



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Ánàlisis microbiològico de alimentos càrnicos

Alumno: Irene Ortega Blázquez

Julio, 2014



UNIVERSIDAD DE JAÉN

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN BIOLOGÍA

Trabajo Fin de Grado

Ánàlisis microbiològico de alimentos càrnicos

Irene Ortega Blázquez

Jaén. Julio, 2014

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Irene Ortega Blázquez", is written on a white background.

ÍNDICE

ABSTRACT.....	4
RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Métodos de procesado y conservación.....	5
1.2. Microflora inicial del cerdo.....	06
1.3. Alteración	7
1.4. Patógenos	9
1.5. Tipos de microorganismos	13
1.6. Infecciones endógenas	14
1.7. Fuente de contaminación	14
1.8. Carnes crudas picadas.....	14
1.9. Productos cárnicos cocidos.....	15
1.10 Productos cárnicos secos	¡Error! Marcador no definido.
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Material necesario	18
3.2. Medios de cultivo utilizados.....	19
3.3. Preparación del material	22
3.4. Tratamiento de las muestras y recuento	23
3.5. Tinción de gram.....	25
3.6. Prueba de la catalasa	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
5. CONCLUSIÓN.....	36
6. BIBLIOGRAFÍA.....	37

ABSTRACT

Having good food control in terms of processing, storage or cooking is necessary to obtain a good final product. Meat can convey to consumers microorganisms such as *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* ...

The source of contamination may be different, for example, the environment, equipment and utensils water transport and storage ...

During this experiment has been performed, a microbiological study of various meat products in order to observe the existence of different microorganisms in them. The presence of microorganisms does not mean the product is spoiled, since many of the organisms are part of the processes of fermentation and lead to the organoleptic characteristics of those foods.

RESUMEN

Tener un buen control de los alimentos en cuanto a la elaboración, conservación o cocinado es necesario para poder obtener un buen producto final. La carne puede transmitir a los consumidores microorganismos tales como: *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* ...

La fuente de contaminación puede ser diferente, por ejemplo, el medio ambiente, el equipo, utensilios, agua, el transporte y el almacenamiento...

Durante este experimento se ha realizado un estudio microbiológico de distintos alimentos cárnicos con el fin de observar la existencia de diferentes microorganismos en ellos. La presencia de microorganismos no significa que el producto esté en mal estado, ya que muchos de los microorganismos forman parte de los procesos de fermentación y dan lugar a las características organolépticas de esos alimentos.

1. INTRODUCCIÓN

El control microbiológico de alimentos tiene como objetivo suministrar productos seguros o inocuos, nutritivos y sabrosos, con una vida comercial adecuada y a un coste razonable para el consumidor.

Los microorganismos que influyen de manera decisiva sobre la conservación de la carne, llegan a la superficie cuando el animal es abierto en canal a través del proceso de matanza. Se multiplican en mayor o menor medida, dependiendo de las condiciones de refrigeración, luego durante el despiece y picado de la carne se redistribuyen por las nuevas superficies generadas por el corte. A través de la superficie se introducen un gran número de bacterias, levaduras y hongos en el establecimiento donde se elabora. El contenido de gérmenes superficiales puede ser muy variable, dependiendo de la higiene en la matanza y del transporte.

La alteración de la carne se produce por microorganismos que pueden tener acceso a la misma por infección del animal vivo (infección endógena) o por contaminación de la carne postmortem (infección exógena).

La carne puede transmitir a los consumidores los microorganismos causantes de toxiinfecciones alimentarias, entre los que figuran *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* enterohemorrágico, algunos serovares de *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Cl. botulinum* y *Bacillus cereus*. Las carnes se pueden alterar a causa de una serie de deteriorantes, como *Pseudomonas spp.*, *Shewanella*, *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta*, mohos, bacterias lácticas y levaduras.

1.1. Métodos de procesado y conservación

Los microorganismos alterantes crecen rápidamente en la carne, por ello es un alimento muy perecedero. Por lo tanto, el comercio cárnico, incluso a nivel local, depende en cierto grado de los sistemas de conservación que controlan la flora alterativa. Cuando mayor sea el procesado o manipulación y mayor también la distancia hasta el mercado, más necesaria será la conservación.

Los sistemas de conservación más importantes son la refrigeración, la congelación, el tratamiento térmico, el enlatado, el curado y la desecación. A menudo se

combinan varios métodos, para disminuir el crecimiento microbiano. Almacenar la carne fresca a temperaturas de refrigeración, permite su conservación durante un tiempo antes de que comience la alteración. No obstante, el envasado al vacío de la carne refrigerada permite ampliar su vida de almacén hasta unas 12 semanas. Hay otros tipos de carnes como el magro de cerdo curado, que después de enlatado también puede tratarse con calor y conservarse en refrigeración sin ningún peligro.

1.2. Microflora inicial de los cerdos

En los lechones lactantes la microflora inicial del tracto intestinal se compone principalmente de grandes poblaciones de *E.coli*, *Cl. perfringens* y estreptococos (Smith, 1961). A medida que el animal crece la cantidad de estos microorganismos disminuyen y los anaerobios obligados esporulados se convierten en el intestino grueso en los más abundantes.

Los animales jóvenes son más sensibles que los adultos a las infecciones por *Salmonella*.

No obstante, son muchos los serotipos que de forma intermitente o transitoria albergan los cerdos sin que presenten síntomas evidentes de la enfermedad.

En el intestino grueso de los cerdos se encuentran frecuentemente (61-100% de las muestras) cepas de *Campylobacter* spp. cuyos recuentos en las heces llegan a 10^3 - 10^4 microorganismos/g (Teufel, 1982). La mayoría de las cepas aisladas corresponden a *Campylobacter coli* y sólo un porcentaje pequeño a *C. jejuni*

En las heces de los cerdos y en las amígdalas de los sacrificados también se ha detectado microorganismos como: *Listeria monocytogenes*. Los cerdos sanos suelen contener a menudo serotipos de *Y. enterocolitica* que son indistinguibles de las cepas patológicas humanas. Generalmente las tasas de aislamiento de la garganta, amígdalas y lengua son mayores que en otras partes como son el ciego y las heces del animal (Schiemann, 1989).

Yersinia enterocolitica también se transmite de unos cerdos a otros y aparece en pequeña cantidad en el contenido del ciego (Fukushima et al., 1991). La piel puede contaminarse con *Yersinia* ssp.

En la epidermis de los cerdos también podemos encontrar gran población microbiana formada por la flora residente y una serie de microorganismos (incluidos salmonelas, *Y. enterocolitica* y *Listeria*) adquiridos durante su desplazamiento, del medio de la granja y en los locales de descanso dentro del matadero. *Staphylococcus hyicus* es muy corriente en el hocico de estos animales y en la piel, también se puede encontrar *S. aureus* (Devrise, 1990).

1.3. Alteración

La alteración se define como "*Cualquier modificación beneficiosa o perjudicial de las características físicas y/o químicas del alimento, pero que no supone riesgo para la salud*".

La alteración de los alimentos la podemos clasificar en: físicas, químicas, biológicas y fisiológicas.

Las alteraciones biológicas son ocasionadas por:

- Insectos y roedores
- Microorganismos: pueden modificar las características de los alimentos, dan lugar a dos alteraciones fundamentales, la fermentación y la putrefacción

En el caso de la alteración microbiológica dependiendo del microorganismo que participe puede afectar a tabla1:

Aerobios :	Anaerobios:
Viscosidad Decoloración Pigmentación Enranciamiento Enmohecimiento Decoloración Lipólisis Fosforescencias Olores y sabores anormales	Agriado Putrefacción Hueso hediondo

Tabla1: tipos de alteración dependiendo del agente microbiológico

En condiciones de refrigeración no crecen mesófilos, siendo los psicrotrofos los responsables de la alteración. La velocidad de la alteración aumenta con el número de psicrotrofos contaminantes, con el aumento de la temperatura de almacenamiento y con el aumento de la a_w del tejido superficial. La alteración es el resultado de la formación de colonias visibles viscosas y de malos olores. Los olores repugnantes se aprecian cuando los recuentos alcanzan unos 10^7 microorganismos/cm². A unas a_w menores las colonias no se unen por coalescencia, y son pequeñas y discretas. La alteración se inicia primero en las zonas húmedas (cerca del diafragma, cavidad abdominal de las ovejas, el cuello y en los pliegues de las extremidades anteriores...).

En la flora alterativa dominan sobre todo los bacilos psicrotrofos aerobios, Gram negativos, móviles e inmóviles, clasificados antes como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* y afines a *Moraxella*; ahora se clasifican como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* y *Psychrobacter immobilis* (Dainty y Mackey, 1992). Las pseudomonadales comprenden más del 50% de la flora alterativa, siendo

las más importantes *Pseudomonas fragi*. El almacenamiento a 5 °C, en vez de a 0.1°C, favorece su crecimiento (Dianty y Mackey, 1992). Cuando tenemos una temperatura ambiente de almacenamiento alta (25-30°C) la flora alterante está formada predominantemente por *enterobacteriaceas* y *Acinetobacter* spp. (Gill y Newton, 1980; Rao y Sreenivasamurthy, 1985). Cuando el almacenamiento ha hecho que la superficie permanezca seca pueden aparecer colonias de micrococos, levaduras y mohos. El crecimiento en las canales es irregular, debido principalmente a variaciones en la a_w superficial.

1.4. Patógenos

La contaminación es "*la modificación que sufren los alimentos por la presencia de gérmenes o elementos extraños como metales, productos tóxicos, etc... que suponen un riesgo para la salud del consumidor*". La mayoría de las veces la contaminación se produce por microorganismos patógenos como:

Gram negativos:

- ***Campylobacter jejuni***. En el 20-60% de las canales porcinas se ha encontrado *Campylobacter*. Después del sacrificio se ha encontrado *C. jejuni* en el 19-70% de las canales de lanares, en el 2-32% de las vacunas adultos y en el 20-97% de las canales de terneras.
- ***Escherichia coli* O157:H7**. Crece cuando el almacenamiento en refrigeración o las condiciones de transporte no son las correctas, como por ejemplo, temperaturas mayores de 7°C.

Un pequeño porcentaje de ganado vacuno que llega al matadero puede albergar en sus intestinos *E. coli* enterohemorrágico O157:H7.

La carne picada mal cocinada, contaminada con *E.coli* O157:H7, ha causado diversos brotes de diarrea sanguinolenta (colitis hemorrágica) y del síndrome urémico hemolítico (Doyle, 1991; Griffin y Tauxe, 1991).

- ***Salmonella***. Pueden surgir brotes de salmonelosis a consecuencia de un inadecuado proceso culinario, de una manipulación poco cuidadosa o porque se produzca una contaminación de la carne.

La incidencia de salmonelas puede variar mucho. A veces las salmonelas se encuentran raramente en las canales (Biemuller et al., 1973), en otras ocasiones aparecen en la mitad aproximadamente de las canales (Oosterom y Notermans, 1983) y otras veces en todas las canales de un rebaño (Grau y Smith, 1974).

La refrigeración, el transporte y el almacenamiento mal realizados, a temperaturas mayores de 7°C les permite desarrollarse.

- ***Yersinia enterocolitica***. El cuidado puesto en la evisceración influye mucho en la contaminación con *Y. enterocolitica* (Andersen et al., 1991). Para evitar la contaminación hay que separar con cuidado la lengua de las amígdalas. La incidencia de serotipos de *Y. enterocolitica* en las canales de cerdo varía desde muy baja (0 en 210 canales; de Boer y Nouws, 1991; 2,5%; Mafu et al., 1989) a muy alta (31%; Christensen, 1987; 63%; Nesbakken, 1988).

Gram positivas:

- ***Clostridium botulinum***. La mayoría de los casos de botulismo debidos a la carne, han sido originados por productos cárnicos procesados, mal conservados, elaborados en casas particulares y consumidos sin ningún tipo de cocinado (Tompkin, 1980).

La mayoría de los clostridios de las carnes crudas son mesófilos putrefactivos inoos. Sin embargo, de cuando en cuando puede encontrarse *Cl. Botulinum*. No se dispone de medios que garanticen la falta de *Cl. botulinum* en la carne cruda. Se ha calculado que su intervalo de contaminación varía de <0,1 espora a 7 esporas por kg (Lücke y Roberts, 1993).

- ***Clostridium perfringens***. Se encuentra en ella en pequeño número (<200/100 cm²) y principalmente en forma vegetativa. Es un contaminante corriente de la superficie. La contaminación tiene lugar a partir de los animales. Los tejidos internos de los despojos (por ej., el hígado) pueden contener *Clostridium*

perfringens. La carne fresca se almacena a temperaturas ($<15^{\circ}\text{C}$) demasiado bajas para permitir su crecimiento. La toxiinfección alimentaria se debe a la supervivencia de esporas en las carnes cocinadas y a un crecimiento suficiente ($> 10^5$ UFC/g) durante una refrigeración deficiente de los productos cocinados (mantenidos algunas horas entre 15 y 50°C). Las formas vegetativas viables disminuyen durante el almacenamiento en refrigeración y se destruyen durante el cocinado.

- ***Listeria monocytogenes***. Las listerias de las canales del cerdo proceden en particular de su contaminación durante el escaldado y durante su paso por las cámaras de refrigeración (Gobat y Jemmi, 1991). Esta y otras especies de *Listeria* pueden contaminar las canales a partir de la piel, pelos y heces del ganado vacuno y del lanar y a partir de las superficies de las salas de matanza y del área de carnización (Lowry y Tiong, 1988; Gobat y Jemmi, 1991). Después las canales pueden sufrir contaminaciones hasta su transporte a lugares de venta. Incluso con buenas condiciones de almacenamiento ($\leq 5^{\circ}\text{C}$) puede haber un cierto crecimiento de dicha bacteria. En el proceso de cocinado de la carne este microorganismo desaparece.
- ***Staphylococcus aureus***. Las temperaturas menores de 7°C , durante la refrigeración, el almacenamiento y el transporte, evitan el crecimiento. En la carne cruda, incluso a altas temperaturas, *S. aureus* es un mal competidor y es sobrepasado en su crecimiento por otros miembros de la microbiota. Los bajos recuentos de *S. aureus* en las canales porcinas (Takacs y Szita, 1984) son una mezcla de supervivientes de la flora original de la piel de los cerdos y de los contaminantes adquiridos durante el sacrificio (Rasch et al., 1978). Para producir enterotoxina suficiente para originar la intoxicación alimentaria tiene que alcanzar unos recuentos de, al menos, $10^6/\text{g}$. Además, las cepas de *S. aureus* de origen animal producen más difícilmente enterotoxinas (por ej., enterotoxina a) que las de procedencia humana (Devrise, 1990).

Parásitos:

- ***Sarcocystis hominis* y *Sarcocystis suihominis*.** Las personas se infestan con *Sarcocystis suihominis* al comer los quistes de la carne de cerdo cruda y con *Sarcocystis hominis* al ingerir quistes viables de la musculatura cruda bovina. Se aprecian los siguientes síntomas: náuseas, dolor gástrico y diarrea. La cocción y la congelación de la carne destruye los quistes. El ganado vacuno y el porcino se infestan al ingerir los esporofitos que expulsan las personas infectadas.
- ***Taenia saginata*.** El ganado vacuno se infecta a partir de los huevos que expulsan con las heces. Una vez ingerida la forma larvaria cisticerdo, enquistado en la musculatura de los bóvidos, se desarrolla en el yeyuno humano la tenia de los bóvidos (*Saginata* o *inermis*). La congelación a -10°C durante 10 días, o a -15°C durante 6 días, destruye los cisticercos de la musculatura bovina.
- ***Taenia solium*.** La larva adulta se desarrolla en el íleon humano y los huevos eliminados con las heces infestan a los cerdos. Las personas se infestan al ingerir cisticercos viables enquistados, en el hígado, cerebro y músculo esquelético o miocárdico de los cerdos y además también pueden infectarse si ingieren accidentalmente los huevos que hay en las heces de los individuos parasitados con la tenia. La cisticercosis es una de las enfermedades parasitarias más comunes del sistema nervioso central. La congelación a -10°C durante 10 días, al menos, y la cocción inactivan los cisticercos de la carne.
- ***Toxoplasma gondii*.** Los niños nacidos de madres infectadas pueden morir y sufrir ceguera o lesiones cerebrales. Las toxoplasmosis de ovejas, cabras y cerdos dan lugar a desórdenes de la reproducción. La mayoría de las infecciones humanas por *Toxoplasma gondii* son asintomáticas. Sin embargo, pueden tener graves consecuencias cuando se destruyen las células del hospedador al multiplicarse el protozoo, (por ej., miocarditis, hepatitis,

encefalitis). Las personas se infectan con los oocistos de las heces de los gatos o con la ingestión de quistes viables de la carne de los cerdos, ovejas, cabras y vacas. Para destruir los quistes la carne debe cocinarse, al menos, a 60 °C o congelarse a -15°C durante 3 días o a -20°C dos días.

- ***Trichinella spiralis***. En los cerdos las larvas se encuentran en la musculatura estriada, pero donde más abundan es en el diafragma, lengua, músculos maseteros y musculatura cervical. La triquinelosis se adquiere al ingerir las larvas enquistadas en la musculatura del cerdo o de los animales salvajes. Las larvas se destruyen cocinando la carne, al menos, a 58°C o congelándola (por ej., a -15°C durante 30 días).

1.5. Tipos de microorganismos

- Beneficiosos
 - o Starters (Chacinados secos)
- No deseables
 - o Alterantes
 - Bacterias lácticas
 - Levaduras y mohos
 - Enterobacterias
 - *Pseudomonas*
 - o Patógenos
 - *Salmonella*
 - *Escherichia coli*
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Listeria monocytogenes*
 - *Clostridium botulinum*
 - *Bacillus cereus*
 - *Campylobacter*
 - *Yersinia*

1.6. Infecciones endógenas

- Ántrax causada por *Bacillus anthracis*, se contrae por contacto con pieles y pelo
- Tuberculosis bovina por *Mycobacterium tuberculosis* por tomar leche cruda
- Brucelosis por *Brucella sp.*
- Aftosa por un virus
- Triquinosis causada por *Trichinella spiralis* al comer carne de cerdo cruda

1.7. Fuente de Contaminación

- Tipo de cría (A campo vs Feed- lot)
- Transporte (hacinamiento), Fatiga del animal (favorece invasión de microorganismos del intestino a la sangre)
- Planta de faena (la retirada del cuero, de las vísceras, etc)
- Agua de lavado
- Operarios (Portadores no sintomáticos)
- Equipos y utensilios (en forma de Biofilms). Son agregados de bacterias, polisacáridos extracelulares, materia orgánica que se adhiere y crecen en las superficies de equipos, cámaras, desagües, etc.
- Ambiente (Uso de BPM, HACCP, SSOPS)
- Almacenamiento y transporte (Mesófilos y psicrófilos) (cadena de frío)
- Lugares de venta y hogares

1.8. Carnes crudas picadas

El picado aumenta la temperatura de la carne, esto depende del proceso de picado y no sólo puede aumentar la velocidad de crecimiento de los psicrotrofos, sino también permitir el desarrollo de mesófilos como *E. coli* y *Salmonella*. Por lo tanto, la temperatura de la carne se debe controlar, antes y después del picado. Si el equipo no está suficientemente limpio antes del empleo, la picadora puede ser una fuente significativa de contaminación del producto con microorganismos, incluidos los patógenos potenciales.

En general los productos de carne cruda picada tienen una vida útil corta. La putrefacción se debe a las *psedomonas* y se limita generalmente a las regiones próximas a la superficie de la masa de la carne picada y de los embutidos con poca sal.

En el interior de los productos picados la alteración se debe principalmente a las bacterias Gram positivas (*B. thermosphacta* y bacterias lácticas). En las carnes crudas picadas del comercio al detalle se encuentran a menudo microorganismos de interés en salud pública.

Se han señalado recuentos de *Cl. perfringens* de 47-81% en muestras de carnes picadas y de embutidos frescos (Ali y Fung, 1991). La incidencia de *L. monocytogenes* en muestras de carne picada, pasteles y embutidos varía del 10 al 92% según indican algunas publicaciones (Johnson et al., 1990; Farber y Peterkin, 1991). Se han encontrado serotipos patógenos de *Y. enterocolitica* hasta en el 30% de las muestras de carne de cerdo picada del comercio al detalle (Andersen et al., 1991) y en algunas de carne picada de vaca.

En la carne picada, en la carne de embutidos y en los embutidos crudos se han encontrado salmonelas en pequeño número. Su incidencia varía mucho, entre el 1% aproximadamente y el 30% de las muestras (Roberts et al., 1975. En un estudio estadounidense de la carne picada producida en sus mataderos se detectó salmonella en el 3,4% de las muestras de 25 g y en el 5,4% de las de 100 g, de un total de 1.370 muestras congeladas examinadas (Hogue et al., 1993). Se han producido brotes de salmonelosis al consumir hamburguesas poco hechas y al comer carne cruda picada.

1.9. Productos cárnicos cocidos

Se comercializan numerosas variedades en nuestro caso hemos usado chóped y mortadela.

Los productos sin hueso se elaboran inyectando en primer lugar carne, volteando o amasando para extraer las proteínas solubles, embutiendo en el molde adecuado tripa, malla o película de envasado de barrera plástica y a continuación cocinándolos. Algunos productos también se cortan en rodajas y se envasan.

Posteriormente estos productos pueden congelarse o refrigerarse para su distribución y venta.

El proceso de cocción debe ser adecuado para asegurar la destrucción de patógenos entéricos. Los procesos térmicos son suficientes para garantizar la destrucción de niveles de *Salmonella*, *C. jejuni*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*.

Dependiendo del proceso térmico aplicado las bacterias vegetativas y, quizás algunos esporos de la superficie de los productos se destruyen durante el cocinado, si bien algunos del interior puede sobrevivir (por ejemplo, enterococos, *Lactobacillus viridescens*). El proceso térmico aplicado a estos productos no es adecuado para asegurar la destrucción de los patógenos formadores de esporas (*Cl. perfringens*, *Cl. botulinum*). También los productos cocidos se someten a una contaminación post-procesado durante las operaciones de cortado y envasado.

1.10. Productos cárnicos secos

Los embutidos secos no suelen ser ahumados ni procesados con calor y son ingeridos sin cocción. Los cultivos starter son principalmente los lactobacilos y pediococos. Durante la producción de embutidos fermentados, el tejido grado y el magro picado se mezclan con sal, especias, agua, agentes del curado y cultivos starter y se introducen en las tripas. Los embutidos secos, los nitratos sustituyen los nitritos y tienen menor temperatura de fermentación. Esta mezcla aporta la glucosa que sirve como sustrato para las bacterias del ácido láctico.

En otras ocasiones puede haber crecimiento en la superficie de mohos y levaduras tolerantes a la sal, entre otros. La flora puede ser reforzada por starter de *Penicillium nalgiovense* o *Penicillium sehrysoenum*.

En el caso de los productos ahumados, se elimina la microflora superficial. Los mohos superficiales colaboran en el proceso de secado, atrapando el oxígeno.

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este experimento son:

- Realizar el análisis microbiológico de distintos alimentos cárnicos como son: choped, chorizo, mortadela, salchichón y carne picada, comprados en el mismo establecimiento en tres fechas diferentes.
- Demostrar la existencia de microorganismos, en mayor o menor cantidad, que presentan estos productos.
- Valorar los resultados obtenidos, en los diferentes alimentos a lo largo de las tres tomas de muestra

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Este experimento tiene como objetivo el análisis microbiológico de alimentos cárnicos. Se realiza el experimento con 5 alimentos: Chóped, Chorizo, Mortadela, Salchichón y Carne picada. Los diferentes alimentos cárnicos permanecerán en refrigeración a temperatura comprendida entre 0 y 5 °C, hasta el comienzo del análisis. Este deberá iniciarse lo más pronto posible una vez recibido en el laboratorio y nunca más 24 horas después del muestreo, para realizar el análisis microbiológico de cada uno de ellos se han utilizado 5 medios de cultivo: Mac Conkey Agar, MRS, Vogel Johnson Agar (VJ Agar), KAA Agar y Tríptico soy Agar (TSA).

3. 1. Material necesario:

- Medios Selectivos (MacConkey Agar, MRS, Vogel Johnson Agar (VJ Agar), KAA Agar)
- Medio Tryptic soy Agar (TSA)
- Placas petri
- Eppendorf
- Solución Salina
- Agua destilada
- Matrices
- Varilla de vidrio (para agitar)
- Mechero
- Triturador de paletas o Stomacher
- Autoclave
- Estufa
- Pipetas
- Portas de vidrio
- Cristal violeta
- Safranina

- Lugol
- Alcohol
- Aceite de inversión
- 15 productos cárnicos
- Asa de siembra
- Bolsas para introducir los alimentos, y que sean resistentes al Stomacher
- Balanza
- Puntas para las pipetas
- Guantes

3. 2. Medios de cultivo utilizados

- **Mac Conkey Agar:**

Es un medio de cultivo selectivo, es específico para cepas que fermenten la lactosa y para bacterias gram negativas. Sirve como indicador de pH, distingue entre bacterias gram negativas que pueden fermentar la lactosa (Lac+) y las que no pueden (Lac-).

Lactosa positiva: utilizan la lactosa como medio, es el caso de *Escherichia coli*, *Enterobacter* y *Klebsiella*, estas producen bajada del pH a 6,8 y como consecuencia aparecen colonias de color rosadas o rojas.

Lactosa negativas: no fermentan la lactosa como es el caso de *Salmonella*, *Proteus* y *Shigella* en lugar de lactosa utilizan peptona, formando amoníaco, lo que produce una subida de pH del agar, las colonias resultantes son incoloras o blancas.

Existen otras bacterias conocidas como "Slow", son bacterias que fermentan la lactosa de manera lenta como por ejemplo *Serratia* y *Citrobacter*.

La composición del medio Mac Conkey Agar en g/l es la siguiente:

- Peptones20.000
- Lactose10.000
- Bile salt 1.500
- Sodium chloride5.000
- Neutral red 0.030

- Crytal violet.....0.001
- Agar.....15.000

pH final 7,2 ± 0,2 at 25°C

- **MRS:**

Para el aislamiento, cultivo y enumeración de *Lactobacillus* y otras bacterias ácido lácticas de alimentos y otros materiales.

La composición del medio MRS en g/l es la siguiente:

- Peptona proteose.....10.00
- Meat extract.....8.00
- Yeast extract.....4.00
- D (+) – Glucose.....20.00
- Sodium acetate.....5.00
- Triammonium citrate.....5.00
- Triammonium citrate.....2.00
- Magnesium sulfate.....0.20
- Manganese sulfate.....0.05
- Dipotassium phosphate..2.00
- Polysobate80.....1.00
- Agar.....14.00

Final pH 6,2 ± at 25°C

- **Vogel Johnson Agar (VJ Agar):**

Es un medio selectivo utilizado para la detección de estafilococos coagulasa positivos fermentadores de manitol, a partir de alimentos y otros materiales de importancia sanitaria y clínica.

La composición del medio Vogel Johnson Agar (VJ Agar) en g/l es la siguiente:

- Case un peptone.....10.000
- Yeast extract.....5.000
- Manitol.....10.000
- Dipotassium phosphatate.....5.000
- Litium chloride.....5.000
- Glycine.....10.000

- Phenol red.....0.025
- Agar.....15.000

Final pH 7,2 ± 0,2 at 25°C

- **KAA Agar:**

Es un caldo de enriquecimiento para *Streptococcus* D de Lancefield. En ese medio de cultivo el sulfato de Canamicina y la Azida sódica inhiben el crecimiento de la flora acompañante, mientras que los *Streptococcus* crecen sin restricción. A su vez los *Streptococcus* hidrolizan la Esculina produciendo glucosa y esculetina la cuál reacciona con el NH₄⁺ que lleva el medio y Fe³⁺ para dar un complejo verde negruzco.

La composición del medio KAA agar en g/l es la siguiente:

- Tryptone.....20.00
- Yeast extract.....5.00
- Sodium chloride.....5.00
- Disodium citrate.....1.00
- Esculin.....1.00
- Ferric- ammonium citrate.....0.05
- Sodium azide.....0.15
- Kanamycin sulfate.....0.02
- Agar.....10.00

Final pH 7,0 ± 0,2 at 25°C

- **Tryptic soy Agar (TSA):**

Es un medio de uso general que permite el crecimiento tanto de microorganismos exigentes como no exigentes, que incluyen bacteria aerobias y anaerobias. También es capaz este medio de visualizar reacciones hemolíticas que producen muchas especies bacterianas.

Tiene fuente proteica con una pequeña cantidad de hidratos de carbono naturales, cloruro sódico y 5% de sangre.

Este medio se recomienda para detectar y hacer el recuento de una amplia gama de microorganismos como pueden ser: *Streptococos*, *Pneumococos*, *Brucella*, *Corinebacterias*, *Erysipelothrix* y *Pasteurella*

La composición del medio Tryptic soy agar (TSA) en g/l es la siguiente:

- Case in peptone.....15.0
- Soy peptone.....5.0
- Sodium chloride.....5.0
- Agar.....15.0

Final pH 7,3 ± 0,2 at 25°C

3. 3. Preparación del material

El experimento se realiza en tres semanas, al principio de cada semana se preparan los medios necesarios, y se compran las muestras en el mismo establecimiento elegido al azar en las tres semanas. El material utilizado para una semana de trabajo es el siguiente:

- TSA: Sembramos 5 diluciones de cada alimento, por duplicado y son 5 alimentos, 50 placas, con un matraz de 1l se preparan 800 ml para las 50 placas.
- 4 medios selectivos (MRSA, Mc Conkey, KAA, Vogel- Johnson): sembramos dos placas de cada uno (0 y 1) por duplicado y 5 alimentos, 20 placas.
- Solución salina: Matraces pequeños con 45 ml de solución salina al 0,9 %. 1 por cada alimento, con un total de 5.

- Tubos con 0,9 ml de solución salina al 0,9 %: se realizan 5 diluciones de cada alimento (de la 1 hasta la 5) sembrando a razón de 100 microlitros en cada placa

Una vez realizado todos los cálculos y teniendo claro los gramos de cada medio por mililitro de agua destilada necesarios para preparar todas las placas, se añade el medio a un matraz y se le añade el agua necesaria para posteriormente autoclavarlo en el autoclave.

Cuando el medio está atemperado se preparan las placas y se dejan enfriar para su posterior utilización

Para preparar el medio, tenemos que coger placas petri, con riguroso cuidado y al lado del mechero para evitar contaminación, se coge el matraz y se echa un poco del líquido de su interior a la placa petri, (como unos 10 ml por placas) cerramos la tapa de esta y movemos con suavidad para evitar que el líquido no quede homogéneamente en la placa y queden espacios sin medio, repetimos este proceso hasta que se acabe el medio que hay dentro del matraz,

Este proceso debe hacerse con rapidez para evitar que los medios se solidifique. Una vez que estén todas las placas preparadas y los medios estén solidificados, se guardan cada una de las placas en una bolsa, las marcaríamos para evitar posibles errores y posteriormente las dejaríamos en la cámara frigorífica, junto con el agua destilada para evitar posibles contaminaciones.

3. 4. Tratamiento de las muestras y recuento

Al día siguiente una vez ya estén todos los medios preparados procederíamos a la siembra de los alimentos cárnicos. Tenemos 5 muestras de productos cárnicos (Chóped, Chorizo, Mortadela, Salchichón y Carne picada)

Se cogen 5 bolsas pequeñas y se nombran con una letra y un número para el chóped será la C1, para el chorizo el C2, para la mortadela C3, salchichón C4 y carne picada C5.

Se pesan 5 gramos de cada producto y se echa cada uno en su bolsita correspondiente previamente marcada, después a cada bolsita se le añaden 45 ml de solución salina. Se introduce en un triturador de paletas o Stomacher.

Posteriormente se rotulan los eppendorf con 0.9ml de solución salina, 5 para cada producto marcados con (C1₀,C1₁,C1₂,C1₃,C1₄, C2₀,C2₁,C2₂,C2₃,C2₄...). Una vez marcados los 5 de cada producto se realizan diluciones seriadas a partir de la bolsa del alimento correspondiente. Debemos tener un control riguroso con las puntas para que no se produzca contaminación y nos pueda llevar a un error, por lo que en cada paso, se cambia la punta.

El medio de TSA va a ser el único en el que se siembran las 5 diluciones ya que es un medio genérico en el que crecen la mayoría de los microorganismos, del resto de los medios se sembrarán 2 diluciones ya que son medios selectivos. Todas las siembras se realizan por duplicado para evitar posibles errores en la siembra.

Una vez esté todo sembrado, introducimos todas nuestras placas previamente señaladas a la estufa a 37°C. Al día siguiente, procedemos al recuento de las colonias que han crecido en 24 horas, una vez contadas, volvemos a introducirlas en la estufa, y pasadas las 48 horas volveremos a realizar el recuento para ver si se ha producido mayor número de colonias. Este proceso se repite durante las tres semanas, sin saltarse ni un solo de los pasos previamente explicados.

Una vez que hemos contado el número de colonias a las 48 horas, procedemos a la extracción de una colonia de cada placa, en cada uno de los medios y en cada uno de los alimentos, incluyendo también las repeticiones. En el caso de las placas de TSA, solo las utilizaremos en caso de que en las otras 4, que son medios selectivos, no haya crecido ningún tipo de microorganismo, en el caso de que si, la dejaremos apartada para utilizarla en el caso que fuera necesario. Si en las placas observamos que existen colonias con morfologías diferentes debemos coger una muestra de cada colonia para realizar la tinción y ver la morfología bacteriana

Junto al mechero para evitar posible contaminación, se pica una colonia procedemos a hacer una tinción de gram para ver la morfología bacteriana.

3. 5.Tinción de Gram:

- Echamos en el porta una gota de agua, con el asa de siembra cogemos la colonia a analizar y la mezclamos con la gota de agua
- Fijar dicha gota en el mechero
- Cristal violeta 2 minutos
- Lugol 2 minutos
- 30 segundos con alcohol
- Lavamos rápidamente
- Safranina 2 minutos
- Lavado con agua
- Echamos una gota de aceite de inversión y ya podemos visualizar nuestra bacteria en el microscopio.

3. 6. Prueba de la catalasa:

En un porta se añade una gota de agua oxigenada, en la que se va a extender la colonia elegida, si la bacteria es catalasa positiva va a poseer la enzima catalasa que va a degradar el agua oxigenada en agua más oxígeno con lo cual aparecen burbujas en la muestra. Si la bacteria es catalasa negativa al no poseer la enzima no se observarán burbujas en la muestra.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizados todos los experimentos los resultados observados se muestran en las siguientes tablas y figuras, indicando en UFC las unidades formadoras de colonias por ml o gramo de alimento.

- **TSA:**

Si nos fijamos en el medio general TSA tabla 2, los recuentos son muy similares en las tres tomas de muestra, estando entre 10^3 y 10^5 , al ser un medio general, el crecimiento microbiano es normal, solo destaca la carne picada en la primera toma de muestra donde llega a alcanzar 10^7 UFC/g lo que puede indicar la mala manipulación de la carne.

TSA	UFC/g alimento	UFC/g alimento	UFC/g alimento
	Primer recuento	Segundo recuento	Tercer recuento
Chóped	$6,4 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^4$
Chorizo	$6 \cdot 10^3$	$6,5 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^5$
Mortadela	$1,67 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^3$
Salchichón	$2,75 \cdot 10^4$	$7,1 \cdot 10^5$	$8,9 \cdot 10^5$
Carne picada	$3 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$

Tabla 2: Recuento de colonias en los tres muestreos. Medio de cultivo TSA.

Si nos fijamos en la figura 1 al comparar los recuentos obtenidos en las tres diferentes tomas de muestras, en el caso del chóped y salchichón entre las tres muestras hay diferencia de una unidad logarítmica, en el caso del chorizo y mortadela de dos y en la carne picada es en la que más diferencia se aprecia de 4 en el tercer recuento a más de 7 en el primero.

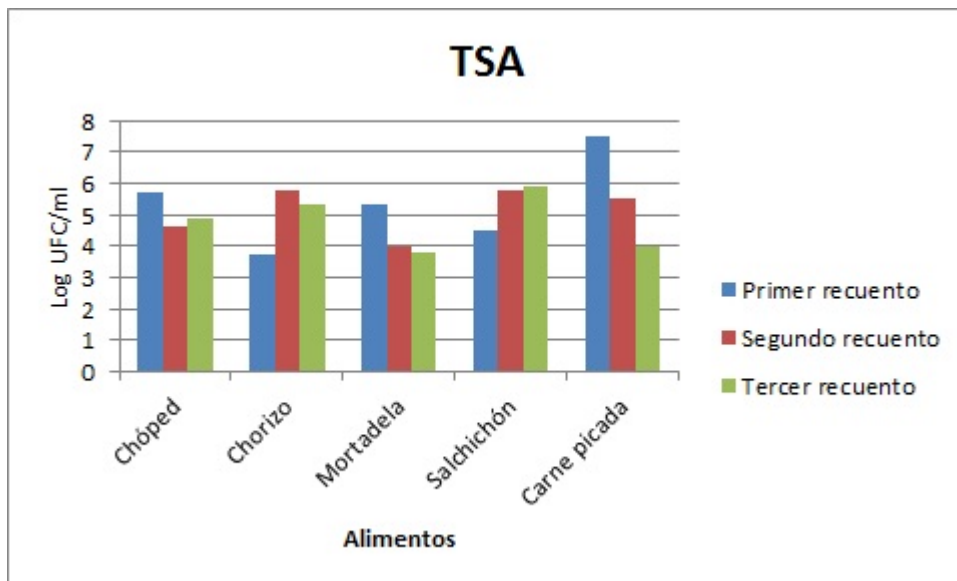


Figura 1: Resultado gráfico del número de colonias en los tres recuentos. Placa TSA.

- **MRS:**

En cuanto a los resultados obtenidos en el medio de cultivo MRS, medio para identificación de bacterias lácticas que tienen en común la capacidad de producir ácido láctico por fermentación de azúcares, como se puede observar en las tablas 2, 3 y 4, los recuentos son menores que los obtenidos anteriormente. Las bacterias lácticas forman parte de la fermentación de los alimentos, y aunque se las conoce sobre todo por su labor de fermentación de productos lácteos, se emplean asimismo para encurtir vegetales, en la panificación del vino, y para curar pescado, carne y embutidos (muestras estudiadas en este trabajo).

Como se observa en los resultados de la tinción de Gram, son un grupo de bacterias Gram + y todas catalasa negativas.

MRS	Primer recuento		
	UFC/g alimento	Tinción	Catalasa
Chóped	$8,8 \cdot 10^3$	Cocos Gram+	Negativa
Chorizo	$7,8 \cdot 10^3$	Cocos Gram+	Negativa
Mortadela	$1,2 \cdot 10^4$	Cocos Gram+	Negativa
Salchichón	$5 \cdot 10^1$	Cocos Gram+	Negativa
Carne picada	$3 \cdot 10^4$	Cocos Gram+	Negativa

Tabla 1: Primer recuento, número de unidades formadoras de colonias, tinción y catalasa.
Placa MRS

MRS	Segundo recuento		
	UFC/g alimento	Tinción	Catalasa
Chóped	$1,0 \cdot 10^2$	Bacilo Gram+	Negativa
Chorizo	$3 \cdot 10^2$	Bacilo Gram+	Negativa
Mortadela	$1,5 \cdot 10^4$	Bacilo Gram+	Negativa
Salchichón	$3 \cdot 10^2$	Bacilo Gram+	Negativa
Carne picada	$9,5 \cdot 10^3$	Bacilo Gram+	Negativa

Tabla 2: Segundo recuento, número de unidades formadoras de colonias, tinción y catalasa.
Placa MRS

MRS	Tercer recuento		
	UFC/g alimento	Tinción	Catalasa
Chóped	$3 \cdot 10^3$	Bacilo Gram+	Negativa
Chorizo	$1,8 \cdot 10^4$	Bacilo Gram+	Negativa
Mortadela	$1,3 \cdot 10^4$	Bacilo Gram+	Negativa
Salchichón	$1,7 \cdot 10^4$	Bacilo Gram+	Negativa
Carne picada	$3 \cdot 10^4$	Bacilo Gram+	Negativa

Tabla 3: Tercer recuento, número de unidades formadoras de colonias, tinción y catalasa.
Placa MRS

Al relacionar los tres recuentos la diferencia es de dos logaritmos, siendo más destacada en el caso del salchichón y manteniéndose muy similar en el caso de la carne picada. (Figura 2).

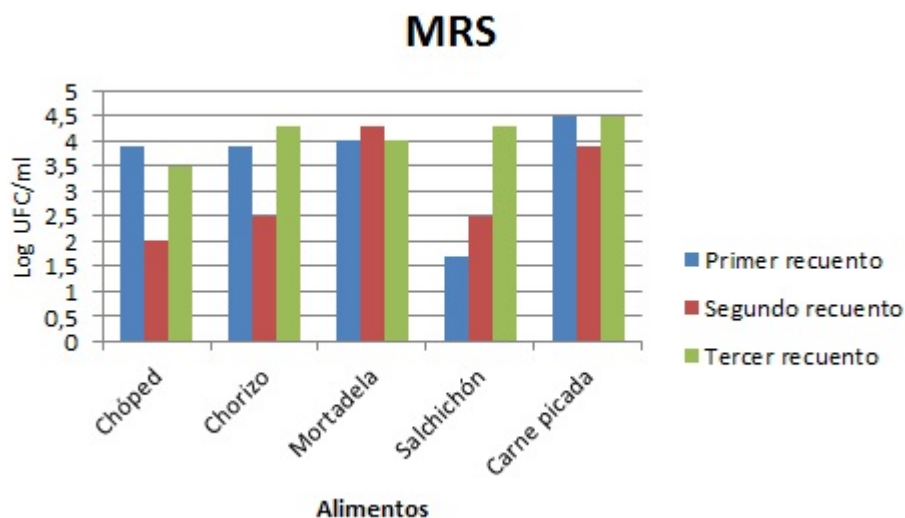


Figura 2: Resultado gráfico del número de colonias en los tres recuentos. Placa MRS.

- **KAA:**

En el medio de cultivo KAA se identifican los enterococos, los enterococos en los alimentos juegan un papel importante en los procesos de fermentación y maduración, y pueden contribuir al sabor de algunos alimentos. Los recuentos obtenidos son bajos en torno a 10^3 y todos son Gram positivos y catalasa negativos. (Tablas 5, 6 y 7). En la muestra del salchichón del primer recuento, se observaron levaduras, que al crecer invadieron la placa y no dejaron ver los enterococos.

KAA	Primer recuento		
	UFC/g alimento	Tinción	Catalasa
Chóped	8.10	Enterococo Gram +	Negativa
Chorizo	7.10 ²	Enterococo Gram +	Negativa
Mortadela	1.10 ¹	Enterococo Gram +	Negativa
Salchichón	6.10 ²	Levaduras	Negativa
Carne picada	3.10 ³	Enterococo Gram +	Negativa

Tabla 4: Primer recuento, número de unidades formadoras de colonias, tinción y catalasa. Placa KAA

KAA	Segundo recuento		
	UFC/g alimento	Tinción	Catalasa
Chóped	$1,7 \cdot 10^2$	Enterococo Gram +	Negativa
Chorizo	$5,3 \cdot 10^3$	Enterococo Gram +	Negativa
Mortadela	$8,9 \cdot 10^2$	Enterococo Gram +	Negativa
Salchichón	$6,6 \cdot 10^3$	Enterococo Gram +	Negativa
Carne picada	$1,6 \cdot 10^3$	Enterococo Gram +	Negativa

Tabla 5: Segundo recuento, número de unidades formadoras de colonias, tinción y catalasa.
Placa KAA

KAA	Tercer recuento		
	UFC/g alimento	Tinción	Catalasa
Chóped	$2,2 \cdot 10^3$	Enterococo Gram +	Negativa
Chorizo	$1,5 \cdot 10^3$	Enterococo Gram +	Negativa
Mortadela	$4,1 \cdot 10^3$	Enterococo Gram +	Negativa
Salchichón	$1 \cdot 10^4$	Enterococo Gram +	Negativa
Carne picada	$1,1 \cdot 10^4$	Enterococo Gram +	Negativa

Tabla 6: Tercer recuento, número de unidades formadoras de colonias, tinción y catalasa.
Placa KAA

Teniendo en cuenta los tres recuentos, (figura 3), en todos los alimentos son muy similares, variando una unidad logarítmica excepto en la mortadela donde el primer recuento es inferior al resto.

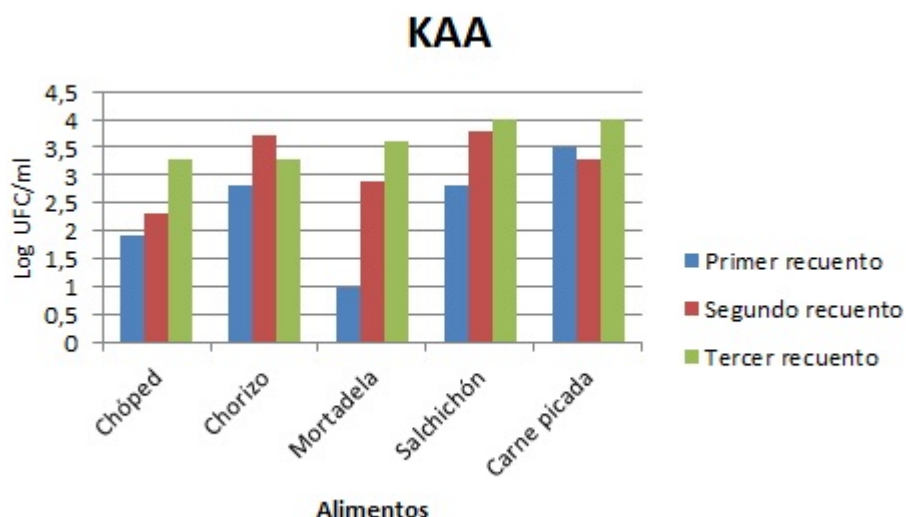


Figura 3: Resultado gráfico del número de colonias en los tres recuentos. Placa KAA

- **Vogel Johnson:**

En cuanto al medio selectivo Vogel-Johnson para la identificación de estafilococos, los bajos recuentos según Takacs y Szita, 1984 pueden ser una mezcla de supervivientes de la flora original de la piel de los cerdos y de los contaminantes adquiridos durante el sacrificio (Rasch et al., 1978). No siendo causantes de intoxicación alimentaria si no alcanzan unos recuentos de, al menos, 10^6 /g. En nuestro caso los recuentos son bajos y en algunos casos incluso cero, aunque en algunos casos no se observaron estafilococos pero si enterococos. (Tablas 8, 9, 10). Todos los estafilos aparecen en forma de cocos y son catalasa positivos.

Vogel Johnson	Primer recuento		
	UFC/g alimento	Tinción	Catalasa
Chóped	$3 \cdot 10^2$	Staphylococos Gram +	Positivo
Chorizo	0		
Mortadela	$1,6 \cdot 10^3$	Staphylococos Gram +	Positivo
Salchichón	0		
Carne picada	$3,9 \cdot 10^3$	Staphylococos Gram +	Positivo

Tabla 7: Primer recuento, número de unidades formadoras de colonias, tinción y catalasa. Placa Vogel Johnson

Vogel Johnson	Segundo recuento		
	UFC/g alimento	Tinción	Catalasa
Chóped	1.10^2	Staphylococos Gram +	Positivo
Chorizo	2.10^2	Enterococos Gram +	Negativo
Mortadela	4.10^2	Enterococos Gram +	Negativo
Salchichón	3.10^2	Enterococos Gram +	Negativo
Carne picada	$1,1.10^3$	Enterococos Gram +	Negativo

Tabla 8: Segundo recuento, número de unidades formadoras de colonias, tinción y catalasa.
Placa Vogel Johnson

Vogel Johnson	Tercer recuento		
	UFC/g alimento	Tinción	Catalasa
Chóped	$1,5.10^2$	Staphylococos Gram +	Positivo
Chorizo	9.10^2	Staphylococos Gram +	Positivo
Mortadela	$1,75.10^3$	Staphylococos Gram +	Positivo
Salchichón	$2,25.10^3$	Staphylococos Gram +	Positivo
Carne picada	$4,55.10^3$	Staphylococos Gram +	Positivo

Tabla 9: Tercer recuento, número de unidades formadoras de colonias, tinción y catalasa.
Placa Vogel Johnson

En los tres recuentos (figura 4), los resultados obtenidos varían según la semana del recuento, no apareciendo casi estafilos en las muestras de la primera semana y segunda, mientras que si aparecen en todos los alimentos del tercer recuento

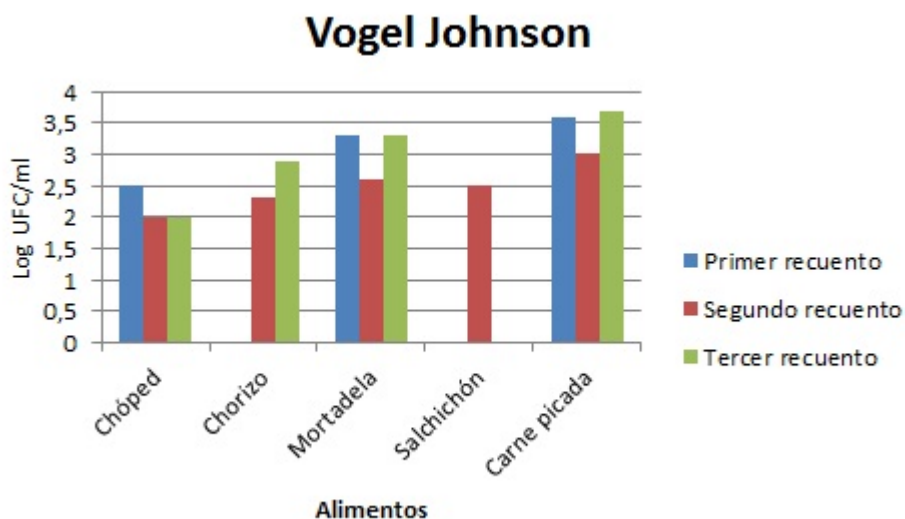


Figura 4: Resultado gráfico del número de colonias en los tres recuentos. Placa Vogel Johnson

- **Mc Conkey:**

En el medio Mc Conkey, medio selectivo para enterobacterias, los recuentos son bajos exceptuando la carne picada, puede ser debido a la manipulación o a las máquinas de picado. Son bacilos o cocobacilos Gram negativos y en algunos casos catalasa negativa, lo que indicaría que no son enterobacterias como tales. (Tablas 11, 12 y 13).

McConkey	Primer recuento		
	UFC/g alimento	Tinción	Catalasa
Chóped	$3 \cdot 10^2$	Bacilo Gram -	Positiva
Chorizo	1.10	Bacilo Gram -	Positiva
Mortadela	$8,2 \cdot 10^3$	Bacilo Gram -	Positiva
Salchichón	$4,5 \cdot 10^2$	Bacilo Gram -	Negativa
Carne picada	$3 \cdot 10^3$	Bacilo Gram -	Positiva

Tabla 10: Primer recuento, número de unidades formadoras de colonias, tinción y catalasa. Placa McConkey

McConkey	Segundo recuento		
	UFC/g alimento	Tinción	Catalasa
Chóped	$4,5 \cdot 10^3$	Bacilo Gram -	Positiva
Chorizo	0		
Mortadela	$1 \cdot 10^2$	Bacilo Gram -	Negativa
Salchichón	0		
Carne picada	$1,12 \cdot 10^4$	Bacilo Gram -	Positiva

Tabla 11: Segundo recuento, número de unidades formadoras de colonias, tinción y catalasa. Placa McConkey

McConkey	Tercer recuento		
	UFC/g alimento	Tinción	Catalasa
Chóped	$5,6 \cdot 10^3$	Bacilo Gram -	Positiva
Chorizo	$3 \cdot 10^2$	Bacilo Gram -	Positiva
Mortadela	$1 \cdot 10^2$	Bacilo Gram -	Positiva
Salchichón	$6 \cdot 10^2$	Bacilo Gram -	Positiva
Carne picada	$2,2 \cdot 10^4$	Bacilo Gram -	Positiva

Tabla 12: Tercer recuento, número de unidades formadoras de colonias, tinción y catalasa. Placa McConkey

En general como hemos destacado anteriormente destaca la carne picada, con recuentos mayores en los tres casos.

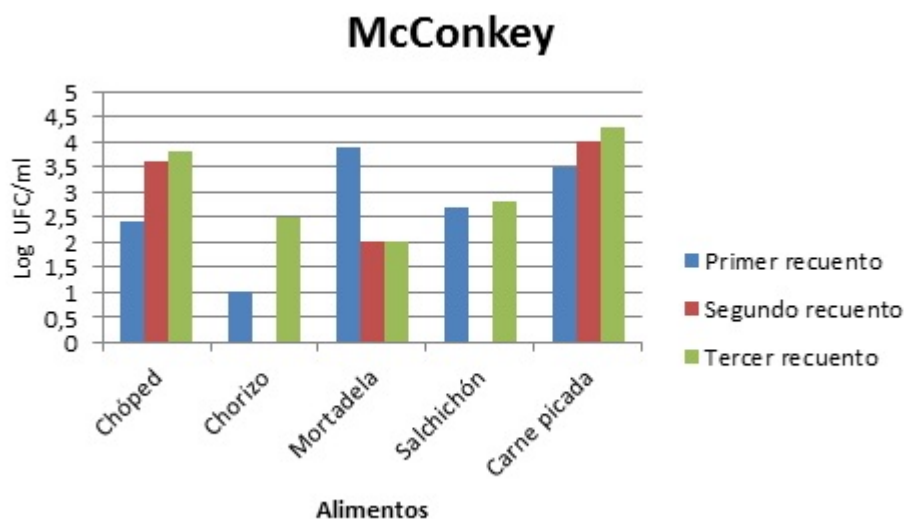


Figura 5: Resultado gráfico del número de colonias en los tres recuentos. Placa McConkey

En los tres recuentos (figura 5), los resultados obtenidos muestran que los datos del chóped y carne picada son muy similares, en la mortadela se aprecia algo de diferencia en el primer recuento, mientras que en el chorizo y salchichón los resultados obtenidos en el segundo recuento son de 0.

5. CONCLUSIONES

Como conclusiones a los recuentos microbiológicos realizados a diferentes alimentos cárnicos podemos decir que:

- 1- Los recuentos totales obtenidos para los diferentes alimentos son normales teniendo en cuenta el grupo de alimentos al que pertenecen.
- 2- Al ser alimentos pertenecientes al grupo de los embutidos, exceptuando la carne picada, los recuentos obtenidos en los medios MRS y KAA son correctos al participar estos en la fermentación.
- 3- Los recuentos de enterobacterias y estafilococos son bajos como cabría esperar en este grupo de alimentos.
- 4- De todos los alimentos ensayados destaca la carne picada, que al ser un alimento crudo, posee una mayor carga microbiana, debido a que no está tratado y a su mayor superficie de contacto. Aunque los recuentos son mayores, no pensamos que sean indicios de contaminación, al tener que cocinarla para su consumo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, J.K., Sorensen, R. and Glensbjerg, M. (1991) Aspects of the epidemiology of *Yersinia enterocolitica*: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 13, 231-8.
- Biemuller, G.W., Carpenter, J.A. and Reynolds, A.E. (1973) Reduction of bacteria on pork carcasses. *Journal of Food Science*, 38, 261-3.
- Campbell-Platt, C.H. and Cook, P.E. (1994) *Fermented Meats*. London: Blackie.
- Christensen, S.G. (1987) The *Yersinia enterocolitica* situation in Denmark. *Control of Microbiology and Immunology*, 9, 93-7.
- Dainty, R.H. and Mackey, B.M. (1992) The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill- stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 73, 103S-14S.
- de Boer, E. and Nouws, J.F.M. (1991) Slaughter pigs and pork as a source of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 375-8.
- Devrise, L.A. (1990) Staphylococci in healthy and diseased animals, in *The Society for Applied Bacteriology Symposium Series, No. 19*. (eds. R.G. Board and M.Sussman), Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, pp. 71s-80s.
- Doyle, M.P. (1991) *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 289-302.
- Fukushima, H., Maruyama, K., Omori, I., Ito, K. and Iorihara, M. (1991) Contamination of pigs with *Yersinia* at the slaughter- house. *Fleischwirtschaft International*, 1, 50-2.
- Gill, C.O. and Newron, K.G. (1989) Growth of bacteria on meat at room temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 49, 315-23.
- Gobat, P.- F. and Jemmi, T. (1991) Epidemiological studies on *Listeria* spp. In slaughterhouses. *Fleischwirtschaft International*, (1), 44-9.

- Grau, F.H. and Smith, M.G, (1974) Salmonella contamination of sheep and mutton carcasses related to pre-slaughter holding conditions. *Journal of Applied Bacteriology*, 37, 111-16.
- Griffin, P.M. and Tauxe, R.V. (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enteropathogenic *E.coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome, *Epidemiologic Reviews*, 13, 60-98.
- Lowry, P.D. and Tiong, I. (1988) The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat and meat products: factors affecting distribution. *Proceeding 34th International Congress of Meat Science and Technology*, Brisbane, Australia, Part B, pp. 528-30.
- Lücke, F.-K. and Roberts, T.A. (1993) Control in meat and meat products, in *Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods* (eds. A.H.W. Hauschild and K.L. Dodds), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 177-207.
- Lücke, F.-K. (2003) Fermented meat products. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (eds B. Caballero, L.C. Trugo and P.M. Fingas), pp. 2338-2344- Oxford: Academic Press.
- Mafu, A.A., Higgins, R., Nadeau, M. and Coustineau, G. (1989) The incidence of *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Yersinia enterocolitica* in swine carcasses and the slaughterhouse environment. *Journal of Food Protection*, 52, 642-5.
- Nesbakken, T. (1988) Enumeration of *Yersinia enterocolitica* 0:3 from the porcine oral cavity, and its occurrence on cut surfaces of pig carcasses and the environment in a slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*, 6, 287-93.
- Oosterom, J. and Notermans, S. (1983) Further research into the possibility of salmonella-free fattening and slaughter of pigs. *Journal of Hygiene* (Cambridge), 91, 59-69.
- Pascual, M^a R., Calderon, V. (2000) Microbiología alimentaria, metodología analítica para alimentos y bebidas. 2^a ed. Madrid: Díaz de Santos.
- Rao, D.N. and Sreenivasamurthy, V. (1985) A note on the microbial spoilage of sheep meat at ambient temperature. *Journal of Applied Bacteriology*, 58, 457-60.

- Rasch, B., Lie, O. and Yndestad, M. (1978) The bacterial flora on pork skin and the influence of various singeing methods on this flora. *Nord. Vet. Med.*- 30, 274-81.
- Roberts, T.A., Bryan F.L., Christian, B.H.J., Kilsby, D., Olson, J.C., Silliker, J.H. (1999) Microorganismos de los alimentos 2, métodos de muestreo para análisis microbiológicos: principios y aplicaciones específicas. 2ª ed. Zaragoza: Acribia, S.A.
- Schiemann, D.A. (1989) *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*, in *Foodborne Bacterial Pathogens* (ed. M.P. Doyle), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 601-72.
- Smith, H.W. (1961) The development of the bacterial flora of the faeces of animals and man: the changes that occur during ageing. *Journal of Applied Bacteriology*, 24, 235-41.
- Takacs, I. and Szira, G. (1984) Studies on the technology- hygiene of pig slaughtering. *Acta Alimentaria*, 13, 272.
- Teufel, O. (1982) *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* –excretion rates in the pig and survival in tap water and minced meat. *Fleischwirtschaft*, 62, 1344-5.
- Tompkin, R.B. (1980) Botulism from meat and poultry products- A historical perspective. *Food Technology*, 34, 228-36, 257.
- Varnam, A.H. and Sutherland, J.P. (1995) *Meat and Meat Products*. London: Chapman and Hall.

Páginas web consultadas:

- <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/vogeljohnagar.htm>
- <http://www.laanunciataikerketa.com/trabajos/fregasuelos/medios.pdf>
- <http://infoleg.mecon.gov.ar/infolegInternet/anexos/20000-24999/24788/dn4238-1968cap16.htm>
- <http://www.fagro.edu.uy/~alimentos/cursos/carne/Unidad%206/MICROBIOLOGIA.pdf>