(-)	(-)
Glu-	Lact(+)		(+)	(-)		
Lact(+)						
H ₂ S (-)	H ₂ S (-)		Indol	Desaminación (-)	H ₂ S (-)	
Gas (+)			Ornitina(-)		Movilidad	
					(-)	

ETAPA II: Estudio del efecto inhibidor de los oligosacáridos de quitosán

1. Proliferación de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con el inhibidor (OQ)

1.1 Preparación de medio sólido con el inhibidor

En la Figura 9 se observa que al emplear una concentración de 0.5% de inhibidor, no se presenta crecimiento de *E. coli*, sin embargo, a la concentración de 1.0 y 1.5% (Figura 11 y 12, respectivamente) se observó crecimiento celular después de las 96 h, lo cual puede ser debido a que el microorganismo después de cierto tiempo incorpora al inhibidor y empieza a producir enzimas que facilitan el desdoblamiento del inhibidor y lo incorpora a su metabolismo empleándolo como fuente de carbono alternativa, es decir, a la concentración mas baja se presenta un efecto bactericida sobre la bacteria, mientras que en concentraciones altas no se observa inhibición total, por lo que a estas concentraciones presenta un efecto bacteriostático.

Reportes en la literatura mencionan que el quitosán ha sido aplicado para inhibir el crecimiento contra varias bacterias como *Pediococcus*, *Candida*, *Actinobacillus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* (Devlieghere, 2004).

Los OQ tienen un efecto antimicrobiano contra dos bacterias patógenas orales tales como *Actinobacillus*, y *Streptococcus mutans* a bajas concentraciones y tiempos muy cortos.



Figura 10. Efecto sobre *E. coli* en medio sólido con 0.5 % de inhibidor

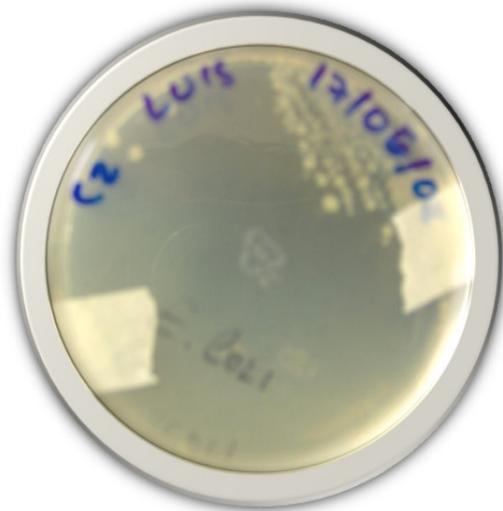


Figura 11. Efecto sobre *E. coli* en medio sólido con 1.0 % de inhibidor



Figura 12. Efecto sobre *E. coli* a concentración de 1.5 % de OQ.

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* se observó un crecimiento uniforme después de haber sido incubado por tiempos de 12, 24, 48 y 96 h con el inhibidor a la concentración mas baja (0.5%), sin embargo, en la concentración de 1.5% de inhibidor podemos observar que disminuye drásticamente el número de microorganismos en el medio, lo que indica un efecto bacteriostático.



Figura 13. Efecto sobre *Pseudomonas aeruginosa* a concentración de 0.5 % de OQ.



Figura 14. Efecto sobre *Pseudomonas aeruginosa* a concentración de 1.0 % de OQ.



Figura 15. Efecto sobre *Pseudomonas aeruginosa* a concentración de 1.5 % de OQ.

1.2 Preparación de medio líquido con inhibidor

En la Figura 17 podemos observar el comportamiento de la cinética de crecimiento de la cepa *E. coli* inoculada en caldo nutritivo con 2 concentraciones de inhibidor (0.5 % y 1.0 %). Se observa claramente que a concentraciones de 0.5 % desde el tiempo cero, los OQ tienen un efecto negativo en el crecimiento del microorganismo, es decir, se presenta un efecto bactericida. Estos resultados coinciden con los obtenidos en medio sólido a esta misma concentración. Sin embargo, a la concentración de 1.0% podemos observar que a las 12 h se presenta una inhibición de crecimiento de *E. coli*; sin embargo, el método estadístico empleado demuestra que no existen diferencias significativas entre el uso de la concentración de 0.5 y 1.0%, por lo que para efectos de producción se recomienda emplear la concentración mas baja debido al costo del inhibidor.

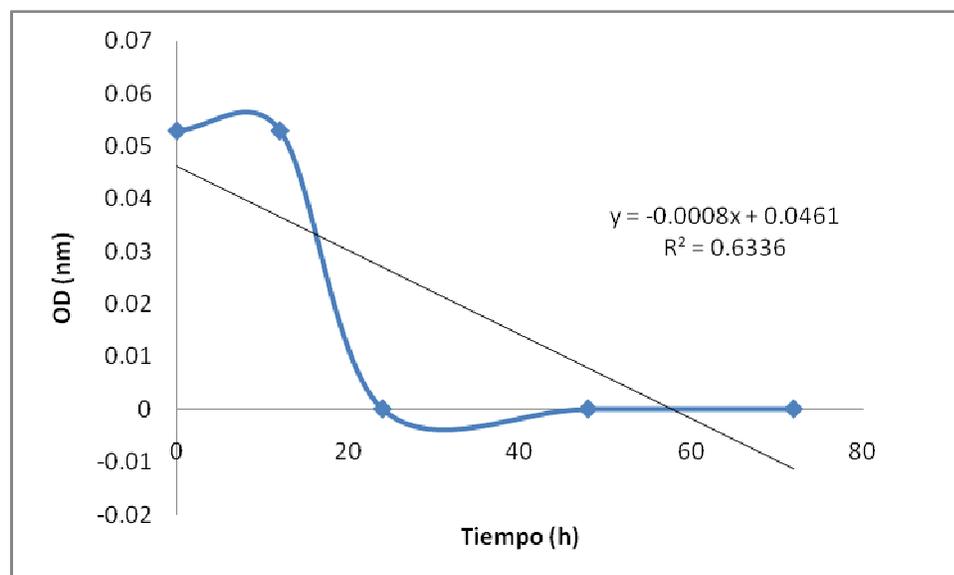


Figura 16. Estudio del efecto del inhibidor a 0.5% sobre *E. coli*

En la Figura 16 observamos el comportamiento de la *E. coli*, la cual presenta una fase logarítmica a las 24 horas, después comienza una fase estacionaria a partir de las 48 h. Empleando una concentración de 0.5% de inhibidor a las 12 h se presenta una velocidad específica de crecimiento baja (0.0008 OD/h), lo cual indica un efecto bactericida debido a su baja velocidad de crecimiento en presencia del inhibidor. Sin embargo, empleando una concentración de inhibidor de 1.0% observamos que no existió crecimiento celular en tiempos de 0, 12 24, 48 y 72 horas, por lo tanto, los OQ presentan un efecto bactericida.

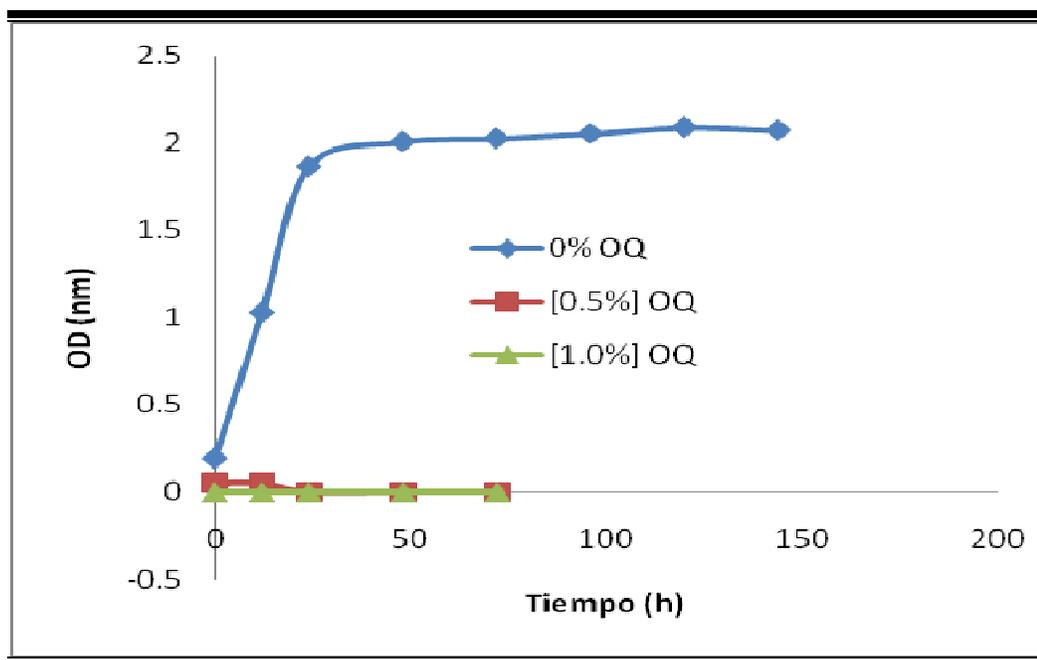


Figura 17. Estudio del efecto del inhibidor a 0%, 0.5% y 1.0% sobre E. coli

En la Figura 18 se presenta el efecto del inhibidor a diferentes concentraciones sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Se emplearon concentraciones de 1.0 y 1.5% del inhibidor en el medio específico, observando un crecimiento mínimo a las 48 h, con una velocidad específica para las concentraciones de 1.0 y 1.5, respectivamente. Esto nos indica que el inhibidor

tiene un efecto bacteriostático sobre *Ps. aeruginosa*. El efecto antimicrobiano que presenta el inhibidor puede ser debido a varios factores, como pueden ser: el tipo de quitosán o derivados, el grado de acetilación, el grado de polimerización y de algunas propiedades físicas y químicas (Shibasaki, 1994). Este proceso de inhibición de crecimiento puede ser explicado mediante la teoría de cambios en la permeabilidad de la membrana debido a la interacción entre las cargas positivas de los oligosacáridos de quitosán (inhibidor) y las cargas electronegativas de la pared celular (Chen, 1998).

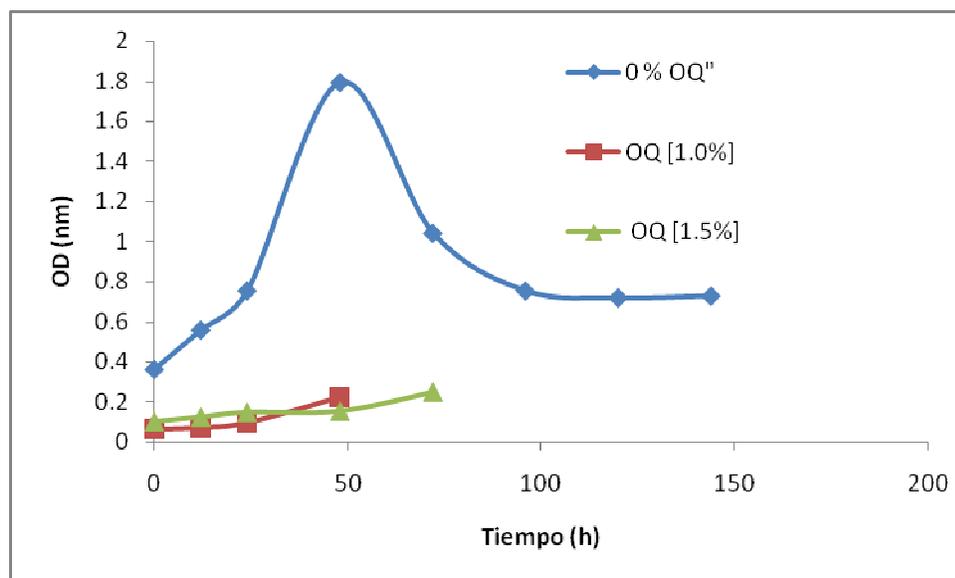


Figura 18. Estudio del efecto del inhibidor a diferentes concentraciones sobre *Ps. aeruginosa*

CONCLUSIONES

Las pruebas bioquímicas son una herramienta útil para la determinación del metabolismo de los microorganismos.

El comportamiento metabólico de los microorganismos estudiados certificó que el género y especie de los mismos fueron *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Los oligosacáridos de quitosán presentan un efecto bacteriostático sobre *Ps. aeruginosa* en concentraciones de 1.0 y 1.5%, obteniéndose un retraso en el crecimiento de 72 horas.

Los oligosacáridos de quitosán presentan un efecto bactericida sobre *E. coli* en concentraciones de 0.5 %.

El efecto inhibitorio de los oligosacáridos en medio líquido se aprecia mejor que en medio sólido, debido a que en este último se presenta el fenómeno de gradiente de concentración.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ainaga Logroño María Jesús, Shock endotoxico: Hepatotixidad. Acción directa del lipopolisacarido de *E. coli* sobre distintos tipos celulares hepáticos. Universidad Complutense de Madrid Servicio de Reprografía, Raffaella Pagani Balletti, María Teresa Portoles Pérez, Universidad Complutense de Madrid (España). Publicado por Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones, 1992.
2. Beltrán Hernández Yaima. 2004. La quitina y el quitosán: polisacáridos animales de gran importancia. Cuba, Ciudad Habana.
3. Callicó Adriana, Cedré Bárbara, Sifontes Sergio, Torres Vismar, Pino Yadira, H. Callís Ana, Esnard Sara C. 2004. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.
4. Caprile María Daniela Obtención y Utilización de Quitina y Quitosano a partir de desechos de Crustáceos Dirección Postal: España 626 – 8000 Bahía Blanca 2004.
5. Castro Miranda, P. La quitina y su potencial industrial. 2000.
6. Centro Nacional de Epidemiología, Brote de gastroenteritis por e. Coli 0157: H7 en diferentes escuelas de Cataluña. Editado por Centro Nacional de Epidemiología (España), Centro Nacional de Epidemiología (España). 2001.
7. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, 1600 Clifton Rd, Atlanta, GA 30333, USA 10 DIC.2006.
8. Charles-Rodríguez, A. V., *et al.*, 2008. Chitosanase production by a new bacterial sources. *Research Journal of Biological Science* 3(8); 957-963.
9. Chen Shuiping, Guozhong Wu, Hongyan Zeng. 2005. Preparation of high antimicrobial activity thiourea chitosan–AgC complex. Department of Food Science, Xiangtan University, China.
10. Chen, C. S. (1998). *Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and applications to oyster preservation*. *Journal of Food Protection*, 61:1124-1128.

11. Chitin and Chitosan Market Worldwide: Annual Production Estimates for 2000-2010. Pub. Time: (2003/2005). Global Industry Analyst, Inc.
12. Choi, Bong-Kyu, Kwang-Yoon Kim, Yun-Jung Yoo, Suk-Jung Oh, Jong-Hoon Choi, Chong-Youl Kim. 2001. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. International Journal of Antimicrobial Agents 18 553–557.
13. Conde Mónica, Las promesas de la quitina, Revista Ambiente plástico, 16 mayo 2007.
14. Devlieghere, F. *et al.* Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. 2004 Food Microbiology.
15. Encarta 2009.
16. Escobar Duque María Beatriz. Coliformes y *E. coli*. 1991
17. Escobar Duque María Beatriz. Enfermedades transmitidas por *E. coli*. Publicado por Universidad de Antioquia, Facultad Nacional de Salud Pública, 1984.
18. Fernández Ferrán Raquel, Rodríguez Pérez Carlos, Isis de los A. Rodríguez Ribalta y Gómez Martínez Freddy. 2003. *Escherichia coli* como causa de diarrea infantil. Rev Cubana Pediatría.
19. Fito Pedro. Introducción al secado de alimentos por aire caliente. Maypoy. 2001 universidad politécnica de valencia
20. Garmendia J, Frankel G y Crepin VF. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. Mayo 2005
21. Gil, Gabriela. 2004. Selective antimicrobial activity of chitosan on beer spoilage bacteria and brewing yeasts. Biotechnology Letters 26: 569–574.
22. González Enrique A., Jorge Blanco . Propiedades de los escherichia coli causantes de diarrea en seres humanos: E. Coli Enterotoxigénicos (etec), enteropatógenos clásicos (epec) y enteroinvasivos (EIEC), Universidad de Santiago de Compostela Publicado por Universidad de Santiago de Compostela, 1987.

23. González García Enrique A. Colaborador Isabel Bernárdez Hermida Mecanismos de patogénesis de "escherichia Coli": Propiedades enterotóxicas y adhesivas de los "e. Coli" enterotoxigénicos (ETEC) y enteropatogénicos (EPEC) de origen humano: estudio prospectivo sobre la incidencia de los ETEC y EPEC en la diarrea infantil en Galicia Publicado por Universidad, Facultad de Biología, 1984.
24. Gutiérrez Bello, José ciencia biológica: principios generales de los alimentos 2000.
25. Hadwiger, L.A. (1986). Chitosan both activated genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi. In R.A. A. Muzzarelli
26. Hancock, R. E. W., & W. A. Woodruff. 1988. Roles of porin and beta-lactamase in intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infect. Dis. 10: 770-775.
27. Hardalo, C. & S. C. Edberg 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. Crit. Rev. Microbiol. 23: 47-75.
28. Hu S.-G., C.-H. Jou, M.-C. Yang, *biocompatibility and antibacterial activity of chitosan and collagen immobilized poly (3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid)*. National Taiwan University. 25 de junio de 2004.
29. José Abril, Vanaclocha Casp Ana. 2003. Proceso de Conservación de Alimentos 2da. Edición.
30. Kailash C. Gupta and Majeti n. V. Ravi Kumar. An Overview on Chitin and Chitosan Applications with an Emphasis on Controlled Drug Release Formulations. J.M.S.REV. MACROMOL. CHEM. PHYS., C40(4), 273–308 (2000)
31. Kima Se-Kwon, Pyo-Jam Parkb, Won-Kyo Junga, Hee-Guk Byunb, Eresha Mendisa, Young-In Cho. Inhibitory activity of phosphorylated chitooligosaccharides on the formation of calcium phosphate. Carbohydrate Polymers 60 (2005) 483–487 4 de Marzo del 2005.
32. Llovet Pellejero Teresa, Epidemiología molecular de las bacterias enteropatógenas del grupo e. Coli-shigella[microforma]. Universidad Autónoma

- de Barcelona Facultad de Ciencias. Publicado por Publicacions de la Universitat Autònoma de Barcelona, 1996
33. Madrid Vicente Antonio, Juana Mary Madrid Vicente, Fernando Santiago regidor. Refrigeración, congelación y envasado de alimentos. 2003 Mundi-prensa.
 34. Muzzarelli R. A. A., C. Lough, and M. Emanuelli, *Carbohydr. Res.*, 164, 433 (1987) of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 23: 47-75.
 35. Oteo Jesús, Cuevas Oscar, Navarro Carmen, Aracil Belén, Campos José y todos los miembros de la red REVERA-EARSS.resistencia a multiples antibióticos en E. coli. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid 2001-2007.
 36. Roberts, F.A. (1991). *Chitin Chemistry*, Macmillan, Press, London, UK.
 37. Sekiguchi, S., *et al.* (1994). *Molecular weight dependency of antimicrobial activity by chitosan oligomers*. In: Nishinari, K., editors. *Food hydrocolloids: structures. Properties and functions*. New York:Plenum Press. 71-6.
 38. Shibasaki, K., *et al.*, (1994). *Effects of low molecular chitosan on pH changes in human dental plaque*. *Bull Tokyo Dent Coll*, 35:33-9.
 39. Soberón Gloria *Pseudomonas aeruginosa* Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
 40. Sun T. *et al.* Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives / *Carbohydrate Polymers*. 28 October 2004.
 41. Sun Tao, Xie Wenming, Xu Peixin Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives, 28 October 2004
 42. T. Maldonado María, Betz Tom, 2005. texas department of state health services - infectious disease control unit. volume 65/No. 3)
 43. Texas Department of State Health Services - Infectious Disease Control Unit, October 12 2005.
 44. Urchida, Y. *et al* (1994). Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its applications. In: SkjakBroek, G., *et al.* (1989). *Chitin and*

chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. London: Elsevier Applied Science, 373-82.

45. Wasson, Robert Gordon / Hofmann, Albert / Ruck, Carl A. P. (1978): *The Road to Eleusis: Unveiling the Secret of the Mysteries (Ethno-Mycological Studies, No. 4)*. Harcourt.
46. Yoshimura, F. and H. Nikaido. 1982. Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *J. Bacteriol.* 152: 636-642.