



Universidad de Jaén
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS CÁRNICOS

Alumno: Isabel Medina Rayo

Junio, 2020



Universidad de Jaén
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS CÁRNICOS

Alumno: Isabel Medina Rayo

Una firma manuscrita en tinta azul que dice "Isabel".

Junio, 2020

ÍNDICE:

1. RESUMEN	4
2. ABSTRACT	4
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1 Importancia de la seguridad alimentaria.....	5
3.2 Posibles vías o causas de contaminación del alimento.....	7
3.3 Microorganismos frecuentes en alimentos cárnicos	9
3.3.1 Bacterias Gram negativas en carne.....	9
3.3.2 Bacterias Gram positivas en carne	13
3.4 Antibióticos y mecanismos de resistencia	16
4. OBJETIVOS	17
5. MATERIAL Y MÉTODOS	18
5.1 Alimentos empleados.....	18
5.2 Medios de cultivos	18
5.2.1 Preparación de medios de cultivos generales.....	18
5.2.2 Preparación de medios de cultivos selectivos.....	20
5.3 Procesado de los alimentos	24
5.4 Recuentos en placas	25
5.4.1 Siembra en placa.....	26
5.5 Tinciones Gram y prueba de la catalasa	27
5.5.1 Tinciones Gram	27
5.5.2 Prueba catalasa.....	28
5.6 Prueba de resistencia a antibióticos.....	28
6. RESULTADOS	29

6.1 Recuento de colonias	30
6.2 Bacterias presentes en cada medio	33
6.2.1 TSA	33
6.2.2 EMB	33
6.2.3 MRS	34
6.2.4 VJ	34
6.2.5 KAA	34
6.3 Análisis macroscópicos y microscópicos.....	34
6.4 Antibiógramas	37
7. DISCUSIÓN	41
8. CONCLUSIONESS	43
9. BIBLIOGRAFÍA	44

1. RESUMEN:

Los alimentos cárnicos tienen un alto valor nutricional y necesitan de la seguridad alimentaria para mantener sus condiciones asépticas y no ser contaminados por agentes microbianos. En este estudio se pretende evaluar la microbiota presente en productos cárnicos de distinto origen animal y determinar las posibles especies patógenas. En aquellas cepas bacterianas encontradas en las respectivas muestras de carne, se les realizara una caracterización y se analizara la resistencia de estas bacterias frente a tres antibióticos. Los resultados obtenidos nos indica que la carne de cerdo es el producto cárnico que más carga bacteriana presenta frente a la carne de conejo que es la que menor microbiota bacteriana contiene. La mayoría de las cepas bacterianas usadas en el antibiograma presentaban gran resistencia frente a los antibióticos usados. Como resultado es importante un control de los productos cárnicos para evitar contaminación microbiana y que el uso de antibióticos sea distinto para la producción animal y para el uso humano para evitar que aparezcan resistencias.

1. ABSTRACT:

Meat food products have a high nutritional value and need food security to keep aseptic conditions and not to be contaminated by microbial agents. The aim of this work is to evaluate the microbiota in meat products of different animal origin and to determine possible pathogenic species. In those bacterial strains found in the respective meat samples, a characterisation will be carried out and the resistance of these bacteria to three antibiotics will be analysed. The results obtained indicate that pork is the meat product that has the highest bacterial load compared to rabbit meat, which is the one that contains the least amount of bacterial flora. Most of the bacterial strains used in the antibiogram showed great resistance against the antibiotics used. As a result, it is important to control meat products for microbial contamination and to keep in mind that the use of antibiotics is different for animal production and for human use to avoid the development of resistance.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Importancia de la seguridad alimentaria:

La seguridad alimentaria, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), se logra cuando todas las personas pueden acceder permanentemente a alimentos seguros, inocuos, nutritivos y en cantidad suficiente para satisfacer las necesidades nutricionales y así poder tener una vida activa y saludable.

Los alimentos son una de las principales necesidades para el ser humano, por ello es necesario un conocimiento sobre su valor nutricional, contar con los medios necesarios para que todos los individuos tengan acceso a ellos y garantizar la salud de los consumidores, es decir, es imprescindible contar con seguridad alimentaria. La seguridad alimentaria es muy importante debido a que gracias a ella se reducen en gran medida o completamente el número de patógenos, toxinas, elementos tóxicos y otros contaminantes que puede presentar un alimento, mejorando así el bienestar y la salud humana (Lehotay, 2018). Mantener las condiciones asépticas de un alimento es una preocupación primordial para la salud pública de todo el mundo. Los microorganismos patógenos transmitidos por alimentos se encuentran entre las principales causas de enfermedades y muertes en los países (Garedew, 2016). Según las OMS, unos 600 millones de personas enferman cada año debido a la ingesta de alimentos contaminados y aproximadamente 420.000 mueren debido a estas causas. Estas enfermedades se pueden evitar si los alimentos son adecuadamente manipulados y conservados desde la producción primaria hasta el consumidor (Tegegne & Phyto, 2017).

La seguridad alimentaria también permite el aumento de la población debido a que los alimentos, como carnes, vegetales y frutas, pueden mantenerse más tiempo en almacenamiento y pueden ser transportados y consumidos en un periodo más prolongado. Para ello es necesario que la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos sea nula o al menos debe de estar reducida a una determinada cantidad de células por gramo. Debido a la gran importancia que tiene la seguridad alimentaria son necesarios los métodos analíticos rápidos y confiables que permitan de manera rápida y eficaz analizar los productos alimenticios y detectar los contaminantes de estos que pueden afectar a la salud (Piras, 2016). Los ensayos

microbiológicos nos permiten controlar la higiene y la carga microbiana que presenta un alimento para aprobar su venta y consumo.

Historia de la seguridad alimentaria:

A lo largo de la historia ha sido importante conservar los alimentos y por lo tanto la seguridad alimentaria para que estos no fueran deteriorados por microorganismos. Antes de los tratamientos físicos y químicos los tres métodos para conservar los alimentos han sido el secado, la salazón y la fermentación. El secado, en el cual también se incluye el ahumado, era el más utilizado para conservar los alimentos. La salazón tenía como objetivo deshidratar el alimento, era más frecuente realizar esta técnica sobre alimentos de origen marino, aunque también se aplicaba este método para algunos tipos de alimentos cárnicos. La última técnica, la fermentación, era otro método muy usado para conservar alimentos. Estas técnicas no permitían la higiene del alimento sino solo su conservación, no fue hasta la década de los cincuenta cuando se incorporaron métodos de higienización en los alimentos. En la década de los sesenta y ochenta se aplicó la legislación que establece los requisitos que deben reunir los productos alimentarios para que lleguen en buenas condiciones al consumidor. A día de hoy la industria aplica a los alimentos procesos de conservación mediante tratamientos físicos y químicos como por ejemplo la aplicación de frío o calor, congelación, radiación frente a ionización, envasados al vacío y otros tipos de tratamiento que se realizan para que los alimentos se mantengan conservados (Urrialde, 2019)

Alimentos cárnicos:

Los alimentos cárnicos son aquellos tejidos de animales que se pueden emplear como alimento, excluyendo el hueso y la médula ósea. La carne en la nutrición humana tiene un papel importante debido a su aporte en energía y a que posee un alto valor nutricional. Los alimentos cárnicos son una gran fuente de proteínas de alto valor biológico, vitaminas como la B12, macronutrientes y micronutrientes, como el hierro y el zinc. Por todas estas cualidades, es importante añadir los alimentos cárnicos a la dieta diaria. La carne a diario nos aporta un 15% de energía, un 40% de proteínas y un 20% de grasas del total que ingerimos en los alimentos que tomamos (Laskowski et al. 2018).

Los alimentos cárnicos como observamos son muy importantes, pero debido a su composición química rica en diversos factores, permite la proliferación de diversos tipos de microorganismos, es por esto que es uno de los principales vehículos para los patógenos microbianos responsables de enfermedades en humanos transmitidas por alimentos. Esta contaminación del alimento puede ocurrir en cualquier etapa, desde la granja en el que se encuentra el animal, hasta el momento de consumir el alimento cárnico (Niyonzima et al. 2018).

La carne presenta propiedades que la hacen un alimento muy completo pero debido a estas características como su alto contenido en agua, su composición y su pH hace que sea uno de los alimentos más perecederos y por eso es necesario su manipulación y transporte rápido para evitar su deterioro.

3.2 Posibles vías o causas de contaminación del alimento:

Un alimento contaminado es aquel que, según el código alimentario español, contiene organismos vivos patógenos, toxinas, productos químicos, minerales o cuerpos extraños que son capaces de producir enfermedades. Existen por lo tanto tres tipos fuentes por las que un alimento se puede contaminar: contaminación física, en la que se incluye todo aquello que no proviene del alimento, contaminación química, ocurre con el uso inadecuado de productos químicos durante todas las etapas desde el origen del alimento hasta el momento de su ingestión y, por último, la contaminación biológica que es aquella provocada por organismos vivos. Estas fuentes son las responsables de la contaminación de los alimentos, pero la que mayor número de casos provoca es la fuente biológica, debido a que el alimento es susceptible a la contaminación mientras el alimento se produce y prepara y también debido a su composición que permite la colonización de microorganismos ya que estos cuentan con las condiciones necesarias para realizar sus procesos metabólicos.

Según Martínez 2013, las posibles vías de contaminación de un alimento por fuente biológica se pueden dividir en contaminación biológica primaria y contaminación biológica secundaria. La primaria es la que ocurre cuando el animal presentaba una enfermedad y el alimento se consume sin tratar. La secundaria acontece durante la preparación y manipulación de los alimentos debido a que los microorganismos pueden pasar directamente al alimento cuando el ser humano habla, tose o lo

manipula con las manos sin haber tenido una buena higiene. Un alimento también puede ser contaminados por animales, utensilios que no son esterilizados con frecuencia, contacto físico con alimentos contaminados, suelo, agua o aire. El agua y el suelo a menudo presenta microorganismos patógenos que tienen capacidad de persistir en el medio y pueden contaminar el alimento mientras se procesa (Santovito et al. 2018).

Durante las etapas que sufre el alimento donde más se puede producir la contaminación es en la preparación por eso es tan importante la buena formación de los manipuladores de alimentos para evitar que ocurran enfermedades debido a la ingestión de microorganismos patógenos (Tegegne & Phyto, 2017).

Los alimentos, como hemos visto, pueden recibir microorganismos de distintas procedencias, pero la cantidad de microorganismos de estas vías va a diferir dependiendo de varios factores.

Tratamiento de los alimentos:

Los alimentos pueden contaminarse durante la manipulación debido a distintas causas. Con respecto al personal que trabaja, los alimentos pueden ser contaminados debido a que muchos individuos son portadores de microorganismos patógenos y si no se tiene una buena higiene o no se realiza el proceso de forma correcta los alimentos pueden presentar carga microbiana al finalizar la manipulación.

Los materiales y maquinaria que se usa para la preparación y el embalaje también pueden suponer un riesgo para el alimento sino se mantienen almacenadas en lugares y en condiciones de higiene antes de su uso.

Animales:

Al igual que el ser humano, los animales también presentan microorganismos en su piel, tracto intestinal y mucosas, por lo que si no se mantiene una buena higiene el alimento puede quedar contaminado y suponer un riesgo para la salud de los consumidores.

Suelo:

El suelo es un elemento también rico en microorganismos, si se trata de un suelo fértil la carga microbiana es mucho más alta que la de un suelo estéril. Los

microorganismos pueden llegar al suelo mediante animales, agua o aire. Es importante el suelo no entre en contacto con los alimentos ni con la maquinaria que se usa para su tratamiento para evitar que determinadas bacterias contaminen los alimentos.

Agua:

El agua es primordial en el tratamiento y la limpieza ya que es uno de los principales componentes para la higiene y esterilización de los alimentos. Por ello es importante el uso de agua potable para no contaminar todos los productos con los que se está trabajando.

Aire:

La carga microbiana que presenta el aire va a depender de determinadas causas, como el grado de humedad (mayor humedad mayor carga de microorganismos), las corrientes de aire (si no existe corriente los microorganismos sedimentan), luz solar (radiación destruye la carga microbiana) y la cantidad de partículas presentes ya que cada una aportara diferentes microorganismos al aire.

3.3 Microorganismos frecuentes en alimentos cárnicos:

Los microorganismos presentes en el alimento pueden ser patógenos, que son los causantes de las enfermedades provocadas por la ingestión de los alimentos, y microorganismos no patógenos, este tipo de organismos al ingerirlos no producen un problema para la salud.

Los microorganismos presentes en la carne se pueden dividir en dos grandes grupos, bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas.

3.3.1 Bacterias Gram negativas en carne:

Las bacterias gram negativas son aquellas que se tiñen de un color rosado cuando se realiza la tinción de Gram debido a que su composición en peptidoglicano no es tan elevada como en Gram positivas (su pared celular está compuesta por un 90% de peptidoglicano que permite retener la coloración del cristal violeta).

Acinetobacter:

El género *Acinetobacter* son un grupo de pequeñas bacterias con morfología bacilar Gram negativas y con catalasa positiva. Incluye aproximadamente unas 60

especies, y entre ellas aparecen patógenos ambientales y patógenos humanos. Entre estos últimos las especies del complejo *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* o complejo ACB presenta una importancia clínica elevada debido a la resistencia que presenta en hospitales. Miembros de este complejo ACB también han sido encontrados en alimentos y pueden ser una fuente de bacterias patógenas para el ser humano. En distintos estudios se han identificado varias especies pertenecientes al complejo ACB en muestras de carne cruda de aves, cerdo y carne de res. En todos los estudios la bacteria que más prevalencia del complejo ACB era *Acinetobacter pittii*. Se trató con distintos antibióticos y su persistencia en general fue baja (Marí-Almirall, 2019).

Aeromonas:

Este género lo componen bacterias con morfología de bastón corto con catalasa positiva, Gram negativas y anaerobias facultativas. Estas bacterias pueden producir diversos factores de virulencia como enterotoxinas, hemólisis o citotoxinas y produce infecciones intestinales en los humanos. La transmisión de esta bacteria a las personas puede ocurrir mediante la carne de pollo o la carne picada. Este género es capaz de crecer en productos refrigerados y esta característica puede suponer un peligro para la salud pública (Praveen, 2016).

Alcaligenes:

Es uno de los géneros más habituales aislados en carne fresca. Son bacilos Gram negativos móviles (excepto en raras excepciones), poseen catalasa positiva y son aerobios estrictos. Este género se sabe desde hace tiempo que es colonizador de carne, pero también puede aparecer contaminando superficies de trabajo, equipos y mataderos (Nortjé, 1990). Algunas bacterias pertenecientes a este género son colonizadores comunes del tracto gastrointestinal.

Campylobacter:

Este género está formado por bacilos Gram negativos curvados en forma de espiral y pueden presentar un flagelo polar en uno de los extremos o en ambos, son catalasas positivas y no forman esporas. Las especies que constituyen este género son capaces de desarrollarse en carne. Las especies *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* y *Campylobacter upsaliensis* son los causantes de la enfermedad llamada campilobacteriosis. La más común es la

especie *C. jejuni* (Osimani et al, 2017). Estas especies son patógenas termotolerantes y son los principales causantes de diarreas y gastroenteritis en humanos (Nisar et al, 2018).

Flavobacterium:

Se tratan de bacterias Gram negativas aerobias que presentan morfología bacilar y catalasa positiva. Algunas especies de este género tienen movilidad gracias a que presentan flagelos peritricos. La especie *Flavobacterium breve* suele colonizar carne cruda de mamíferos y aves. (López 2004).

Pseudomonas:

Son bacterias con morfología de bacilos Gram negativos, aerobios estrictos, no producen esporas, son catalasa positivos y presentan movilidad gracias a la presencia de flagelos monotricos o multitricos. Son los principales causantes del deterioro de la carne, causa malos olores, sabores desagradables, decoloración y emisión de gas (Bantawa, 2018). La mayoría de las *Pseudomonas* no producen pigmentos. Se establecieron cuatro cluster o grupos para dividir a las *Pseudomonas*, el cluster 1 y 2 son los más abundantes y los componen especies no fluorescentes y con flagelos monotricos, el cluster 3 está compuesto por bacterias fluorescentes y multitricas y, por último, el cluster 4 son especies fluorescentes y monotricas (Shaw & Latty, 1982).

Enterobacterias:

Se trata de una familia de bacterias (Enterobacteriaceae) Gram negativas, son anaerobias facultativas y dependiendo del genero pueden presentar distinta morfología. Los géneros más importantes que se encuentran en carne de esta familia son:

Yersinia: La especie *Yersinia enterocolitica* es una bacteria Gram negativa con morfología de bacilo no esporulada. Es un patógeno entérico, es decir, se suele encontrar en el intestino, y comúnmente causa enteritis aguda asociada con diarrea, fiebre e inflamación de ganglios linfáticos. *Y. enterocolitica* se ha localizado en cerdo, aves de corral y alimentos listos para consumir. Todas las cepas de esta especie no son patógenas para el ser humano, pero algunas sí que pueden causar inflamación de intestino (Sirghani, 2018).

Salmonella: Son bacterias bacilares Gram negativas, con catalasa generalmente positiva. Presentan movilidad gracias a flagelos peritricos y son bacterias anaerobias facultativas. La principal fuente de *Salmonella* se encuentra en carne, leche y huevos. La especie *Salmonella enterica* es una de las especies causantes de la salmonelosis humana, una de las infecciones más importantes transmitidas por alimentos. La salmonelosis se caracteriza por trastornos gastrointestinales e infecciones graves (Terentjeva et al, 2017).

Shigella: Este género está formado por bacterias con morfología bacilar Gram negativas no esporuladas. No presentan movilidad y pueden provocar diarreas. *Shigella* puede colonizar los alimentos cárnicos debido a contaminación fecal-oral. Es un contaminante bacteriano habitual de carne cruda o con procesos térmicos limitados. Puede provocar enfermedades infecciosas a partir de una carga microbiana baja. (Garedew, 2016).

Escherichia coli: Se usa como organismo modelo en el laboratorio y forma parte del tracto gastrointestinal. Es una bacteria bacilar Gram negativa, anaerobia facultativa y presenta catalasa positiva. *E. coli* presenta mucha diversidad de cepas y la mayoría no causan enfermedad o provocan diarreas breves. *E. coli* se puede dividir en bacterias entéricas y en bacterias *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC).

Las bacterias *E. coli* entéricas están asociadas a enfermedades diarreicas en humanos provocadas por la ingestión de alimentos contaminados. Algunos ejemplos de bacterias entéricas son *E. coli* enterohemorrágica, enterotoxigénica, enteroagregativa o enteropatógena (Manges, 2016). Las principales *E. coli* conocidas por contaminación de alimentos son *E. coli* O157 y *E. coli* productora de toxina Shiga (Yamaji et al. 2018).

Las *E. coli* que causan infecciones fuera del tracto intestinas son las *E. coli* patógenas extraintestinales. Algunas de las infecciones que pueden producir fuera del tracto intestinal son infecciones urinarias, meningitis, infecciones en el torrente sanguíneo y en heridas. Las fuentes de contaminación por este tipo de *E. coli* no se sabe aún con claridad (Yamaji, 2018).

Proteus:

Se tratan de bacilos cortos Gram negativos anaerobios. Algunos miembros de este género presentan movilidad gracias a la presencia de un flagelo. La mayoría de

bacterias *Proteus* son patógenos oportunistas y pueden causar infecciones del tracto urinario, infecciones sépticas y diarreas (Dai et al, 2018). *Proteus* puede contaminar los alimentos debido a que suele ser microbiota habitual de animales como el pollo, por lo que facilita la transferencia de bacterias durante el sacrificio y esto conlleva una contaminación cruzada (Sanches et al, 2019).

Klebsiella:

Este género está compuesto por bacterias inmóviles Gram negativas. Son bacilos no formadores de esporas. *Klebsiella* forma parte de las bacterias oportunistas que normalmente habita en el tracto gastrointestinal de humanos. La carne de pollo es una fuente de infección para humanos debido a que se puede contaminar con este género en procesos de evisceración durante el sacrificio (Ramadan & Awad, 2017).

Moraxella:

Este género está formado por bacilos Gram negativos aerobios. No presentan movilidad y no son fermentadores. Este género se suele estudiar junto con *Acinetobacter* debido a su similitud. La única diferencia es que *Moraxella* presenta oxidasa positiva mientras que *Acinetobacter* la presenta negativa (López, 2004). Las especies de *Moraxella* son comensales de animales como cerdos, conejos, vacas y ovejas. Al manipular los alimentos puede convertirse en patógenos para el ser humano (Kieffer et al, 2017).

3.3.2 Bacterias Gram positivas en carne:

Las bacterias gram positivas son aquellas que se tiñen de azul o violeta cuando se realiza la tinción de Gram gracias a que presentan un 90% de peptidoglicano en su pared celular).

Bacillus:

Este género es ubicuo en la naturaleza porque no presenta requerimientos complejos de nutrientes. La especie más conocida por contaminar alimentos de este género es *Bacillus cereus*, un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo y formador de endosporas (Tewari et al, 2015). Los síntomas que presenta esta bacteria son náuseas, vómitos, diarrea y calambres abdominales (Walker et al, 2017).

Esta bacteria es una causa importante de intoxicación debido a que produce la toxina emética y varias enterotoxinas. Se puede encontrar en carne cruda y productos cárnicos. *B. cereus* supone un riesgo ya que las esporas pueden sobrevivir a procesos como la pasteurización (Zeighami et al, 2019).

Bacterias lácticas:

Carnobacterium:

Es un género perteneciente a las bacterias lácticas. Está formado por bacilos Gram positivos y las dos especies que se encuentran en carne y productos cárnicos envasados al vacío son *Carnobacterium divergens* y *Carnobacterium maltaromaticum*. Gracias a su potencial para producir antibacterianos pueden inhibir el crecimiento de bacterias de descomposición y patógenas de los alimentos (Zhang et al, 2018).

Enterococcus:

Los enterococos son bacterias ubicuas que principalmente se localizan en el tracto intestinal de humanos y animales mamíferos. Pueden sobrevivir a muchas condiciones ambientales adversas, por eso se encuentra en carnes y productos cárnicos. Presentan un papel beneficioso gracias a que ejercen actividad microbiana frente a Gram positivas patógenas transmitidas por alimentos como *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, gracias a la producción de ácido láctico que inhibe el crecimiento de estas bacterias (Golob et al, 2019).

Lactobacillus:

Son bacilos Gram positivos facultativos no productores de esporas. Son capaces de crecer en concentraciones de sal altas y en valores de pH bajos. Se consideran bacterias benignas y se encuentran frecuentemente en el tracto gastrointestinal y sistema urinario. Son productoras de ácido láctico y este ambiente ácido inhibe el crecimiento de bacterias patógenas. En carne envasadas al vacío, en productos cárnicos y en carne curada aparecen este tipo de bacterias (Vásquez, 2009).

Streptococcus:

Este género está formado por bacterias Gram positivas con morfología de cocos en cadena o en parejas. *Streptococcus suis* es una especie de este género que es conocida debido a que si los alimentos están contaminados pueden producir graves consecuencias en humanos, como una meningitis que puede conllevar a pérdida de audición (Boonyong et al, 2019).

Brochothrix:

Género de bacilos Gram positivas. Presenta dos únicas especies, *Brochothrix campestris* que únicamente se localiza en suelo y pasto, y *Brochothrix thermosphacta* que se localiza en carne y productos cárnicos envasados.

B. thermosphacta es una bacteria que predomina en la descomposición de carne gracias a su capacidad para crecer en altas concentraciones sal y bajo pH y crecer a temperaturas de refrigeración (Stanborough et al, 2017)

Clostridium:

Está formado por bacilos Gram positivos anaerobios. *Clostridium perfringes* es la especie más común de este género que se encuentra en carne. Esta especie patógena es formadora de esporas y produce intoxicaciones alimentarias que se caracterizan por diarrea acuosa y dolor abdominal al consumir alimentos contaminados con enterotoxinas (Yibar et al, 2018).

Clostridium botulinum es menos común que aparezca, pero puede aparecer en alimentos cárnicos procesados mínimamente (Barker et al, 2016).

Listeria:

Las especies de este género están formadas por bacterias bacilares Gram positivas anaeróbicas. Es un género que se encuentra presente en distintos tipos de alimentos. La especie clínicamente más importante es *L. monocytogenes* debido a que es la causante de listeriosis en humano a causa de la contaminación de alimentos con esta bacteria (Chin et al, 2018).

Micrococcus:

Genero formado por cocos Gram positivos que puede crecer en altas concentraciones sal. Son aerobios facultativos y es un género inmóvil excepto la

especie *Micrococcus agilis*. Este género aparece en productos cárnicos (López, 2004).

Staphylococcus:

Pertenecen a la familia Micrococaceae al igual que el género *Micrococcus*. Son cocos Gram positivos anaerobios. Presentan catalasa positiva y son inmóviles. Los estafilococos colonizan la piel y las fosas nasales de algunos humanos asintóticamente. Estas personas son portadores y pueden provocar síndrome tóxico e intoxicación alimentaria. La carne puede ser contaminada por la especie *Staphylococcus aureus* debido a prácticas de higiene inapropiadas durante la preparación de la carne (Pekana & Green, 2018).

3.4 Antibióticos y mecanismos de resistencia:

Los alimentos de origen animal presentan un nexo directo e importante en los humanos. El uso de agentes microbianos para controlar enfermedades en animales que luego son sacrificados para el consumo está provocando resistencias a los antimicrobianos. Pese a las recomendaciones propuestas para no abusar excesivamente de los antimicrobianos, la resistencia a ciertos tipos de antibióticos continúa aumentando (Shousha et al, 2015).

Este uso excesivo de medicamentos antimicrobianos no solo ha provocado resistencias en bacterias no patógenas, sino que también ha supuesto resistencias en bacterias patógenas que pueden suponer riesgos para la salud de los humanos. Un ejemplo ocurre con el medicamento β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), debido a que en las últimas dos décadas ha aumentado su resistencia entre bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, especialmente en *E. coli* y *Klebsiella* (Ramadan & Awad, 2017).

El uso de antibióticos crea una presión selectiva en la flora bacteriana y esto aumenta también la aparición de bacterias resistentes a los antimicrobianos. Esto provoca que las bacterias patógenas del intestino resistentes puedan contaminar la carne durante el sacrificio debido a una mala higiene y afectar a la salud de los consumidores. La resistencia a los antibióticos en patógenos bacterianos es mayor en carne de cerdo y aves de corral (Bantawa et al, 2019).

A lo largo de la historia, las bacterias han desarrollado distintos mecanismos para la obtención de nuevos genes que les permitan soportar condiciones adversas. Estos mecanismos les permiten a día de hoy desarrollar resistencias a los medicamentos. Según Shousha et al. 2015, la resistencia bacteriana frente a los antimicrobianos se puede adquirir por tres vías. En primer lugar, esta resistencia puede ser adquirida debido a mutaciones en el genoma de la bacteria que le confiera resistencia a uno o varios medicamentos. La segunda manera de que una bacteria adquiera resistencia frente un antimicrobiano es mediante la interacción con otras bacterias, es decir, mediante la formación de biopelículas. Por último, y uno de los mecanismos más importantes es mediante transferencia horizontal, que permite a la bacteria adquirir nuevos genes. Se cree que este último es el más probable y que está siendo provocado por los bacteriófagos, es decir, los virus bacterianos.

La pérdida en la eficacia de los antibióticos para tratar a las bacterias está suponiendo un problema para la salud pública mundial. Las infecciones causadas por bacterias Gram negativas y Gram positivas se están intentando tratar con nuevos tipos de antibióticos para que las bacterias no presenten resistencia. Con respecto a bacterias Gram negativas están apareciendo enterobacterias resistentes a los carbapenémicos que son antibióticos β -lactámicos de amplio espectro y actividad bactericida. En Gram positivas se están encontrando cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (Laxminarayan et al, 2016).

4. OBJETIVOS:

- Evaluar la microbiota total presente en carnes frescas de diferente origen animal.
- Estudiar la abundancia relativa de diferentes poblaciones microbianas potencialmente patógenas en dichas carnes.
- Caracterizar morfológicamente y bioquímicamente una muestra representativa de dicha población microbiana.
- Analizar la presencia de resistencias a antibióticos en las muestras de bacterias representativas aisladas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS:

5.1 Alimentos empleados:

Para el desarrollo de la investigación fueron necesarios 10 tipos de alimentos cárnicos diferentes. Las muestras eran frescas, no fueron procesadas con ningún aditivo ni conservante, tampoco se usó ninguna especia ni aliño en ellas. Estas muestras se obtuvieron de una carnicería en el municipio de Mengíbar (Jaén). Los alimentos una vez adquiridos fueron almacenados por separado y se mantuvieron en frío durante 24-48 horas para conservarlos hasta el momento de su uso en el laboratorio.

En primer lugar, fue necesario procesar los alimentos para detectar la carga microbiana que presentaba cada uno de ellos. Se necesitaron dos días para el procesamiento de alimentos (Tabla 1).

Alimentos procesados el primer día:	Alimentos procesados el segundo día:
Lomo de cerdo	Conejo
Ternera	Corazón de pollo
Carne picada de cerdo	Costillas de cerdo
Cordero	Pollo
Higaditos de pollo	Pulmón de conejo

Tabla 1: Muestras de alimentos que se procesaron en estos días.

5.2 Medios de cultivos:

Para la detección de los distintos tipos de microorganismos presentes en cada una de las muestras se utilizaron 5 medios, todos ellos de la casa comercial Scharlab de Barcelona. Para su preparación se siguen las instrucciones del fabricante que aparecen en la etiqueta del producto. Los medios que se usaron fueron: Triptona Soja Agar (TSA) el único de los medios no selectivo, medio agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS), medio agar de Vogel Johnson (VJ), medio agar de Kanamicina Esculina Azida (KAA) y medio agar de Eosina-Azul de Metileno (EMB).

5.2.1 Preparación de medios de cultivos generales:

Un medio general es aquel medio que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, para ello al medio se le añaden distintos factores de crecimiento que permitan el crecimiento de un gran número de microorganismos (Atlas, 2010).

TSA (Tryptona Soja Agar):

Este medio de cultivo tiene un alto valor nutritivo que permite el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos. Este alto valor nutritivo viene dado por su contenido en peptona de caseína y peptona de soja. El medio TSA contiene también cloruro de sodio, este compuesto le confiere al medio el equilibrio osmótico (Manual básico de microbiología Cultimed, 2003).

Composición en g/l:

Peptona de caseína.....	15.0
Peptona de soja.....	5.0
Cloruro de sodio.....	5.0
Agar.....	15.0

Final: pH 7.3 ± 0.2 a 25 °C

Imagen 1: Composición del medio de cultivo de TSA en g/l del fabricante Scharlab.

Para la preparación de este medio es necesario añadir 40 g en un litro de agua destilada según las instrucciones del fabricante Scharlab (Imagen 1). Debido a que se trabajó con 10 alimentos distintos y para cada uno de ellos se deben hacer cuatro diluciones de TSA se necesitó gran cantidad de este medio. Se tomaron dos matraces de 1 litro y se añadirían 40 g en cada uno de ellos. Estos 40 g se suspendieron en un litro de agua destilada y se procedió al cierre de los matraces mediante un tapón de algodón y papel de aluminio para evitar contaminación hasta su uso (Imagen 2). Una vez cerrados se procede a introducirlos en el autoclave a una temperatura de 121°C durante 20 minutos para eliminar cualquier tipo de microorganismo que pueda presentar el medio.

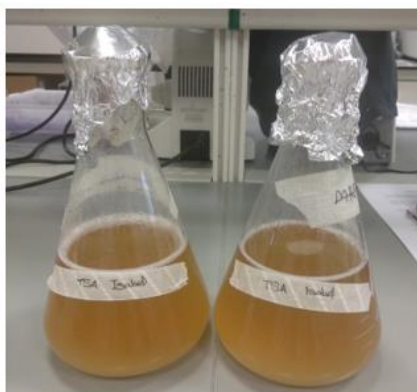


Imagen 2: Medio TSA cerrado herméticamente y listo para autoclavar.

Una vez finalizado el proceso de autoclavado, se introducen los matraces en un baño caliente para que baje la temperatura a unos 50°C y al mismo tiempo el agar no alcance la solidificación. Cuando la temperatura bajo se vertió el TSA en la placa y se dejó unos minutos hasta que solidifico (todo esto en condiciones de esterilidad), luego se almacenan en cámara fría hasta el momento de su utilización.

5.2.2 Preparación de medios de cultivos selectivos:

Un medio selectivo es aquel medio que inhibe el crecimiento de organismos no específicos. Estos medios nos permiten el aislamiento de organismos para que solo unos pocos tipos de microorganismos pueden crecer (Atlas, 2010).

MRS (Medio agar de Man, Rogosa y Sharpe):

El medio de Man, Rogosa y Sharpe fue desarrollado para el recuento de lactobacilos en productos lácteos y sus derivados, pero es usado también para localizar lactobacilos en otros tipos de productos alimenticios (Manual básico de microbiología Cultimed, 2003).

Composición en g/l:

Citrato diamónico.....	2.0
Extracto de carne.....	8.0
Extracto de levadura.....	4.0
D (+) - Glucosa.....	20.0
Sulfato de magnesio.....	0.2
Sulfato de manganeso (II).....	0.0
Peptona bacteriologica.....	10.0
Fosfato de hidrogeno di-potásico.....	2.0
Acetato sodico.....	5.0
Tween 80.....	1.0
Agar.....	10.0

pH: 6.2 ± 0.2

Imagen 3: Composición del medio de cultivo MRS en g/l del fabricante Scharlab.

El valor nutritivo de este medio para que crezcan los lactobacilos se lo aporta la glucosa, peptonas (extracto de carne, extracto de levadura, peptona bacteriológica), sulfato de magnesio y sulfato de manganeso (II). Al tratarse de un medio selectivo debe de presentar algún tipo de compuesto inhibidor de otros microorganismos, de esta característica se encarga el citrato diamónico. Para

mantener el equilibrio de pH del medio se usa el fosfato de hidrogeno di-potásico y para el aporte necesario de ácidos grasos se usa Tween 80 (Manual básico de microbiología Cultimed, 2003).

Para llevar a cabo la preparación de este medio es necesario suspender 62 g en un litro de agua destila. Se usó un matraz de 1 litro al que se añadieron 62 g y se suspendieron en 1 litro de agua destilada. Se procede al cierre para realizar el autoclavado al matraz, pero para este medio en concreto, para evitar que se caramelize la glucosa y se vuelva toxica, el autoclave deber de tener una temperatura de 115°C durante 20 minutos. Una vez finalicé el proceso se introduce el matraz en un baño caliente para que enfrié sin solidificar, transcurrido un periodo de tiempo se va vertiendo el MRS en las placas y se deja unos minutos solidificar. Por último, se guarda en cámara fría hasta el momento de su utilización.

VJ Agar (Medio agar de Vogel Johnson):

El medio selectivo VJ Agar se usa para el recuento y aislamiento de estafilococos manitol-positivos (Manual básico de microbiología Cultimed, 2003).

Composición en g/l:

Peptona de caseína.....	10.0
Extracto de levadura.....	5.0
Manitol.....	10.0
Fosfato dipotásico.....	5.0
Cloruro de litio.....	5.0
Glicina.....	10.0
Fenol rojo.....	0.025
Agar.....	15.0

Final: pH 7.2 ± 0.2 a 25°C

Imagen 4: Composición del medio de cultivo VJ Agar en g/l del fabricante Scharlab.

La acción selectiva de este medio viene dada por los componentes glicina, cloruro de litio y el fosfato dipotásico que provocan la inhibición prácticamente completa de microorganismos secundarios, pero este medio solo mantiene la selectividad durante unas 24 horas, pasado este tiempo pueden aparecer microorganismos secundarios. Los estafilococos en este medio producen colonias negras, si estos estafilococos reducen el fosfato dipotásico alrededor de la colonia negra se produce

un halo rosado. Si, por el contrario, los estafilococos son fermentadores de manitol, dan un halo amarillo alrededor de la colonia, este halo amarillo indica que estas colonias de estafilococos pueden ser supuestamente patógenas (Manual básico de microbiología Cultimed, 2003).

Este medio se prepararía a partir de un litro de agua destilada y 60 g de VJ Agar, pero al tratarse de un medio selectivo, se preparó un litro. Se suspendieron 60 g en 1 litro de agua destilada en un matraz. Se cerró el matraz correctamente con algodón y papel de aluminio y se seleccionó el programa de autoclave de 121°C durante 20 minutos. Tras el programa se introdujo en un baño caliente de 50°C y cuando se enfrió a esta temperatura se añadieron 20 ml de solución de telurito potásico al 1% en condiciones de asepsia porque al añadir este compuesto no se puede calentar de nuevo el medio según las instrucciones de Scharlab. Se prepararon las placas del medio VJ agar. Una vez condensado el medio se guardaron las placas en cámara fría hasta el momento de su empleo.

KAA (Medio agar de Kanamicina Esculina Azida):

El medio KAA es un medio selectivo que nos indica la presencia y el aislamiento de enterococos en alimentos, agua u otros tipos de muestras en las que se quieran detectar enterococos (Manual básico de microbiología Cultimed, 2003).

Composición en g/l:

Triptona.....	20.0
Extracto de levadura.....	5.0
Cloruro de sodio.....	5.0
Citrato de disodio.....	1.0
Esculina.....	1.0
Citrato férrico de amonico.....	0.5
Azida sodica.....	0.15
Kanamicina sulfato.....	0.02
Agar.....	15.0

pH: 7.0 ± 0.2 a 25°C

Imagen 5: Composición del medio de cultivo KAA en g/l del fabricante Scharlab.

La selectividad de este medio de enterococos es muy alta. Los compuestos que inhiben a los microorganismos secundarios son la azida sódica y la kanamicina sulfato. Estos enterococos hidrolizan la esculina produciendo glucosa y esculetina,

el citrato férrico de amonio reacciona con esculetina y provoca que el medio tome una tonalidad entre verde y negro (Cultimed, Manual básico de microbiología).

Para la preparación de este medio de KAA se necesitan suspender 33 g en un litro de agua destilada. Se pesaron los 33 g y se incorporaron a 1 litro de agua destilada en un matraz. Una vez disuelto el soluto en la disolución se procedió al cierre del matraz y se autoclavó a una temperatura de 121°C durante 20 minutos. Finalizado el programa se dejó enfriar en un baño caliente de 50°C y pasados unos minutos se procedió a la preparación de las placas del medio KAA en condiciones de esterilidad, una vez solidificadas las placas se guardaron en la cámara fría hasta el momento de su utilización.

EMB (Eosina-Azul de Metileno):

Este medio selectivo permite el aislamiento de microorganismos coliformes y bacilos entéricos. Se pueden observar también colonias de *E. coli* y *Candida albicans* (si se suplementa con clortetraciclina). Con este medio es sencilla la detección de la bacteria *E. coli* debido a que en EMB las colonias de *Escherichia coli* toman un color verde brillante debido a la rápida fermentación de la lactosa y esto hace que sea fácil su identificación (Manual básico de microbiología Cultimed, 2003).

Composición en g/l:

Peptona.....	10.0
Lactosa.....	10.0
Fosfato dipotásico.....	2.0
Eosina Y.....	0.4
Azul de metileno.....	0.065
Agar.....	15.0

Final: pH 6.9 ± 0.2 a 25°C

Imagen 6: Composición del medio de cultivo EMB en g/l del fabricante Scharlab.

El compuesto de azul de metileno y eosina son compuestos que permiten diferenciar los microorganismos lactosa-positivos de los lactosa-negativos, además estos compuestos son inhibidores de estreptococos fecales y de microorganismos gram-positivos (Manual básico de microbiología Cultimed, 2003). Los coliformes

dan lugar a colonias con tonalidades negras azuladas, mientras que otras colonias lactosa-negativas como las especies de *Salmonella* y *Shigella* son incoloras. Las colonias de *E. coli* toman un color verde brillante metálico según las instrucciones del fabricante.

Este medio se prepara mediante la suspensión de 37.5 g en un litro de agua destilada. Se usó un matraz de 1 litro al que se le introdujeron 37.5 g y se añadió agua destilada hasta completar el volumen de 800 ml. El matraz se cerró herméticamente con algodón y papel de aluminio y se introdujo en el autoclave a una temperatura de 121°C durante 20 minutos. Se dejó enfriar en un baño caliente a 50°C y se comenzó a preparar las placas. Cuando el medio EMB se solidificó en las placas se almacenaron en una cámara fría hasta el momento de su uso.

5.3 Procesado de los alimentos:

Las muestras de alimentos cárnicos fueron procesadas para obtener los distintos microorganismos y sembrarlos en las placas para detectar la carga microbiana que presentaba cada una de las muestras.

Para el procesado de cada uno de los alimentos fue necesario 5 gramos de cada una de las muestras, solución salina, bolsas de Stomacher y tubos Falcon. Para la preparación de solución salina es necesario suspender 0.9 g de cloruro sódico en 100 ml de agua destilada, como fueron necesarios 700 ml se añadieron 6.3 g junto con 700 ml de agua destilada para obtener la solución salina estéril al 0.9%.

Se tomaron 5 gramos de cada una de las muestras y se introdujeron en 10 bolsas distintas de Stomacher junto con 45 ml de disolución salina para homogenizar cada una de las muestras (Imagen 7). Las muestras de alimentos se homogenizaron mediante Stomacher®, un aparato que mediante el movimiento de unas palas permite la homogenización de la muestra. Se seleccionó una velocidad de 230 rpm durante 60 segundos para la homogenización de los alimentos. Una vez homogenizadas todas las muestras, cada una de las soluciones se pasó a un tubo Falcon, éste se rotuló con el nombre de cada una de las muestras que contenía. Una vez las soluciones almacenadas en el tubo Falcon se almacenaron en la cámara fría hasta el día de su utilización.



Imagen 7: Pesa de una de las muestras y homogenizado de esta.

Estos tubos Falcon presentaban la dilución 0 de cada uno de los 10 alimentos y a partir de esta dilución se prepararon las demás diluciones seriadas. Para ello se prepararon 4 eppendorf por cada una de las muestras de alimentos cárnicos, se añadieron 900 μ l de solución salina en cada eppendorf y se rotulo con las diluciones que iba a presentar (-1, -2, -3, -4). Se tomaron 100 μ l del tubo Falcon y se añadieron al eppendorf rotulado como -1. A partir de este eppendorf se toman otros 100 μ l y se pasan al eppendorf -2, de este se volvió a tomar 100 μ l y se traspasó al eppendorf -3. Por último, de este eppendorf se transfirió 100 μ l al último eppendorf, el rotulado con la dilución -4. En cada uno de estos traspasos fue necesario cambiar la punta de la pipeta para no arrastrar una carga microbiana superior a la que correspondía en cada dilución.

5.4 Recuentos en placas:

El recuento en placa sirve para identificar la población bacteriana de una muestra. Para el recuento de poblaciones bacterianas, se deben seleccionar aquellas placas que tengan entre 30-300 colonias.

Para cada uno de los alimentos se usaron ocho placas del medio general TSA. Se realizaron las diluciones -1, -2, -3 y -4 y para cada una de estas diluciones se efectuó un duplicado. TSA necesita estas 4 diluciones debido a que al ser un medio general va a presentar un crecimiento muy elevado de bacterias y realizando estas 4 diluciones se puede localizar alguna placa que contenga entre 30-300 colonias.

Para los medios selectivos solo se usaron cuatro placas para las diluciones 0 y -1 y sus correspondientes duplicados. Al ser medios selectivos inhiben el crecimiento

de otras poblaciones bacterianas y no aparecerán un gran número de colonias en estas placas, por ello se realizan estas diluciones, para asegurar la aparición de colonias.

5.4.1 Siembra en placa:

Se procedió a la siembra de las diluciones en cada placa, para ello fue necesario condiciones de esterilidad para no contaminar las placas con otras cepas bacterianas que no provenían de la muestra de interés.

Medio general (TSA):

Se tomaron ocho placas de TSA y se rotularon con la muestra que iban a portar y la dilución que presentaban. Se cogieron 100 µl de la dilución -4, y se depositaron en el centro de la placa. Con un asa de siembra previamente flameada, se extendieron los 100 µl realizando movimientos circulares para que toda la placa fuera sembrada. Este método fue repetido para las diluciones -3, -2 y -1 y para sus réplicas. Una vez sembradas todas las placas se procedió a su incubación durante 48 horas a 37°C. Tras este periodo de tiempo se realizó el recuento de colonias en aquella placa que presentaba un número de 30-300 colonias bacterianas. Como las diluciones estaban duplicadas se tuvo que realizar el recuento de ambas y después realizar una media para obtener el número de colonias.

Una vez realizado el recuento y la media se debe realizar la siguiente fórmula para obtener el número de unidades formadoras de colonias (UFC/g):

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias} * \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen}}$$

Como 5 gramos del alimento fueron añadidos a 45 ml de solución salina el alimento fue diluido previamente antes de realizar las diluciones seriadas, por ello después de realizar la fórmula se debe multiplicar por 10 el valor obtenido.

Este procedimiento fue realizado para cada una de las muestras de alimentos cárnicos.

Medios selectivos (EMB, VJ Agar, KAA y MRS):

Se tomaron 4 placas de cada uno de los medios selectivos para realizar las diluciones 0 y -1 y sus respectivas réplicas. Se tomaron 100 µl de la dilución -1 y se

agregaron en el centro de la placa. Con un asa de siembra flameada se extendió el líquido por toda la placa mediante movimientos circulares. La técnica se reproduzco para la dilución 0 y para las réplicas. Se llevó a cabo la incubación de las placas, los medios EMB, VJ Agar y KAA se incubaron 48 horas a 37°C, mientras que el medio MRS se incubo durante 48 horas a 35°C debido a que estas condiciones son las mejores para los organismos que crecen en este medio. Finalizados estos dos días se procedió al recuento en aquellas placas que presentaran entre 30-300 colonias.

Una vez realizado el recuento de las placas de interés se procede a realizar la siguiente fórmula para obtener el número de unidades formadoras de colonia:

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias} * \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen}}$$

Como el alimento fue diluido previamente, una vez realizada la formula, el valor que obtengamos se multiplica por 10 para dar el resultado final.

5.5 Tinciones Gram y prueba de la catalasa:

Para cada una de las placas de las que se realizó el recuento se seleccionaron aquellas colonias que presentaban morfologías diferentes o resultaban de interés porque eran poco comunes en la placa. A partir de estas técnicas se puede saber la forma de las bacterias que componen la colonia y si liberan agua y oxígeno en presencia de peróxido de hidrogeno.



5.5.1 Tinciones Gram:

Hans Christian Gram desarrollo este procedimiento en 1884. La tinción de Gram nos permite diferenciar entre bacterias Gram-negativas y bacterias Gram-positivas gracias al complejo de cristal violeta y safranina. Las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas cuando se añade alcohol no retienen el complejo y se decoloran dando lugar a bacterias de color rosa, las paredes celulares de las bacterias Gram-positivas si retienen este complejo cuando se añade alcohol y las bacterias aparecen de un color morado (Coico, 2005). Esta tinción permite diferenciar entre cuatro tipos de bacterias: Cocos Gram negativos, cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos y bacilos Gram positivos (Moyes et al., 2009).

Para la tinción de Gram se siguió el protocolo de Moyes et al. de 2009 con unas variaciones. En primer lugar y en condiciones de esterilidad, se añade una gota de agua destilada en un portaobjetos para expandir la muestra que se seleccione. Para obtener la muestra se flamea un asa de siembra y se tomó la colonia de interés. Una vez extendida la muestra se seca el agua en el mechero y se fija la muestra. Se dejó enfriar la muestra y se añade cristal violeta durante 2 minutos. Se retiró el cristal de violeta y se añadió lugol otros 2 minutos. Finalizado este tiempo se decolora con alcohol etílico unos segundos y se lava con agua destilada para seguidamente añadir safranina durante 3 minutos. Para finalizar la tinción se lava, se deja secar y se observa al microscopio al 100x con aceite de inmersión.

5.5.2 Prueba catalasa:

La prueba de la catalasa se realiza para saber si las bacterias descomponen el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Si se produce agua y oxígeno, se producen burbujas provenientes de este último y esto indica que la prueba es positiva (Taylor & Achanzar, 1972).

Para realizar esta prueba en un portaobjetos se sitúa la colonia de interés y se añade una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. Si se observan burbujas la prueba es positiva, si, por el contrario, no se perciben burbujas, significa que la prueba es negativa.

5.6 Prueba de resistencia a antibióticos:

Se seleccionaron 30 colonias de interés de los distintos alimentos y de distintos medios selectivos. Estas colonias se sembraron en tubos de TSB para cultivarlas durante un periodo de 24 horas y luego proceder a su siembra en placas de TSB para realizar los antibiogramas de las colonias seleccionadas.

El medio TSB se usó para los antibiogramas debido a que es un medio general y permite el crecimiento de un gran número de microorganismo, en concreto de las colonias que se seleccionaron y provenían de distintos medios selectivos.

Para el antibiograma se seleccionaron 3 antibióticos de la casa comercial de Oxoid: Ampicilina con una concentración de 10 µg (AMP 10), eritromicina con concentración de 15 µg (E 15) y gentamicina con 10 µg de concentración (CN 10). Estos discos de antibiótico se colocaron en el centro de la placa de TSB y a su

alrededor, en forma de estrella, se sembraron las colonias de interés y se dejaron incubando durante 24 horas (Imagen 8). Una vez pasado este periodo de tiempo se pudo observar el halo de inhibición que producía el antibiótico en las distintas colonias que se sembraron y se midió su diámetro en mm para comparar la inhibición o resistencia y así poder comparar el efecto de los antibióticos utilizados entre las distintas bacterias estudiadas.

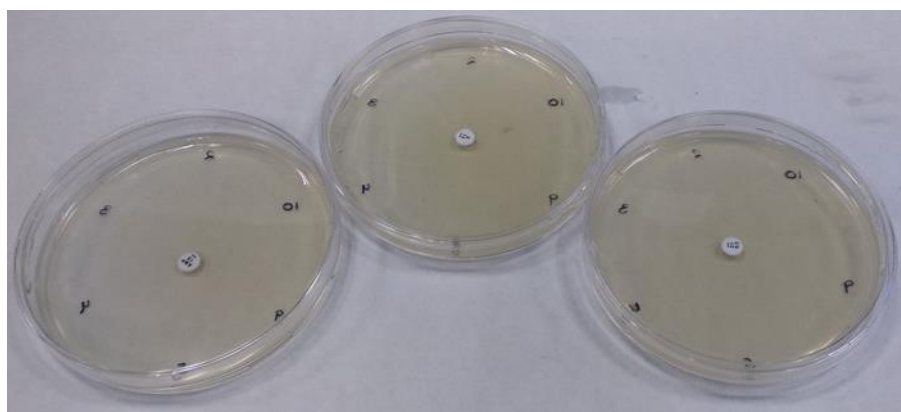


Imagen 8: Antibióticos con cepas bacterianas sembradas y listas para incubar durante 24 horas.

6. RESULTADOS:

Los productos cárnicos usados durante la fase experimental se pueden dividir en cinco especies animales y se van a utilizar las siguientes abreviaturas para nombrar cada tipo de alimento (Tabla, 2):

<i>Sus scrofa domestica</i>	
Cer_CP	Carne picada
Cer_Cos	Costillas de cerdo
Cer_L	Lomo de cerdo
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
Cj	Conejo
Cj_P	Pulmón
<i>Ovis orientalis aries</i>	
Cor	Cordero
<i>Gallus gallus domesticus</i>	
Po	Pollo
Po_C	Corazón de pollo
Po_H	Higaditos
<i>Bos primigenius taurus</i>	
Ter	Ternera

Tabla 2: Abreviaturas para nombrar los alimentos usados

6.1 Recuento de colonias:

Una vez transcurridos los dos días tras la realización de la siembra se procedió al recuento de aquellas placas que presentaban un número de entre 30-300 colonias. Una vez finalizado el recuento se realizó el cálculo de las unidades formadoras de colonias (UFC/g) para determinar el número de microorganismos que presenta cada uno de los alimentos (Tabla, 3).

Con los datos obtenidos a partir del cálculo de UFC/g podemos estimar la cantidad de bacterias que se encuentran presentes en los distintos medios de cultivo de cada uno de los alimentos. Al dividir los productos cárnicos en origen animal podemos también comprobar, gracias al uso de los distintos medios selectivos que nos informan sobre qué tipo de bacterias podemos encontrar, en qué especie animal aparecen más bacterias de un grupo específico frente a otras especies animales en los que predominaran otras clases de bacterias.

	Medios	UFC/g
Cer_CP	EMB	1,70E+04
	KAA	7,95E+02
	MRS	2,34E+06
	TSA	1,29E+06
	VJ	4,30E+03
Cer_Cos	EMB	3,00E+06
	MRS	2,24E+06
	TSA	1,19E+06
	VJ	1,84E+04
Cer_L	EMB	6,85E+03
	MRS	9,70E+05
	TSA	1,05E+04
	VJ	8,25E+02
Cj	EMB	2,31E+03
	MRS	1,21E+04
	TSA	1,70E+03
	VJ	5,45E+03
Cj_P	EMB	7,25E+03
	MRS	2,50E+03
	TSA	3,10E+04
	VJ	1,72E+03
Cor	EMB	1,91E+04
	KAA	3,75E+02
	MRS	1,75E+06
	TSA	1,23E+06
	VJ	1,70E+04

Po	EMB	5,45E+02
	MRS	2,67E+05
	TSA	1,57E+04
	VJ	8,15E+02
Po_C	EMB	3,00E+06
	MRS	7,10E+05
	TSA	5,60E+05
	VJ	1,83E+03
Po_H	EMB	3,00E+06
	MRS	1,38E+06
	TSA	1,57E+06
	VJ	1,56E+03
Ter	EMB	2,77E+04
	MRS	8,50E+05
	TSA	2,00E+05
	VJ	1,37E+03

Tabla 3: Recuento de las distintas placas y calcula de UFC/g

La cantidad de UFC/g agrupados según el origen animal nos permite determinar que las muestras que muestran mayor presencia bacteriana son la carne de cerdo y la carne de pollo (Gráfico 1).

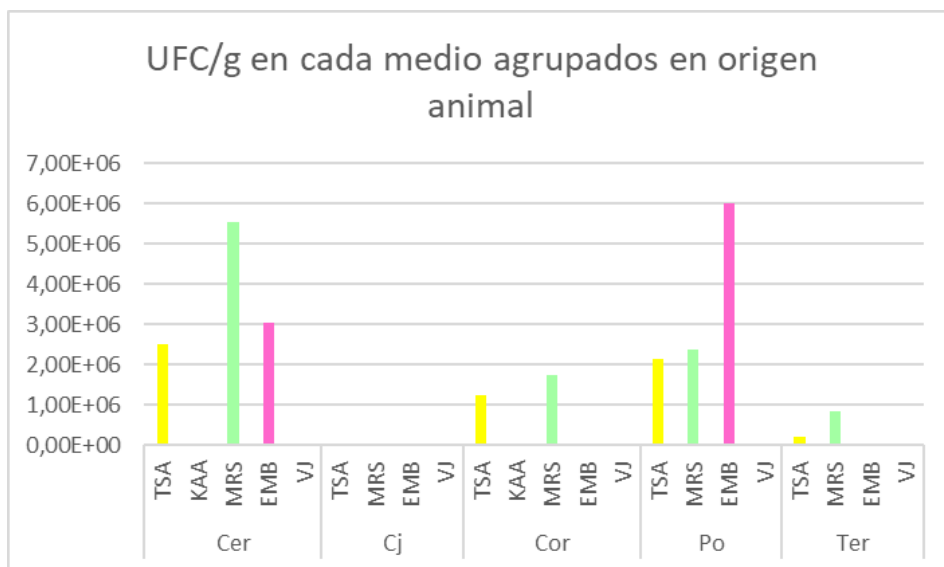


Gráfico 1: UFC/g presentes en cada medio agrupados en el tipo de especie animal.

También se puede determinar que muestra cárnica presenta más cantidad de bacterias de un tipo específico (Gráfico 2).

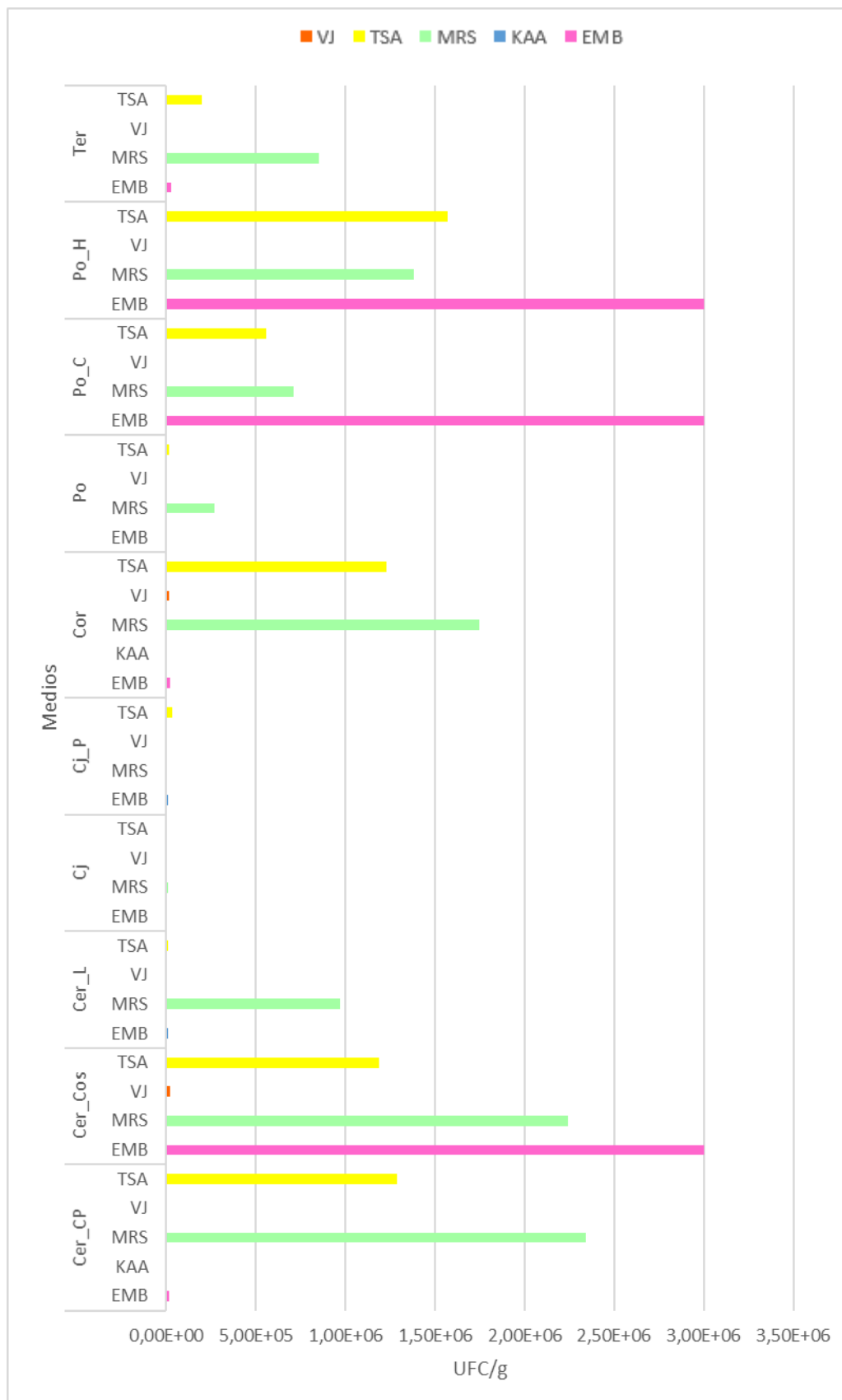


Gráfico 2: UFC/g presentes en cada uno de los medios de los distintos tipos de alimentos cárnicos.

6.2 Bacterias presentes en cada medio:

6.2.1 TSA:

Este medio debido a su alto valor nutritivo permite el crecimiento de la mayoría de los microorganismos mesófilos que se encuentran en el alimento, es decir, nos permite determinar aproximadamente la carga microbiana que hay en la muestra. La mayor presencia de estos microorganismos se encuentra en carne de cerdo y en carne de pollo, por lo que podemos determinar que estos alimentos presentan un mayor número de bacterias que los demás productos cárnicos utilizados.

Si observamos la gráfica 1 comprobamos que efectivamente estos dos productos cárnicos presentan gran cantidad de UFC/g en el medio TSA. En cerdo los dos productos cárnicos que presentan mayor valor de UFC/g son la carne picada que presenta un valor de 1.29×10^6 y las costillas con un valor de UFC/g de 1.19×10^6 , en pollo los higaditos son los que mayor valor de UFC/g presentan, mostrando un valor de 1.57×10^6 .

6.2.2 EMB:

En este medio se pueden observar microorganismos coliformes y bacilos entéricos como *E. coli*.

En este caso se observa un elevado valor de UFC/g para este medio en pollo. En cerdo también se observa un valor alto, pero es menor al que aparece en pollo. En la única especie animal que se encontró *E. coli* fue en carne de conejo (Imagen 9).

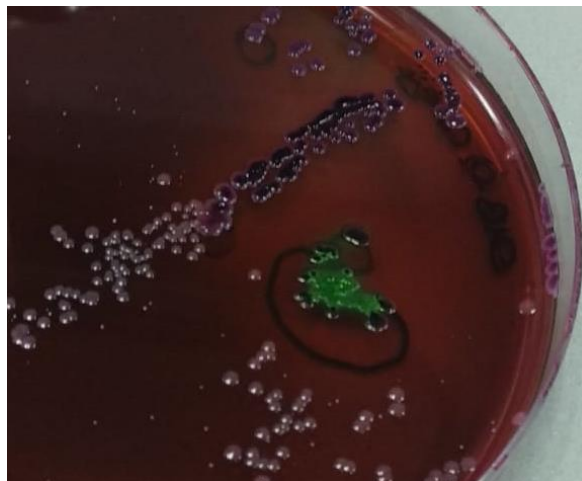


Imagen 9: *E. coli* en medio EMB de carne de conejo con el característico color verde metálico.

En estos datos obtenemos altos valores de UFC/g en carne de pollo y cerdo, siendo en pollo de 6×10^6 y en cerdo de 3.02×10^6 .

6.2.3 MRS:

En este medio selectivo se utiliza para el aislamiento de bacterias lácticas gracias al valor nutritivo determinado que le aporta este medio, aunque esto provoca que también crezcan bien las levaduras.

La especie animal con más presencia de estas bacterias es el cerdo. En este medio también se puede observar el crecimiento de levaduras, que son hongos unicelulares.

6.2.4 VJ:

Este medio detecta los estafilococos presentes en los alimentos cárnicos. En general todos los productos cárnicos presentan una pequeña presencia de estafilococos. Los que mayor valor de estafilococos presentan es el cerdo (2.35×10^4) seguido del cordero (1.70×10^4).

6.2.5 KAA:

Este medio selectivo nos permite identificar enterococos, que forman parte del grupo de las bacterias lácticas. Se estudian debido que los enterococos suelen presentar factores de virulencia, por lo que se les consideran bacterias patógenas y no es deseable su presencia en carne.

En los dos únicos alimentos cárnicos que aparecen enterococos es en carne de cerdo (7.65×10^2) y cordero (3.75×10^2).

6.3 Análisis macroscópicos y microscópico:

Una vez realizados el cálculo de UFC/g se realiza una visión macroscópica y se seleccionan aquellas colonias que difieren con respecto a las otras colonias en su forma, color, tamaño y otros aspectos como la formación de halo alrededor de la colonia. Una vez seleccionadas las colonias de interés se efectúa la prueba de la catalasa y la tinción de Gram para diferenciar las bacterias en morfología y pared celular (Tabla 4).

	Medio	Características macroscópicas	Tinción de Gram	Catalasa
Cer_CP	EMB	Colonia negra	Bacilos Gram -	+
	EMB	Colonia forma flor	Bacilos Gram -	+
	EMB	Colonia blanca pequeña	Bacilos Gram -	+
	EMB	Colonia blanca grande	Bacilos Gram -	+
	EMB	Colonia negra pequeña	Cocos Gram +	-
	KAA	Colonia negra	Cocos Gram +	-
	MRS	Colonia grande	Cocos Gram +	-
	MRS	Colonia pequeña	Bacilos Gram +	-
	VJ	Colonia negra halo amarillo	Cocos Gram +	+
	VJ	Colonia negra	Cocos Gram +	+
	VJ	Colonia blanca	Cocos Gram +	+
Cer_Cos	EMB	Colonia negra grande	Cocos Gram -	+
	EMB	Colonia negra pequeña	Bacilos Gram -	+
	EMB	Colonia blanca	Coco-bacilos Gram -	+
	EMB	Colonia flor	Bacilos Gram -	+
	MRS	Colonia blanca pequeña	Bacilos Gram +	-
	VJ	Colonia negra halo rosa	Cocos Gram +	+
	VJ	Colonia negra	Cocos Gram -	+
Cer_L	EMB	Gran colonia	Cocos Gram -	+
	EMB	Colonia blanca	Coco-bacilos Gram -	+
	EMB	Colonia negra	Coco-bacilos Gram -	+
	MRS	Colonia blanca	Filamentosa Gram +	-
	VJ	Colonias negras	Cocos Gram +	+
	VJ	Colonias negras halo amarillo	Cocos Gram +	+

Cj	EMB	Colonia negra	Bacilos Gram -	+
	EMB	Colonia blanca	Bacilos Gram -	+
	EMB	<i>E.coli</i> verde brillante	Bacilos Gram -	-
	MRS	Colonia grande	Levaduras	-
	MRS	Colonia pequeña	Cocos Gram -	+
	VJ	Colonia negra	Cocos Gram -	+
	VJ	Colonia negra halo amarillo	Cocos Gram -	+
	VJ	Colonia blanca	Bacilos Gram -	+
Cj_P	EMB	Colonia flor	Coco-bacilos Gram -	-
	MRS	Colonia blanca	Levaduras	+
	VJ	Colonia blanca	Cocos Gram +	+
	VJ	Colonia negra	Bacilos Gram +	+
	VJ	Colonia negra halo amarillo	Cocos Gram +	+

Cor	MRS	Colonia pequeña	Bacilos Gram +	-
	MRS	Colonia grande	Cocos Gram +	+
	VJ	Colonia negra halo amarillo	Cocos Gram +	+
	VJ	Colonia negra	Cocos Gram +	+

Po	EMB	Colonia blanca	Bacilos Gram -	+
	EMB	Colonia negra	Bacilos Gram -	-
	MRS	Colonia blanca pequeña	Bacilo Gram +	-
	MRS	Colonia blanca grande	Levaduras Gram +	-
	VJ	Colonia negra	Cocos Gram +	+
	VJ	Colonia blanca	Levaduras Gram +	-
	VJ	Colonia negra halo amarillo	Cocos Gram +	+
Po_C	EMB	Colonia negra	Bacilos Gram -	+
	EMB	Colonia gris	Bacilos Gram -	+
	EMB	Colonia blanca	Bacilos Gram -	+
	MRS	Colonia blanca pequeña	Bacilos Gram +	-
	VJ	Colonia negra halo amarillo	Cocos Gram +	+
	VJ	Colonia negra halo rosa	Cocos Gram +	+
Po_H	EMB	Colonias grandes blancas	Bacilos Gram -	+
	EMB	Colonias pequeñas blancas	Coco-bacilos Gram -	+
	MRS	Colonias blancas pequeñas	Cocos Gram +	-
	MRS	Colonia blanca grande	Levaduras Gram +	+
	VJ	Colonias negras pequeñas	Cocos Gram +	+
	VJ	Colonias negras grandes	Levaduras Gram +	+
Ter	EMB	Colonias negras pequeñas	Bacilos Gram -	+
	EMB	Colonias blancas	Bacilos Gram -	+
	EMB	Colonias blancas grandes	Bacilos Gram -	+
	MRS	Colonia blanca grande	Levaduras Gram +	+
	VJ	Colonias negras	Cocos Gram -	+
	VJ	Colonia negra halo rosa	Cocos Gram -	+

Tabla 4: Datos obtenidos durante los análisis macroscópicos y microscópicos.

En el medio MRS además de encontrar bacterias lácticas es muy común que en carne también aparezcan levaduras, que son hongos unicelulares. En los recuentos realizados en el medio MRS se obtuvo una presencia de levaduras de un 33%. También se observó presencia de levaduras en uno de los medios de VJ de carne de pollo cuando lo común es que únicamente crecieran estafilococos.

El medio EMB está diseñado para que el azul de metileno y la eosina Y inhiban en cierto grado la aparición de bacterias Gram + pero observamos que, en el caso de la carne picada de cerdo, aparece una colonia en el medio EMB Gram +.

La morfología más destacable y que difiere del resto las bacterias se encuentra en lomo de cerdo. En este producto cárnico se localizaron unas bacterias con morfología filamentosa (Imagen 10). Esta forma filamentosa está compuesta por bacilos Gram + dispuestos uno detrás de otro.



Imagen 10: Bacilos Gram + con morfología filamentosa

El resto de bacterias que se localizaron presentaban las siguientes morfologías:

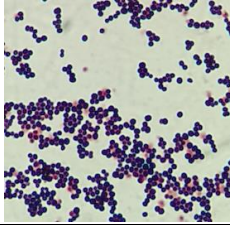
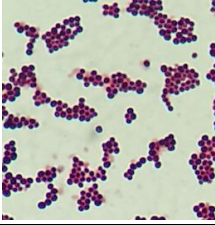
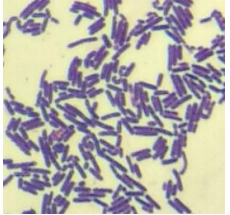
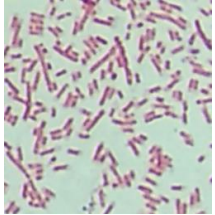
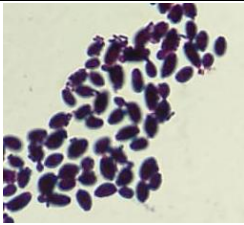
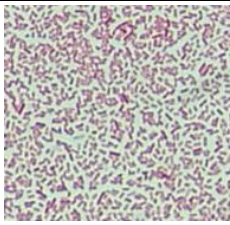
GRAM +	GRAM -
COCOS	COCOS
	
BACILOS	BACILOS
	
LEVADURAS	COCO-BACILOS
	

Tabla 5: Morfología de las bacterias identificadas en los medios

6.4 Antibiógramas:

Se procedió a realizar el antibiograma, para ello se seleccionaron distintas colonias de los distintos medios y se nombraron con un número para realizar el antibiograma e identificarlas más fácilmente (Tabla 6).

	Nº asignado	Medios	Colonia
Cer_CP	1	MRS	Colonia grande
	2	VJ	Colonia blanca
	3	EMB	Colonias negra
	4	KAA	Colonias negra
Po_H	5	VJ	Colonias negras
	6	MRS	Colonia
Po_C	7	VJ	Colonias negras pequeñas
	8	MRS	Colonia blanca
	9	EMB	Colonia blanca
Ter	10	EMB	Colonias negras pequeñas
	11	VJ	Colonia negra halo rosa
	12	MRS	Colonia ternera
Cer_L	13	VJ	Colonia negra halo amarillo
	14	EMB	Colonia blanca
	15	MRS	Colonia blanca
Cj	16	VJ	Colonia negra halo amarillo
	17	EMB	<i>E. coli</i> verde brillante
	18	MRS	Colonia blanca pequeña
Po	19	VJ	Colonia negra
	20	EMB	Colonia blanca
	21	MRS	Colonia blanca
Cor	22	MRS	Colonias pequeñas
	23	VJ	Colonias negras
	24	EMB	Colonias negras
	25	KAA	Colonia marron
Cer_Cos	26	VJ	Colonia negra halo rosa
	27	MRS	Colonia blanca
Cj_P	28	EMB	Colonia flor
	29	MRS	Colonia blanca
	30	VJ	Colonia blanca

Tabla 6: Número asignado a las colonias usadas para en el antibiograma.

Los medios MRS aparecen marcados debido a que estas colonias de este medio fueron incubadas a 30°C para un crecimiento más óptimo. El resto de colonias fueron cultivadas a 37°C.

Las colonias seleccionadas se sembraron alrededor de los tres tipos de antibióticos, ampicilina (Amp), eritromicina (E) y gentamicina (CN). Se midió la inhibición producida por el antibiótico en mm, para conocer el diámetro del halo de inhibición el valor obtenido se multiplica por dos y se le suman 10 mm que es el diámetro del

disco de antibiótico. La colonia 7 no creció por lo que no se tiene en cuenta para los datos (Tabla 7).

Colonias	Diametro de halo (mm)		
	Amp	E	CN
1	10	24	26
2	10	10	10
3	10	10	18
4	16	50	20
5	10	10	18
6	10	10	10
8	10	34	12
9	10	10	16
10	10	10	26
11	14	24	30
12	10	10	10
13	12	26	18
14	10	10	14
15	10	10	10
16	20	28	20
17	10	10	12
18	10	20	30
19	18	30	26
20	10	12	18
21	10	10	24
22	10	36	16
23	16	24	26
24	10	10	16
25	18	26	10
26	10	28	26
27	10	10	10
28	10	12	10
29	10	10	10
30	10	10	10

Tabla 7: Diámetro del halo de inhibición en milímetros.

A partir de estos datos podemos obtener el antibiótico que ha presentado más inhibición frente a las colonias que se seleccionaron (Gráfico 3). El antibiótico con mayor poder de inhibición es la eritromicina.

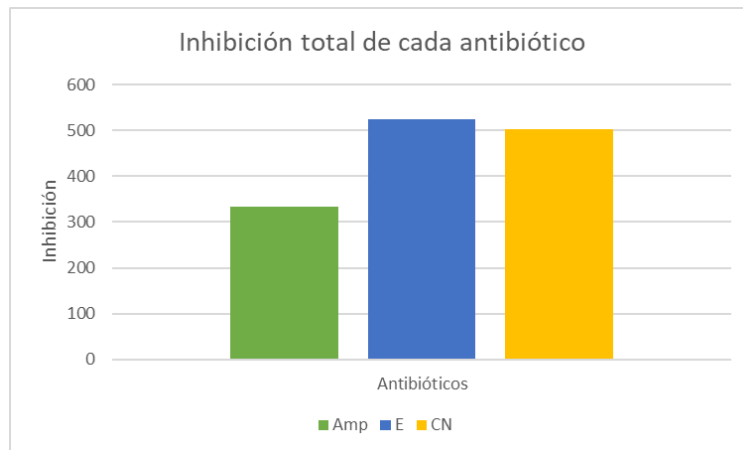


Gráfico 3: Inhibición total que produjo cada antibiótico a las colonias en milímetros.

También se puede comprobar que antibiótico es más eficiente para cada colonia en particular (Gráfico 4). Para el caso de la colonia 8 el más efectivo sería la eritromicina, sin embargo, para el caso de la colonia 10 el más apto sería la gentamicina.

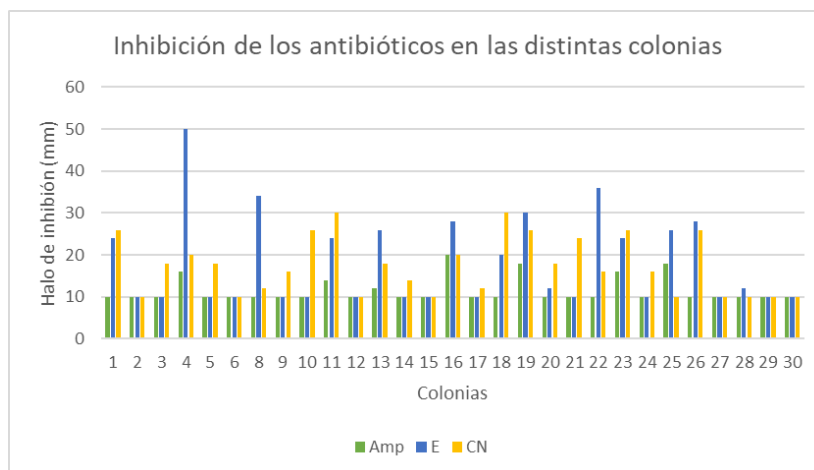


Gráfico 4: Inhibición de los antibióticos en cada colonia seleccionada.

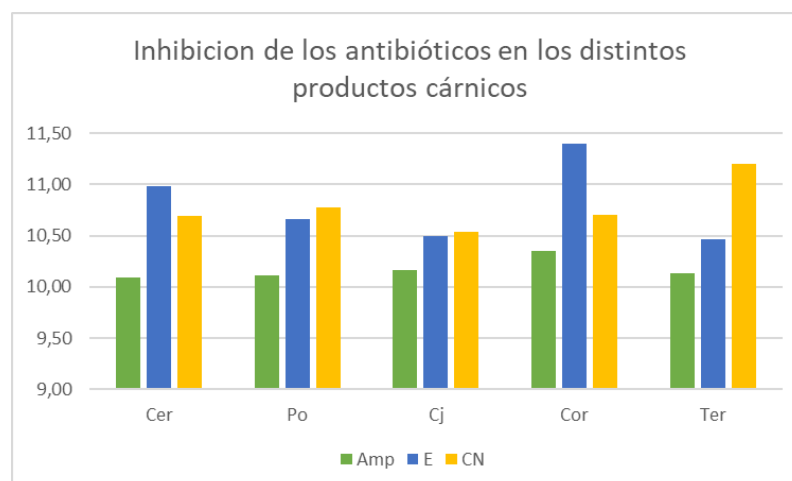


Gráfico 5: Inhibición de los antibióticos en cada uno de los productos cárnicos utilizados.

El producto cárnico que presenta más colonias con resistencia es la carne de conejo ya que los tres antibióticos presentan poca inhibición a estas colonias bacterianas.

En carne de cordero el antibiótico eritromicina inhibe en gran medida las bacterias que aparecen, este antibiótico tiene una gran actividad en cordero en comparación con el resto de productos cárnicos. En carne de ternera la gentamicina es el antibiótico más efectivo para combatir las bacterias que crecen en este tipo de carne.

7. DISCUSIÓN:

En el medio TSA observábamos un valor elevado de UFC/g en carne de cerdo y en pollo. Esta mayor presencia de microorganismos es lógica debido a que en los animales los microorganismos del sistema digestivo pueden pasar a la musculatura e infectar la carne al descuartizar los animales, en animales como el cerdo y las aves el sistema digestivo circula cerca de la carne y esta proximidad facilita el paso de los microorganismos a zonas del animal que se usan para su comercialización y alimentación. Un ejemplo de esto aparece en el estudio de Hansson en 2018, en el que se afirmaba que la carne de pollo se podía contaminar con *Campylobacter* durante el sacrificio si los pollos eran portadores intestinales de esta bacteria.

En EMB se obtuvieron valores superiores en pollo que en cerdo al igual que otros estudios previamente realizados. En carne de pollo es frecuente encontrar un gran número de enterobacterias con respecto a otros tipos de alimentos cárnicos, alcanzando a menudo valores próximos a 1×10^7 UFC/g (Säde et al, 2013). En otro estudio realizado por Bantawa en 2018, se realizaron recuentos de coliformes y se obtuvieron valores superiores en carne de pollo que en cerdo. En carne de cerdo se obtuvieron en log10 un valor de $6,16 \pm 0,92$ UFC / g ($1,44 \times 10^6$) y en carne de pollo el recuento de coliformes fue en log10 un valor de $8,13 \pm 0,13$ UFC / g ($1,3 \times 10^8$). En la fase experimental del trabajo realizado obtuvimos un valor para cerdo de $3,02 \times 10^6$ y en pollo el valor obtenido fue de 6×10^6 .

Se observó la presencia de una colonia Gram + en el medio EMB en carne picada de cerdo. Esta colonia puede tratarse de *Enterococcus faecalis*, ya que es un enterococo Gram + con catalasa negativa que puede crecer eludiendo los inhibidores del medio EMB según las instrucciones del fabricante. *E. faecalis* se

trata de una bacteria del tracto intestinal humano, y al tratarse de carne picada, nos lleva a pensar en una posible contaminación durante la manipulación del producto.

En el medio selectivo EMB crecen mayoritariamente bacterias bacilares con catalasa positiva, características propias de la familia *Enterobacteriaceae*, que son principalmente las bacterias que crecen en este medio. En un estudio realizado por Bantawa en 2019, mostro que los géneros *Escherichia*, *Salmonella* y *Shigella* de la familia *Enterobacteriaceae* mostraban gran resistencia a distintos tipos de fármacos como la amoxicilina y tetraciclina en los cuales la que mayor resistencia presentaba era *E. coli* con un valor 100% y 93% respectivamente.

El producto cárnico con mayor presencia de bacterias lácticas en el medio MRS fue el cerdo. Este alto valor de lactobacilos en cerdo se puede deber a que estas bacterias se usan para inhibir el crecimiento de otras bacterias patógenas ya que presentan bacteriocina que evita su crecimiento (Di Gioia et al 2016). Determinados lactobacilos disminuyen la presencia de coliformes, *S. aureus* y bacterias totales (Le et al. 2019), esto puede explicar porque es mayor la presencia de coliformes en pollo que en cerdo. La mayoría de las bacterias lácticas presentan los factores de virulencia bajos, y también presentan una resistencia a antibióticos muy escasa (Todorov et al, 2017).

En la carne prevalece la microbiota bacteriana como contaminante, pero también suelen aparecer levaduras en productos cárnicos frescos de manera escasa. En el caso del medio MRS se observó una presencia del 33% de levaduras. La colonización de levaduras en carne es debido al elevado contenido que presenta esta en compuestos nitrogenados, y a las condiciones que ofrece tan nutritivas para el crecimiento de levaduras (Ratón & de los Milagros, 2004).

El medio selectivo VJ permite el crecimiento de estafilococos, entre ellos la especie más importante *S. aureus*. Los productos cárnicos con más presencia de estafilococos fueron la carne de cordero y la de cerdo. En estudios como el de Mama en 2019, en cordero se detectaron un 54% de estafilococos y un 29.7% de *S. aureus*, que fueron valores superiores a los que se obtuvieron en otras carnes. En estudios como los de Hansson en 2001, se encontró presencia de estafilococos en el 49% de las muestras de cerdo. *S. aureus* presenta una gran resistencia a distintos tipos de fármacos y esto puede ser debido al uso indiscriminado de los

productos cárnicos, que produce resistencias que pueden provocar daños en los humanos (Bantawa et al, 2019).

El medio KAA permite el crecimiento de la familia *Enterococcaceae*, que son bacterias con morfología de cocos con catalasa negativa. En este medio solo aparecieron bacterias en dos de los productos cárnicos, en cordero y cerdo. La presencia de enterococos en el estudio de Tyson en 2017 fue del 85,8% en carne de chuletas de cerdo. Golob en 2019 determino que las dos especies de enterococos más comunes en productos cárnicos son *E. faecalis* (69.5%) y *E. faecium* (11.3%). Un 29.6% de las muestras de *E. faecalis* mostraron resistencia a múltiples fármacos en este estudio.

Los antibiogramas realizados en este estudio mostraron resistencias en la mayoría de colonias usadas. El peligro de usar antibióticos en la producción animal, es que determinadas bacterias pueden desarrollar una mayor resistencia y puede provocar graves enfermedades en humanos las cuales no se podrán tratar con los fármacos habituales (Schrijver et al, 2018). Es importante usar distintos antibióticos en animales y en personas para evitar resistencia a fármacos por parte de las bacterias que son usados por los humanos para evitar muertes provocadas por bacterias resistentes a antibióticos.

8. Conclusión:

- 1) La carne de cerdo fue el producto cárnico que presentaba los recuentos más altos de microbiota total de los alimentos escogidos. Además, hubo crecimiento bacteriano en todos los medios selectivos usados (coliformes, bacilos entéricos, lactobacilos, estafilococos y enterococos).
- 2) El conejo fue el producto cárnico que presento menor número de bacterias, pero fue la única muestra en la que se identificó la especie *E. coli*. La presencia de *E. coli* puede ser debido a una mala manipulación humana.
- 3) En la mayoría de las muestras no se encontraron bacterias patógenas, pero si preocupa el crecimiento de enterococos en dos de las muestras. También en la muestra de conejo apareció *E. coli*, aunque no en cantidades preocupantes, pero ciertas cepas de esta especie están presentando resistencias a antibióticos y si puede suponer un problema para la salud alimentaria.

- 4) Las bacterias aisladas en los medios diferenciales presentaban las morfologías y características de su pared celular (tinción de Gram) típicas de cada medio, de modo que se mostraron como medios adecuados para el aislamiento de bacterias patógenas o alterantes.
- 5) En todas las colonias usadas para los antibiogramas aparecía una fuerte resistencia a la ampicilina, el único producto cárnico que presentaba bacterias con una menor resistencia frente a este antibiótico fue la carne de cordero.
- 6) Los antibióticos eritromicina y gentamicina presentaban una mayor inhibición, siendo la eritromicina más eficaz en carne de cordero y la gentamicina en ternera.
- 7) Se podría recomendar la ampicilina como antibiótico en la industria animal y reservar la gentamicina y eritromicina como antibióticos para el ser humano para evitar que aparezcan resistencias.

9. Bibliografía:

Atlas, R. M. (2010). Handbook of microbiological media. Handbook of microbiological media. (Ed. 4).

Bantawa, K., Rai, K., Subba Limbu, D., & Khanal, H. (2018). Food-borne bacterial pathogens in marketed raw meat of Dharan, eastern Nepal. *BMC research notes*, 11(1), 618. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3722-x>

Bantawa, K., Sah, S. N., Subba Limbu, D., Subba, P., & Ghimire, A. (2019). Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Vibrio* isolated from chicken, pork, buffalo and goat meat in eastern Nepal. *BMC research notes*, 12(1), 766. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4798-7>

Barker, G. C., Malakar, P. K., Plowman, J., & Peck, M. W. (2016). Quantification of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* Spore Loads in Food Materials. *Applied and environmental microbiology*, 82(6), 1675–1685. <https://doi.org/10.1128/AEM.03630-15>

Boonyong, N., Kaewmongkol, S., Khunbutsri, D., Satchasataporn, K., & Meekhanon, N. (2019). Contamination of *Streptococcus suis* in pork and edible pig

organs in central Thailand. *Veterinary world*, 12(1), 165–169.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.165-169>

Chin, P. S., Ang, G. Y., Yu, C. Y., Tan, E. L., Tee, K. K., Yin, W. F., Chan, K. G., & Tan, G. (2018). Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Genetic Diversity of *Listeria* spp. Isolated from Raw Chicken Meat and Chicken-Related Products in Malaysia. *Journal of food protection*, 81(2), 284–289. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-186>

Coico R. (2005). Gram staining. *Current protocols in microbiology*, Appendix 3.
<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs00>

Dai, H., Wang, Y., Fang, Y., Huang, Z., Kan, B., & Wang, D. (2018). *Proteus alimentorum* sp. nov., isolated from pork and lobster in Ma'anshan city, China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(4), 1390–1395.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002689>

Di Gioia, D., Mazzola, G., Nikodinoska, I., Aloisio, I., Langerholc, T., Rossi, M., Raimondi, S., Melero, B., & Rovira, J. (2016). Lactic acid bacteria as protective cultures in fermented pork meat to prevent *Clostridium* spp. growth. *International journal of food microbiology*, 235, 53–59.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.019>

Garedew, L., Hagos, Z., Zegeye, B., & Addis, Z. (2016). The detection and antimicrobial susceptibility profile of *Shigella* isolates from meat and swab samples at butchers' shops in Gondar town, Northwest Ethiopia. *Journal of infection and public health*, 9(3), 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.10.015>

Golob, M., Pate, M., Kušar, D., Dermota, U., Avberšek, J., Papić, B., & Zdovc, I. (2019). Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from Humans and Retail Red Meat. *BioMed research international*, 2019, 2815279. <https://doi.org/10.1155/2019/2815279>

Hansson I. B. (2001). Microbiological meat quality in high- and low-capacity slaughterhouses in Sweden. *Journal of food protection*, 64(6), 820–825.
<https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.6.820>

Hansson, I., Sandberg, M., Habib, I., Lowman, R., & Engvall, E. O. (2018). Knowledge gaps in control of *Campylobacter* for prevention of campylobacteriosis.

Transboundary and emerging diseases, 65 Suppl 1, 30–48.
<https://doi.org/10.1111/tbed.12870>

Kieffer, N., Nordmann, P., & Poirel, L. (2017). *Moraxella* Species as Potential Sources of MCR-Like Polymyxin Resistance Determinants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(6), e00129-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00129-17>

Laskowski, W., Górská-Warsewicz, H., & Kulykovets, O. (2018). Meat, Meat Products and Seafood as Sources of Energy and Nutrients in the Average Polish Diet. *Nutrients*, 10(10), 1412. <https://doi.org/10.3390/nu10101412>

Laxminarayan, R., Matsoso, P., Pant, S., Brower, C., Røttingen, J. A., Klugman, K., & Davies, S. (2016). Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet (London, England)*, 387(10014), 168–175. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00474-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00474-2)

Le, N., Bach, L. G., Nguyen, D. C., Le, T., Pham, K. H., Nguyen, D. H., & Hoang Thi, T. T. (2019). Evaluation of Factors Affecting Antimicrobial Activity of Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* Microencapsulated in Alginate-Gelatin Capsules and Its Application on Pork Meat as a Bio-Preservative. *International journal of environmental research and public health*, 16(6), 1017. <https://doi.org/10.3390/ijerph16061017>

Lehotay S. J. (2018). Food safety analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410(22), 5329–5330. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1129-0>

López Tomás, L. Á. (2004). Actividad aminopetidásica ligada a membrana de bacterias GRAM-negativas: prueba de la P-nitroanilina para la estimación de la carga bacteriana de carne picada. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones. <https://eprints.ucm.es/5285/>

Mama, O. M., Gómez-Sanz, E., Ruiz-Ripa, L., Gómez, P., & Torres, C. (2019). Diversity of staphylococcal species in food producing animals in Spain, with detection of PVL-positive MRSA ST8 (USA300). *Veterinary microbiology*, 233, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.013>

Manges A. R. (2016). *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European*

Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 22(2), 122–129.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.11.010>

Manual básico de microbiología Cultimed (MEDIOS): CULTIMED (2003) Manual Básico de Microbiología. Cultimed 4ª Edición. PANREAC Química S.A. España.

Marí-Almirall, M., Cosgaya, C., Pons, M. J., Nemec, A., Ochoa, T. J., Ruiz, J., Roca, I., & Vila, J. (2019). Pathogenic *Acinetobacter* species including the novel *Acinetobacter dijkshoorniae* recovered from market meat in Peru. *International journal of food microbiology*, 305, 108248.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108248>

Martínez, R. M. G. (2013). Contaminación de los alimentos durante los procesos de origen y almacenamiento. *Aldaba: revista del Centro Asociado a la UNED de Melilla*, (36), 51-64.

Moyes, R. B., Reynolds, J., & Breakwell, D. P. (2009). Differential staining of bacteria: gram stain. *Current protocols in microbiology*, Appendix 3.
<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs15>

Nisar, M., Ahmad, M., Mushtaq, M. H., Shehzad, W., Hussain, A., Nasar, M., Nagaraja, K. V., & Goyal, S. M. (2018). Occurrence of *Campylobacter* in retail meat in Lahore, Pakistan. *Acta tropica*, 185, 42–45.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.04.030>

Niyonzima, E., Ongol, M. P., Brostaux, Y., Korsak, N., Daube, G., Kimonyo, A., & Sindic, M. (2018). Meat retail conditions within the establishments of Kigali city (Rwanda): bacteriological quality and risk factors for *Salmonella* occurrence. *Tropical animal health and production*, 50(3), 537–546.
<https://doi.org/10.1007/s11250-017-1466-6>

Nortjé, G. L., Nel, L., Jordaan, E., Badenhorst, K., Goedhart, E., & Holzapfel, W. H. (1990). The aerobic psychotrophic populations on meat and meat contact surfaces in a meat production system and on meat stored at chill temperatures. *The Journal of applied bacteriology*, 68(4), 335–344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02883.x>

Osimani, A., Aquilanti, L., Pasquini, M., & Clementi, F. (2017). Prevalence and risk factors for thermotolerant species of *Campylobacter* in poultry meat at retail in Europe. *Poultry science*, 96(9), 3382–3391. <https://doi.org/10.3382/ps/pex143>

Pekana, A., & Green, E. (2018). Antimicrobial Resistance Profiles of *Staphylococcus aureus* Isolated from Meat Carcasses and Bovine Milk in Abattoirs and Dairy Farms of the Eastern Cape, South Africa. *International journal of environmental research and public health*, 15(10), 2223. <https://doi.org/10.3390/ijerph15102223>

Piras, C., Roncada, P., Rodrigues, P. M., Bonizzi, L., & Soggiu, A. (2016). Proteomics in food: Quality, safety, microbes, and allergens. *Proteomics*, 16(5), 799–815. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500369>

Praveen, P. K., Debnath, C., Shekhar, S., Dalai, N., & Ganguly, S. (2016). Incidence of *Aeromonas* spp. infection in fish and chicken meat and its related public health hazards: A review. *Veterinary world*, 9(1), 6–11. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.6-11>

Ramadan, H., & Awad, A. (2017). Phenotypic and genetic characterization of β -lactam resistance in *Klebsiella* from retail chicken meat in Mansoura, Egypt. *Iranian journal of microbiology*, 9(2), 74–81. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5715280/>

Ratón, O. & de los Milagros, T. (2004). Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. *Revista Cubana de Salud Pública*, 30(3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662004000300016&lng=es&tlng=es

Säde, E., Murros, A., & Björkroth, J. (2013). Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry. *Food Microbiology*, 34(2), 252–258. doi:10.1016/j.fm.2012.10.007

Sanches, M. S., Baptista, A., de Souza, M., Menck-Costa, M. F., Koga, V. L., Kobayashi, R., & Rocha, S. (2019). Genotypic and phenotypic profiles of virulence factors and antimicrobial resistance of *Proteus mirabilis* isolated from chicken carcasses: potential zoonotic risk. *Brazilian journal of microbiology*: [publication of

the Brazilian Society for Microbiology], 50(3), 685–694.
<https://doi.org/10.1007/s42770-019-00086-2>

Santovito, E., Greco, D., Logrieco, A. F., & Avantaggiato, G. (2018). Eubiotics for Food Security at Farm Level: Yeast Cell Wall Products and Their Antimicrobial Potential Against Pathogenic Bacteria. *Foodborne pathogens and disease*, 15(9), 531–537. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2430>

Schrijver, R., Stijntjes, M., Rodríguez-Baño, J., Tacconelli, E., Babu Rajendran, N., & Voss, A. (2018). Review of antimicrobial resistance surveillance programmes in livestock and meat in EU with focus on humans. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(6), 577–590. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.09.013>

Shaw, B. G., & Latty, J. B. (1982). A numerical taxonomic study of *Pseudomonas* strains from spoiled meat. *The Journal of applied bacteriology*, 52(2), 219–228. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1982.tb04843.x>

Shousha, A., Awaiwanont, N., Sofka, D., Smulders, F. J., Paulsen, P., Szostak, M. P., Humphrey, T., & Hilbert, F. (2015). Bacteriophages Isolated from Chicken Meat and the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes. *Applied and environmental microbiology*, 81(14), 4600–4606. <https://doi.org/10.1128/AEM.00872-15>

Sirghani, K., Zeinali, T., & Jamshidi, A. (2018). Detection of *Yersinia enterocolitica* in Retail Chicken Meat, Mashhad, Iran. *Journal of pathogens*, 2018, 1286216. <https://doi.org/10.1155/2018/1286216>

Stanborough, T., Fegan, N., Powell, S. M., Tamplin, M., & Chandry, P. S. (2017). Insight into the Genome of *Brochothrix thermosphacta*, a Problematic Meat Spoilage Bacterium. *Applied and environmental microbiology*, 83(5), e02786-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02786-16>

Taylor, W. I., & Achanzar, D. (1972). Catalase test as an aid to the identification of *Enterobacteriaceae*. *Applied microbiology*, 24(1), 58–61. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC380547/>

Tegegne, H. A., & Phyto, H. (2017). Food safety knowledge, attitude and practices of meat handler in abattoir and retail meat shops of Jigjiga Town, Ethiopia. *Journal*

of preventive medicine and hygiene, 58(4), E320–E327.
<https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2017.58.4.737>

Terentjeva, M., Avsejenko, J., Streikiša, M., Utināne, A., Kovaļenko, K., & Bērziņš, A. (2017). Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella in meat and meat products in Latvia. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*, 24(2), 317–321. <https://doi.org/10.5604/12321966.1235180>

Tewari, A., Singh, S. P., & Singh, R. (2015). Incidence and enterotoxigenic profile of *Bacillus cereus* in meat and meat products of Uttarakhand, India. *Journal of food science and technology*, 52(3), 1796–1801. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1162-0>

Todorov, S. D., Stojanovski, S., Iliev, I., Moncheva, P., Nero, L. A., & Ivanova, I. V. (2017). Technology and safety assessment for lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian fermented meat product "lukanka". *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 48(3), 576–586. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.005>

Tyson, G. H., Nyirabahizi, E., Crarey, E., Kabera, C., Lam, C., Rice-Trujillo, C., McDermott, P. F., & Tate, H. (2017). Prevalence and Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Retail Meats in the United States, 2002 to 2014. *Applied and environmental microbiology*, 84(1), e01902-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01902-17>

Urrialde R. (2019). Evolución de la información relacionada con la alimentación y la nutrición. Retos de adaptación para y por el consumidor [Evolution of information about feeding and nutrition. Challenges for and by the consumer]. *Nutricion hospitalaria*, 36(Spec No3), 13–19. <https://doi.org/10.20960/nh.02800>

Vásquez, S. M., Suárez, H., & Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de nutrición*, 36(1), 64-71. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182009000100007>

Walker-York-Moore, L., Moore, S. C., & Fox, E. M. (2017). Characterization of Enterotoxigenic *Bacillus cereus* sensu lato and *Staphylococcus aureus* Isolates and

Associated Enterotoxin Production Dynamics in Milk or Meat-Based Broth. *Toxins*, 9(7), 225. <https://doi.org/10.3390/toxins9070225>

Yamaji, R., Friedman, C. R., Rubin, J., Suh, J., Thys, E., McDermott, P., Hung-Fan, M., & Riley, L. W. (2018). A Population-Based Surveillance Study of Shared Genotypes of *Escherichia coli* Isolates from Retail Meat and Suspected Cases of Urinary Tract Infections. *mSphere*, 3(4), e00179-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00179-18>

Yibar, A., Cetin, E., Ata, Z., Erkose, E., & Tayar, M. (2018). *Clostridium perfringens* Contamination in Retail Meat and Meat-Based Products in Bursa, Turkey. *Foodborne pathogens and disease*, 15(4), 239–245. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2350>

Zeighami, H., Nejad-Dost, G., Parsadanians, A., Daneshamouz, S., & Haghi, F. (2019). Frequency of hemolysin BL and non-hemolytic enterotoxin complex genes of *Bacillus cereus* in raw and cooked meat samples in Zanjan, Iran. *Toxicology reports*, 7, 89–92. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.12.006>

Zhang, P., Badoni, M., Gänzle, M., & Yang, X. (2018). Growth of *Carnobacterium* spp. isolated from chilled vacuum-packaged meat under relevant acidic conditions. *International journal of food microbiology*, 286, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.032>