



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Biología

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de productos cárnicos

Alumno: Iván Torres Palomo

Junio, 2019



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Biología

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de productos cárnicos

Alumno: Iván Torres Palomo

Una firma manuscrita en tinta azul que incluye el nombre "IVAN" en mayúsculas, con trazos fluidos y entrelazados que se extienden a la izquierda y a la derecha.

Junio, 2019

ÍNDICE.

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Tipos de carne	3
1.2 Derivados cárnicos.....	3
1.2.1 <i>Tratados por calor</i>	3
1.2.2 <i>No tratados por calor</i>	4
1.3 Manipulación de la carne	4
1.4 Conservación de la carne.....	5
1.4.1 <i>Métodos físicos</i>	6
1.4.1.1 <i>Bajas temperaturas</i>	6
1.4.1.2 <i>Altas temperaturas</i>	6
1.4.1.3 <i>Modificación concentración de agua.</i>	7
1.4.2 <i>Métodos químicos</i>	7
1.4.3 <i>Otros métodos</i>	7
1.5 Vías de contaminación de la carne	8
1.6 Tipos de contaminación	9
1.7 Microorganismos patógenos de la carne.....	9
2. OBJETIVOS	11
3. METODOLOGÍA, MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
3.1 Material necesario para el trabajo experimental.....	11
3.2 Tipos de carne escogida	12
3.3 Descripción de los medios	13

3.3.1 TSA.....	13
3.3.2 MRS.....	14
3.3.3 EMB.....	14
3.3.4 KAA.....	15
3.3.5 Vogel – Johnson.....	15
3.4 Descripción de la fase experimental.....	17
3.4.1 Siembra y recuento de placas	17
3.4.2 Tinción de Gram	20
3.4.3 Prueba de la catalasa	21
4 RESULTADOS	21
4.1 Cerdo fresco.....	21
4.2 Cerdo procesado.....	23
4.3 Pollo fresco	24
4.4 Pollo procesado	25
4.5 Pavo fresco	26
4.6 Pavo procesado	27
4.7 Ternera fresca.....	28
4.8 Ternera procesada.....	29
4.9 Cordero fresco	31
4.10 Cordero procesado.....	32
5. COMPARATIVA ENTRE CARNES FRESCAS Y PROCESADAS DEL MISMO ORIGEN	33
5.1 Cerdo	33
5.2 Pollo	34
5.3 Pavo.....	35

5.4 Ternera.....	35
5.5 Cordero	36
6. DISCUSIÓN.....	37
7. CONCLUSIONES	39
8. BIBLIOGRAFÍA.....	40

RESUMEN.

La carne es una de las fuentes clásicas de aminoácidos, ácidos grasos y minerales para el ser humano. Es necesario que esta carne sea apta para el consumo humano, si no diremos que está contaminada, y esto se evita con un buen control durante la producción, manipulación, transporte y conservación para evitar esta contenga agentes nocivos como bacterias patógenas como *Salmonella*, *E. coli*, *Staphylococcus* que puedan dañar al consumidor, diferenciándolos de aquellos presentes en las carnes de forma natural o que no poseen alguna función como procesos de fermentación. En este experimento, se ha realizado un análisis microbiológico de diferentes productos cárnicos, tanto frescos como procesados para observar y cuantificar la presencia de microorganismos en ellos y si el proceso de manipulación provoca un aumento de carga microbiana. Los resultados indican que el proceso de manipulación supone un aumento de la carga microbiana, siendo la carne procesada de pavo la que mayor carga microbiana posee y la que menos la carne de pollo fresca.

Palabras clave: carne fresca, carne procesada, carga microbiana.

ABSTRACT.

Meat is one of the classic sources of amino acids, fatty acids and minerals for humans. It is necessary to make this meat suitable for human consumption, if not we will say that it is contaminated, this is avoided with good control during production, handling, transport and storage in order to avoid harmful agents as pathogenic bacteria such as *Salmonella*, *E. coli*, *Staphylococcus* that can harm the consumer, differentiating them from those naturally presented in meat or those which have not some function as fermentation processes. In this experiment, I have done a microbiological analysis of different fresh meat and processed meat to observe and quantify the presence of microorganisms in them and if the handling process causes an increase in microbial load. The results indicate that the handling process supposes an increase of the microbial load, being the turkey processed meat the one which greater microbial load owns and the fresh chicken meat with less microbial load.

Keywords: fresh meat, processed meat, microbial load.

1. INTRODUCCIÓN.

La carne se define como la parte muscular del cuerpo de los diferentes animales y, por ende, del ser humano. La utilización más frecuente de este término hace referencia a la carne comestible de animales terrestres como la de cerdo, de pollo, de pavo, de ternera y de cordero.

Los componentes de las carnes son agua, proteínas, minerales, grasas y ácidos grasos, vitaminas y otros componentes como pequeñas cantidades de carbohidratos. Según la especie, edad, raza, alimentación y sexo del animal del que proceda el porcentaje de estos componentes variará (FAO, 2015).

La importancia desde el punto de vista nutricional radica en sus proteínas de gran calidad en las cuales se encuentran todos los aminoácidos esenciales, así como minerales y vitaminas muy necesarias para el organismo. Por ejemplo: La carne es rica en Fe y en Vitamina B12, las cuales no se encuentran en gran cantidad o bien, ni si quiera se encuentran en productos de origen vegetal (FAO, 2015).

cada 100 gramos		KCal	Prot. g	Grasa g	sodio mg	calcio mg	hierro mg	fósforo mg	potasio mg	vit.A U.I.	vit.B1 mg	vit.B2 mg
Carne vacuna	magra	200	19	13	70	9	1.8	-	-	20	0.05	0.14
	semigorda	255	18	20	-	9	1.8	-	-	30	0.05	0.13
	gorda	305	17	25	-	8	1.7	-	-	40	0.05	0.13
	muy gorda	410	14	40	-	7	1.5	-	-	60	0.05	0.11
Carne de ternera	muy magra	175	20	10	70	9	1.9	-	-	20	0.05	0.14
Cortes americanos	tapa de asado	400	15	37	65	9	2.2	151	350	70	0.06	0.13
	tapa de asado magra	200	21	12	65	12	3.1	208	350	20	0.08	0.18
	bife angosto	380	16	35	65	9	2.3	142	355	70	0.07	0.14
	bife angosto magro	150	21	8	50	6	3.2	220	380	20	0.09	0.19
	vacio	144	22	6	65	15	3.1	200	355	10	0.09	0.2
Hamburguesas	promedio (5 marcas)	209	18	15	-	-	-	-	-	-	-	-
	minimo	181	18.5	11.3	-	-	-	-	-	-	-	-
	maximo	231	14	19	-	-	-	-	-	-	-	-
Hamburguesas caseras	desgrasadas	155	20	8	-	-	-	-	-	-	-	-
Carne de cerdo	magra	275	17	23	-	10	2.5	190	-	-	0.80	0.19
	semigorda	300	16	27	-	9	2.3	175	-	-	0.75	0.18
	gorda	350	15	31	-	8	2.2	160	-	-	0.70	0.17
	Tocino / Panceta	850	3	85	17	8	-	25	10	-	-	-
Pollo	Chicharrón	680	20	60	-	60	2.8	150	-	-	-	-
	con piel	170	28	10	80	11	2	200	350	65	0.08	0.15
	sin piel	115	23	2	50	10	1.1	210	320	60	0.05	0.1
	pechuga	110	20	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Pavo	muelo	125	20	3.5	-	-	-	-	-	-	-	-
	sin desgrasar	240	19	20	60	20	2	220	250	400	0.6	0.1
	muelo	130	20	4	-	-	-	-	-	-	-	-
Carne de cordero	pechuga	115	24	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-
	magra	165	18	10	95	-	-	-	-	-	-	-
	semigorda	315	16	28	75	-	-	-	-	-	-	-
	gorda	400	13	40	70	-	-	-	-	-	-	-

Tabla nº 1. Composición nutricional de varios tipos de carnes.

En esta tabla se puede observar como carnes de un mismo animal, pueden tener diferente composición química.

1.1 Tipos de carne.

Según el BOE, en el decreto 2484/1967, del 21 de septiembre, por el que queda aprobado el texto del Código Alimentario Español, hay cuatro posibles clasificaciones:

1. Según la especie animal del que proceda la carne: Carne bovina, ovina, caprina, porcina, equina, aviar, de caza o de animales exóticos como cocodrilo, canguro o demás carnes que solo se comen en algún área concreta del planeta.
2. Según la clase de canal. (Entendiéndose como canal el cuerpo de los animales una vez que se le han extraído las vísceras, excepto los riñones, pudiendo tener o no la cabeza, piel y patas. La canal deberá presentar la masa muscular adecuadamente desarrollada por todo el cuerpo.) Las normas para clasificar las distintas canales serán señaladas por la reglamentaciones y legislación complementaria en este Código.
3. Según la categoría. (Entendiéndose como categoría los diferentes tipos de carnes que proporciona cada región anatómica dentro de la canal. La reglamentación establecerá las diferentes categorías de carne en los distintos tipos de carne y canales.) Las pautas para la disgregación adecuada de las distintas canales serán señadas por las reglamentaciones y legislación del Código.
4. Según la forma en que se ha conservado para ser consumida por el ser humano, pueden ser: frescas, refrigeradas, congeladas, impropias, defectuosas o nocivas.

1.2 Derivados cárnicos.

Son los productos alimentarios los cuales se preparan totalmente o parcialmente con carne o menudos de los animales según estipula el punto 1.1 del anexo del Reglamento 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo del 29 de abril de 2004 en el que se establecen las normas específicas de higiene para los alimentos de origen animal y que se han sometido a operaciones específicas antes de su comercialización. Los derivados cárnicos se agrupan atendiendo de si han sufrido tratamiento térmico o no, por tanto, tendríamos dos grupos: Tratados por calor y sin tratamiento térmico.

1.2.1 Tratados por calor. Según el tratamiento térmico que se ha utilizado para su elaboración se distinguen:

- Derivado cárnico esterilizado.

En los que se encuentra el jamón cocido enlatado, choped enlatado, salchichas enlatadas...

- Derivado cárnico pasteurizado.

En los que se encuentra el jamón cocido, lomo cocido, paleta cocida, pechuga de pollo cocida, lacón cocido, salchichas cocidas, butifarra ...

- Derivado cárnico de tratamiento térmico incompleto.

En los que se encuentra el lomo semicocido, panceta, bacón, morcilla...

1.2.2 No tratados por el calor. Según las diferentes técnicas que se pueden usar para la elaboración se distinguen:

- Derivados cárnicos curados-madurados.

En los que se encuentra el Jamón y paleta, cecina, panceta curada, tocino salado, lomo embuchado, chorizo, salchichones, fuet, ...

- Derivados cárnicos oreados

En los que se encuentra lacón, morcilla oreada, chorizo criollo, ...

- Derivados cárnicos marinado-adobado

En los que se encuentra lomo adobado, pinchos morunos...

- Derivados cárnicos salmuerizados

En los que se encuentra el codillo en salmuera

- Derivados cárnicos no sometidos a tratamientos

En los que se encuentran el flamenquín cordobés, la salchicha la hamburguesa, la longaniza, la butifarra y el chorizo fresco.

1.3 Manipulación de la carne.

Habrà que seguir las pautas de la legislación vigente, del Real Decreto 109/2010 del 5 de febrero y del Reglamento (CE) 853/2004 del Parlamento Europeo y del consejo de abril de 2004 relativo a higiene de productos cárnicos.

Las manipulaciones de la carne deberán realizarse con la mayor destreza y limpieza posible, sin que esto altere sus características organolépticas, ni que se produzcan contaminaciones de ningún tipo, además de reducir al mínimo posible la pérdida de su valor nutritivo. Las manipulaciones más frecuentes a la carne son:

- Lavado de la canal entera, media o cuarta durante el troceado con agua potable para eliminar así los residuos y las sustancias extrañas.

- Oreo, natural o refrigerado durante el tiempo adecuado
- Deshuesado, separado mediante distintos cortes la carne del hueso.
- Troceado, dividir la canal en distintas piezas.

El troceado puede ser:

- Fileteado. Fraccionamiento de la pieza de carne en un tamaño adecuado para el consumo individual.
- Picado. Fraccionamiento de la pieza en trozos de tamaño reducido mediante máquinas o instrumentos cortantes adecuados.

1. 4 Conservación de la carne.

Se usan técnicas de conservación en la carne para prolongar su vida media útil, así como para su almacenamiento y mantener sus características nutricionales, color, sabor, y proporcionar niveles aceptables de seguridad higiénica impidiendo el crecimiento o la actividad de microorganismos que pudieran ser patógenos para el consumidor. (Sánchez Escalante, 2008)

Hay diferentes métodos para la conservación de la carne:

1.4.1 Métodos físicos

1.4.2 Métodos químicos

1.4.3 Otros métodos

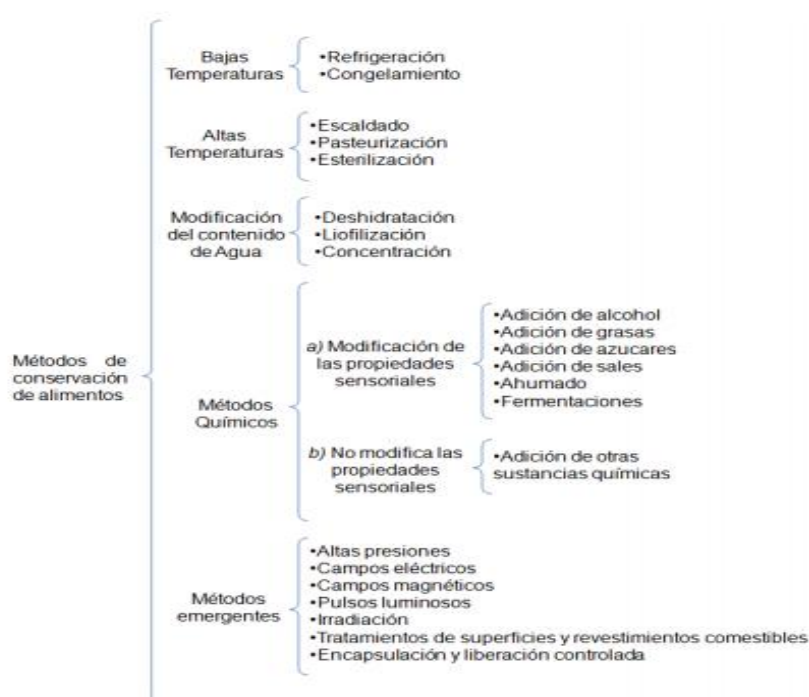


Tabla nº 2. Métodos conservación de la carne. (Aguilar Morales, 2012)

1.4.1 Métodos físicos.

Los métodos físicos son aquellos que utilizan tratamientos físicos para inhibir o destruir microorganismos indeseables

1.4.1.1 Bajas temperaturas:

- Refrigeración: En los que la carne se ha de mantener a bajas temperaturas, situadas por encima del punto de congelación de esta. Según el tipo de carne, el periodo de almacenamiento puede variar. Con este tratamiento solo podrían crecer microorganismos psicrótrofos y psicrófilos. Es importante controlar la variación de temperatura puesto que esto es importante en la tasa de proliferación de los distintos microorganismos. (Muñoz Pérez del Pulgar, 2006)
- Congelación y ultracongelación. La congelación consiste en someter el alimento a temperaturas inferiores a su punto de congelación (-18 °C) durante un tiempo reducido. Determina menos cambios en las propiedades organolépticas y cualitativas que ningún otro método, es suma importancia que la congelación se produzca en el menor tiempo posible, para que así las características originales de la carne no se vean afectadas, si este proceso de congelación es adecuado y se almacena correctamente, se conservará la mayor parte del valor nutritivo. Puede haber pérdidas del valor nutritivo si se realiza un método de descongelación inadecuado. (Sánchez Escalante, 2008)

1.4.1.2 Altas temperaturas:

- Escaldado. Consiste en sumergir a la carne en agua caliente a una temperatura de 85-98°C durante 15-30 segundos, también se puede hacer con vapor (con este método no se altera tanto su valor nutricional)
- Pasteurización. Consiste en emplear temperaturas de 60-65°C por tiempos comprendidos entre 3 y 4 horas o de 75-90°C durante tiempos comprendidos entre 2 y 5 minutos. Con esto se quiere eliminar el número máximo de microorganismos patógenos posibles. La pasteurización se tiene que acompañar de un enfriamiento rápido para así eliminar dichos microorganismos. Después de este proceso los alimentos deben mantenerse a baja temperatura, a unos 4°C. Así la carne puede mantenerse entre varios días y unos meses.
- Esterilización. Consiste en eliminar todos los microorganismos presentes en la carne. Los productos se envasarán al vacío. La carne se somete a temperaturas entre 118 y 120 ° C por 1 minuto. (Aguilar Morales, 2012)

1.4.1.3 Modificación concentración de agua.

- Secado: Consiste en eliminar parcialmente el agua. También se puede realizar mediante la aplicación de una fuente de calor suave y corrientes de aire.
- Liofilización: Consiste en la desecación de un alimento previamente congelado. Este proceso permite la conservación máxima de la calidad original de la carne y de su valor nutritivo. (Sánchez Escalante, 2008)

1.4.2 Métodos químicos

Los métodos químicos son aquellos que utilizan alguna sustancia química o algún proceso físico para acabar con los microorganismos o evitar que estos puedan estar presentes en la carne. Hay dos clases dependiendo de si se modifican o no sus características o propiedades sensoriales.

- Sustancias que modifican las propiedades sensoriales. Adición de alguna sustancia como sales para curar o salar la carne, de esta manera se evita el crecimiento de microorganismos. La sal cambia el sabor de la carne y le otorga otras propiedades. Otro proceso es el de ahumado que consiste en exponer a la carne a humo para conferir sabor y alargar la vida de la carne, también cambia las propiedades de la carne. Otro proceso importante es el de fermentación de la carne gracias a algún tipo de bacterias fermentadoras, provoca un cambio en el sabor de la carne. También técnicas como el encurtido, marinado y adobado de la carne (Aguilar Morales, 2012)
- Sustancias que no modifican las propiedades sensoriales. Son aquellas que no alteran las propiedades de la carne. Se incluyen conservadores químicos como aditivos que además aumentan su vida útil (pueden cambiar las propiedades sensoriales) y otras sustancias con capacidad antiséptica. (Aguilar Morales, 2012)

1.4.3 Otros métodos

Estos métodos son aplicaciones actuales que o bien, complementan los métodos tradicionales o bien, los sustituyen, sobre todo en las grandes empresas con grandes recursos y espacios. Los más frecuentes son altas presiones e irradiación.

- Altas presiones. Utiliza una serie de bombas y equipos de alta presión para la conservación, necesita equipos relativamente complejos para la conservación de la carne. Este método de conservación nos asegura la inactivación de los

microorganismos, así como evitar las pérdidas en la calidad del alimento. (Velázquez *et al*, 2005)

- Irradiación. La irradiación se puede considerar como un método físico de conservación en el cuál se usa la radiación, la emisión y propagación de energía a través del espacio, para conservar los alimentos, ya que reduce el número de microorganismos patógenos aumentando así la comercialización de los productos y mejorando la calidad higiénicos y sanitarios. (Suárez, 2001)

1.5 Vías de contaminación de la carne.

Se entiende como contaminación a la alteración de las condiciones normales de un alimento por la presencia de algún microorganismo o sustancia ajena al producto. (Pastor *et al*, 2017)

Según la FAO, hay tres posibles agentes de contaminación:

- Agentes físicos: Se debe a la presencia de materiales o elementos que normalmente no se encuentran en los alimentos como pueden ser trozos de metal, plástico, cristales, trozos de hueso, etc; este tipo de contaminación puede acarrear enfermedades o daños a los consumidores. (FAO, 2016)
- Agentes químicos: Estos peligros pueden acontecer a lo largo de las etapas de la cadena de la carne, desde que se nace el animal hasta que la pieza de carne es consumida por el consumidor. Puede llegar de forma accidental o por mala manipulación. Ejemplos de contaminantes químicos:
 - Sustancias químicas presentes de forma natural.
 - Contaminantes o bien, ambientales o bien industriales como pueden ser mercurio o plomo entre otros.
 - Residuos de productos químicos usados en la agricultura o ganadería.
 - Sustancias tóxicas transmitidas por el contacto del propio alimento con el envase.
 - Materiales o superficies contaminadas por sustancias químicas. (FAO, 2016)
- Agentes biológicos: Se debe a la presencia de microorganismos patógenos en la carne, estos microorganismos pueden ser virus, bacterias y hongos entre ellos. Tienen una capacidad elevada de multiplicación. El Real Decreto 664/1997 del 12 mayo clasifica a los agentes biológicos en cuatro grupos

atendiendo al riesgo de infección, siendo el primer grupo aquellos microorganismos que resultan poco probables que causen enfermedad al hombre; el segundo grupo pueden causar enfermedad, pero es poco probable que se propague a la colectividad; el tercer grupo puede causar enfermedad grave y presenta riesgo de propagación y el cuarto puede también causar enfermedades graves con gran posibilidad de contagio colectivo y no existe tratamiento eficaz contra el microorganismo. (León Bonillo & Ramírez Juidías, 2004)

Estos microorganismos pueden encontrarse en el medio ambiente, en humanos, animales y materiales. (FAO, 2016)

1. 6 Tipos de contaminación.

- Primaria: Ocurre durante el proceso de producción de la carne. Actualmente es casi inevitable que ocurra. Ejemplo: alimentación del animal.
- Directa: Ocurre debido a la manipulación de la carne por culpa del manipulador. Es de las más simples y comunes. Puede ocurrir por falta de higiene o descuidos. Ejemplo: estornudar, toser, caída de un pelo, etc.
- Cruzada: Paso del contaminante de un alimento contaminado a otro que no lo está. Sobre todo, por uso de productos químicos, microorganismos al no limpiar superficies, herramientas, etc. (Pastor *et al*, 2017)

1.7 Microorganismos patógenos en la carne.

Según el manual de manipulación de alimentos de la junta de Andalucía estos son los microorganismos patógenos más comunes de la carne:

- *Escherichia coli*.

Es un bacilo gram negativo anaerobio facultativo. Se le considera un microorganismo de la microbiota natural puesto que esta bacteria coloniza de forma natural el intestino. Hay cepas que pueden ser patógenas, la presente en la carne es del serotipo O157:H7 y pueden causar distintos daños como diarreas, vómitos, dolor abdominal y fiebre. (Rodríguez-Angeles, 2002)

- *Salmonella*

Es un bacilo gram negativo no formadores de esporas y anaerobios facultativos. Los síntomas predominantes de la Salmonelosis son fiebre, diarrea, cefaléa, anorexia,

escalofríos o calambres abdominales severos. Reservorio aves de corral, carne porcina y vacuna. (Parra *et al*, 2002)

➤ *Yersinia enterocolitica*

Es un bacilo gram negativo y anaerobio facultativo. Este bacilo causa un cuadro de diarrea líquida o mucosa con presencia de leucocitos polimorfonucleares en las heces, también hay fiebre dolor abdominal. (Rodríguez Fernández *et al*, 2007)

➤ *Clostridium botulinum*

Es una bacteria gram negativa y anaerobia estricta formadora de esporas. Posee una tolerancia variable al oxígeno, pero no crecerá jamás en atmósferas que contienen más de un 10% de oxígeno. Produce la toxina botulínica (TXB), esta toxina provoca una sintomatología diversa, varía desde la leve hasta una grave que puede provocar la muerte en 24 horas por insuficiencia respiratoria. La sintomatología empieza con una afectación de nervios craneales, puede haber náuseas, vómito y dolor abdominal, además de mareos y visión borrosa, pero no fiebre (Pérez-Pérez *et al*, 2002)

➤ *Listeria monocytogenes*.

Es una bacteria gram positiva anaerobia facultativa intracelular, puede causar infecciones invasivas muy grandes en el hombre, listeriosis, la cual afecta principalmente a personas inmunodeprimidas, pacientes con enfermedades crónicas, mujeres embarazadas y neonatos. Causa una elevada mortalidad. Los síntomas son fiebre y escalofríos, vómitos y dolor de cabeza, también puede provocar abortos. (Sánchez Artola & Palencia Herrejón, 2010)

➤ *Staphylococcus aureus*

Son cocos Gram positivos. *S. aureus* es la más patógena de su grupo y uno de los patógenos más importantes a nivel mundial. Los síntomas son vómitos, cólicos, diarrea y dolor abdominal. (Cervantes-García *et al*, 2014)

➤ *Streptococcus fecales*

Son un grupo heterogéneo de bacterias gram positivas y anaerobias facultativas. Son muy resistentes a condiciones adversas y también son buenos indicadores para valorar las condiciones de conservación e higiénica de los alimentos. Estos liberan unas toxinas llamadas “micotoxinas”, en las que provoca al hombre infecciones o reacciones alérgicas. (Suárez Pita, 2002)

➤ *Clostridium perfringens*

Es una bacteria gram positiva anaeróbica con capacidad de producir esporas, las que resisten bien el tratamiento térmico. Puede provocar diarreas en humanos (y animales) dolor abdominal agudo y náuseas. (Buitrago *et al*, 2018)

➤ *Bacillus cereus*

Es un bacilo Gram positivo y anaerobio facultativo, forma esporas resistentes a condiciones adversas. *Bacillus cereus* produce toxinas como las enterotoxinas o toxinas eméticas que son las causantes de los problemas de salud, provocan diarreas y vómitos respectivamente. Los síntomas pueden confundirse con las intoxicaciones ocasionadas por otras bacterias como *Staphylococcus aureus*. (Sánchez *et al*, 2016)

2. OBJETIVOS.

Los objetivos de este trabajo experimental son:

1. Analizar microbiológicamente carnes de cerdo, pollo, pavo, ternera y cordero, para compararlas entre sí y observar cuál de ellas tiene más carga de microorganismos patógenos.
2. Análisis microbiológico de carnes frescas y procesadas procedentes del mismo origen para poder comparar en que producto se observa una mayor carga de microorganismos patógenos.
3. Análisis microbiológico comparativo de carnes frescas y procesadas procedentes de distintos animales, con el fin de comprobar si el origen de la carne afecta a la mayor o menos presencia de microorganismos patógenos.

3. METODOLOGÍA, MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 Material necesario para el trabajo experimental.

- 10 tipos de carne (muestras)
- Balanza
- Triturador de paletas Stomacher y bolsas de plástico especiales
- 20 tubos Falcon con faldilla
- 80 placas de petri de medio TSA
- 40 placas de petri de medio MRSA

- 40 placas de petri de medio EMB
- 40 placas de de petri medio KAA
- 40 placas de de petri medio Vogel – Johnson
- 6 matraces de 800 mL
- 2 Matraz de 400 mL de solución salina al 0,9%
- 40 tubos eppendorf de 1ml con 0,9 mL de solución salina al 0,9 %
- Dos gradillas
- Una micropipeta
- Puntas para la micropipeta
- Mechero Bunsen
- Asa de Digralsky
- Asa de siembra
- Estufas a 30°C y 37°C
- Portas
- Cubeta para tinciones
- Frasco de agua destilada “frasco lavador”
- Frasco de cristal violeta
- Frasco de Lugol
- Frasco de alcohol 96°
- Frasco de safranina
- Frasco de H₂O₂
- Microscopio
- Aceite de inmersión

3.2 Tipos de carne escogida.

Para este trabajo experimental he elegido los tipos de carne de los animales más demandados y consumidos en España, como son cerdo, pollo, pavo, ternera y cordero. (Martín Cerdeño, 2018)

De cada animal se ha analizado una muestra de carne fresca y otra procesada.

Carne procedente de:	Muestra Fresca	Muestra Procesada
Cerdo	Lomo	Hamburguesa
Pollo	Pechuga	Salchicha
Pavo	Chuleta	Carne picada
Ternera	Filete	Carne picada
Cordero	Chuleta	Pinchitos

Tabla nº 3. Muestras

Todas las muestras frescas se compraron el mismo día y del mismo lugar. Y todas las muestras procesadas se compraron el mismo día y del mismo lugar. No comprándose las carnes frescas y las carnes procesadas el mismo día ni del mismo lugar.

3.3 Descripción de los medios.

Usamos un total de cinco medias, un medio general como es el TSA y los otros cuatro son medios selectivos, MRS, EMB, KAA y Vogel-Johnson. Dichos medios son de Scharlab (Barcelona) siendo preparados según las instrucciones del fabricante.

3.3.1 TSA.

Agar Soja Triptona o TSA es medio ampliamente utilizado que permite el desarrollo de gran cantidad de microorganismos, todas las bacterias pueden crecer en este medio, tanto gram + como gram -, tanto exigentes como como *Listeria* o *Brucella*; y no exigentes, por tanto, se considera un medio no selectivo. Se utiliza para diagnóstico de rutina debido a que es muy fiable y sus resultados se pueden reproducir con facilidad. Posee un color amarillo pajizo. La preparación de este medio consiste en suspender 40 g en 1000 mL de agua destilada, mezclar bien dicha disolución calentándola, posteriormente se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos y se vierte en placas de Petri dejándolas enfriar y solidificar.

Composición del TSA (g/L):

Peptona de caseína	15,0
Peptona de soja	5,0
Cloruro sódico	5,0
Histidina	1,0
Lecitina	0,7

Polisorbato 80	5,0
Tiosulfato sódico	0,5
Agar	15,0

pH: $7,3 \pm 0,2$ a 25°C

3.3.2 MRS.

El Agar MRS, medio sólido de Man, Rogosa y Sharpe, es un medio selectivo que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de Lactobacilos y otras bacterias gram + del ácido láctico, también hongos. Posee un color amarillo marronoso. La preparación de este medio consiste en suspender 62 gramos en 1000 mL de agua destilada y calentarlo y agitarlo hasta llevarlo a ebullición, posteriormente se esteriliza a 121°C durante 12 minutos y se vierte en placas de Petri dejándolas enfriar y solidificar.

Composición del Agar MRS (g/L):

Peptona proteosa	10,00
Extracto de carne	8,00
Extracto de levadura	4,00
D(+)-Glucosa	20,00
Acetato sódico	5,00
Citrato triamónico	2,00
Sulfato magnésico	0,20
Sulfato manganoso	0,05
Fosfato dipotásico	2,00
Polisorbato 80	1,00
Agar	14,00

pH: $6,2 \pm 0,2$ a 25°C

3.3.3 EMB.

El agar eosina-azul de metileno o Agar EMB es un medio selectivo que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias bacilares gram -, para ser más exactos de enterobacterias. Posee un color purpura rosado o bien, rojizo. La preparación de este medio consiste en suspender 37,5 gramos en 1000 mL de agua destilada y calentarlo y agitarlo hasta llevarlo a ebullición, posteriormente se esteriliza a 121°C durante 15 minutos y se vierte en placas de Petri dejándolas enfriar y solidificar.

Composición del EMB (g/L)

Peptona	10,00
Lactosa	10,00
Fosfato dipotásico	2,00
Eosina amarilla	0,40
Azul de metileno	0,065
Agar	15,00

pH: 6,90 $\pm$ 0,2 a 25°C

3.3.4. KAA.

El agar confirmativo KAA es un medio selectivo que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de enterococos gram +, para ser más exactos estreptococos. Posee un color más claro que el del TSA. La preparación de este medio consiste en suspender 48 gramos en 1000 mL de agua destilada y calentarlo y agitarlo hasta llevarlo a ebullición, posteriormente se esteriliza a 121°C durante 15 minutos y se vierte en placas de Petri dejándolas enfriar y solidificar.

Composición del KAA (g/L)

Triptona	20,00
Extracto de levadura	5,00
Cloruro sódico	5,00
Citrato disódico	1,00
Esculina	1,00
Citrato férrico-amónico	0,50
Azida sódica	0,15
Kanamicina sulfato	0,02
Agar	15,00

pH: 7,0 $\pm$ 0,2 a 25°C

3.3.5 Vogel – Johnson.

El Vogel-Johnson es medio selectivo que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de cocos gram +, para ser más exactos estafilococos. Presenta coloración tostada o anaranjada. La preparación de este medio consiste en suspender 60 gramos en 1000 mL de agua destilada y calentarlo y agitarlo hasta llevarlo a ebullición,

posteriormente se esteriliza a 121°C durante 15 minutos, después se ha de enfriar hasta llegar a los 50°C aproximadamente y se le añade en condiciones de asepsia 20mL de solución de telurito potásico al 1% o bien 6 mL de solución al 3,5% de telurito potásico. No se debe calentar después de añadir el telurito potásico. La función del telurito potásico es que las colonias de estafilococos obtengan la coloración negra y así poder visualizarse.

Composición del Vogel-Johnson (g/L)

Peptona de caseína	10,00
Extracto de levadura	5,00
Manitol	10,00
Fosfato dipotásico	5,00
Cloruro de litio	5,00
Glicina	10,00
Rojo de fenol	0,025
Agar	15,00

pH: 7,2 $\pm$ 0,2 a 25°C



Figura 1. Matraces con las soluciones para realizar los medios.

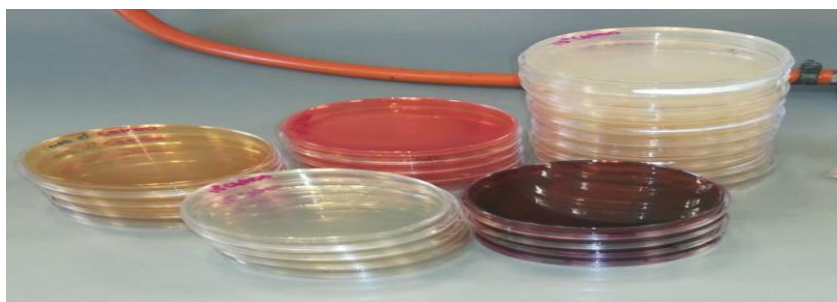


Figura 2. Medios citados apilados siendo el primer grupo de placas de Petri MRS, el segundo KAA, el tercero Vogel-Johnson, el cuarto EMB y el quinto TSA.

3.4 Descripción de la fase experimental.

La fase experimental duró 3 semanas. Esta se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología del Edificio A2 de la Universidad de Jaén bajo la supervisión de los docentes del área de Microbiología del departamento ciencias de la salud de la Universidad de Jaén.

3.4.1 Siembra y recuento de placas.

Comenzamos con la preparación de los medios de cultivo y de los matraces de solución salina al 0,9% necesarios para el trabajo experimental. Dichos preparativos tuvieron que realizarse en la semana uno y en la semana dos, para así tener material suficiente y tener la seguridad de que dicho material no se contaminará ni perderá su calidad y funcionalidad.

De cada alimento se pesarán 5 gramos, a los cuales se añadirán 45 mL de solución salina estéril al 0,9%. Dicha mezcla será homogenizada en un homogeneizador (Stomacher®) para así obtener una suspensión bacteriana del alimento. Esta suspensión será la dilución 10^0 .

Posteriormente se ha de realizar una serie de diluciones seriadas, en total 4. (Necesitaremos dos diluciones 10^{-1} para la siembra de las placas)

Estas diluciones seriadas se harán cogiendo 100 μ L una vez resuspendida la dilución recién obtenida del Stomacher®, también llamada 10^0 , hasta un tubo eppendorf de solución salina estéril al 0,9% con 0,9 mL que será la dilución 10^{-1} , de esta nueva dilución 10^{-1} se cogerán otros 100 μ L hasta otro tubo eppendorf de solución salina estéril al 0,9% con 0,9 mL que será la dilución 10^{-2} , y así hasta obtener la 10^{-4} .

Una vez realizadas las diluciones seriadas ya podremos comenzar a sembrar las placas.

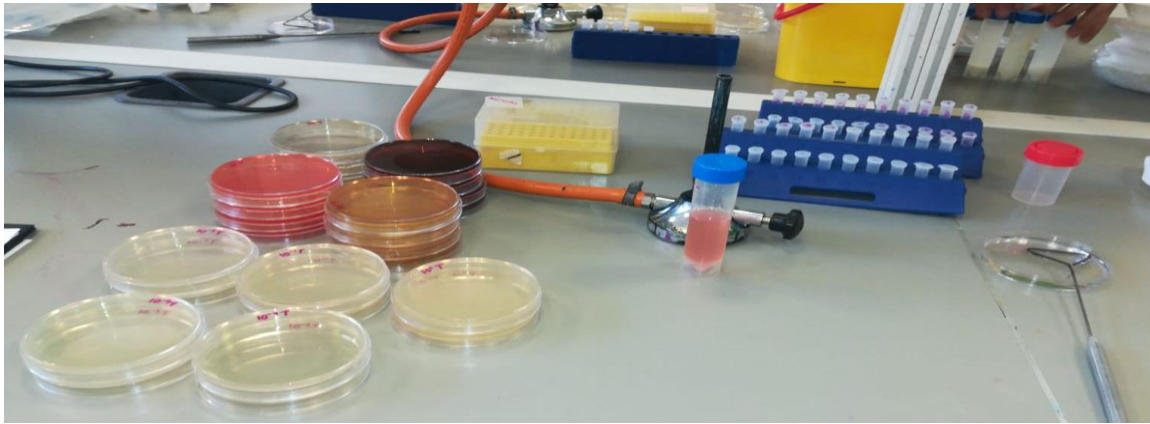


Figura 3. Puesto preparado para realizar la siembra

En la figura 3 observamos un puesto de trabajo listo para comenzar con la siembra de las placas. Para cada alimento sembraremos:

- 10 placas de TSA. Desde la dilución 10^0 hasta la dilución 10^{-4} . Para cada dilución sembraremos dos placas, para así obtener una réplica para así minimizar los posibles errores, esto se realizará también para las siguientes placas.
- 4 placas de MRS. Dos de la dilución 10^0 y dos de la dilución 10^{-1} .
- 4 placas de EMB. Dos de la dilución 10^0 y dos de la dilución 10^{-1} .
- 4 placas de KAA. Dos de la dilución 10^0 y dos de la dilución 10^{-1} .
- 4 placas de Vogel-Johnson. Dos de la dilución 10^0 y dos de dilución 10^{-1} .

En total 26 placas por alimento.

En condiciones de asepsia, cerca del mechero, se pipetea con la micropipeta 100 μ L en cada una de las 26 placas y se extiende gracias al Asa de Digralsky una vez que se ha flameado y se ha enfriado. Es importante flamear al cambiar de medio, no es necesario flamear en placas del mismo medio si se extiende desde la menos concentrada hasta la más concentrada.

Una vez que las placas se han sembrado, estas se llevarán a la estufa, las placas de MRS se meten en una estufa a 30°C y el resto de las placas a 37°C durante 48 horas.

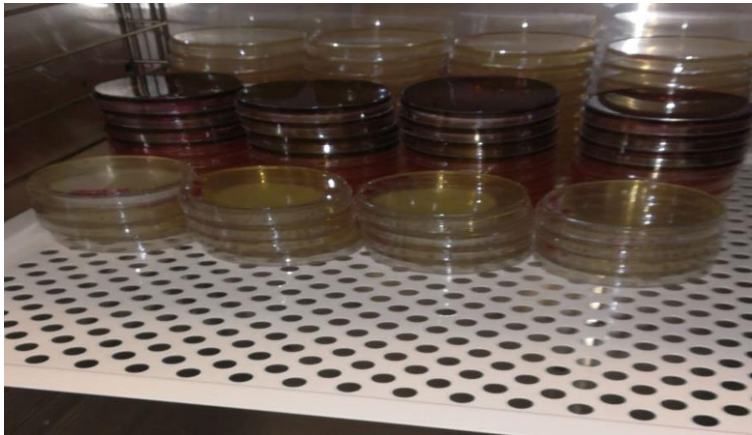


Figura 4. Placas en la estufa.

A las 48 horas de sembrar y meter las placas en la estufa, se realizará el recuento de dichas placas, escogiéndose para el recuento las placas de cada medio que estén entre 30 y 300 colonias. Se cuantifica el número exacto de bacterias y se expresa como Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) presentes por volumen con la siguiente fórmula.

$$UFC = \frac{N^{\circ} \text{ colonias}}{\text{Factor de dilución}} \times 10$$

Como poseemos dos placas de cada dilución de la que hayamos escogido para el recuento, deberemos de sumarlas y hacer la media y ese número es el que utilizaremos para la fórmula anterior.

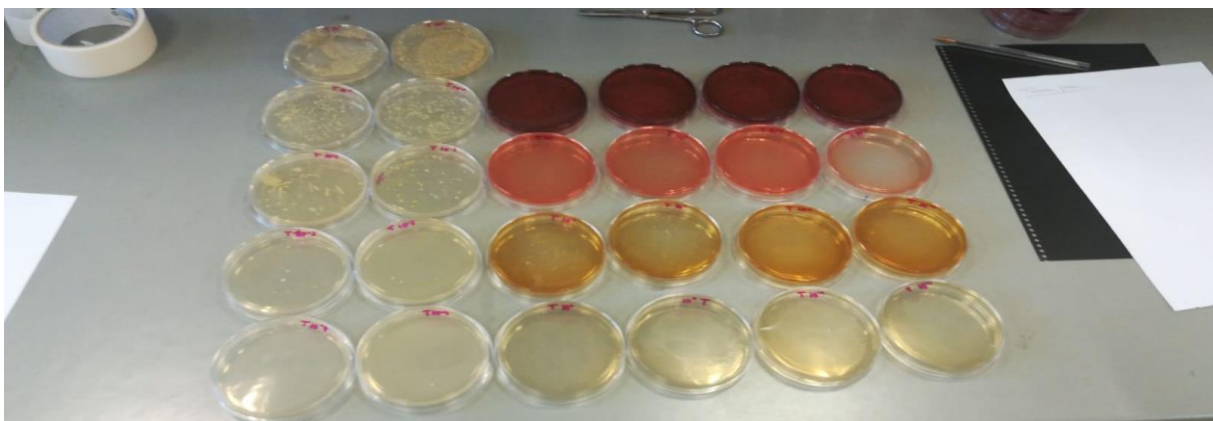


Figura 5. Placas de un alimento listas para el recuento

Para el recuento es útil hacer un punto encima de la placa cuando cuentas para así no equivocarte ni saltarte ninguna.

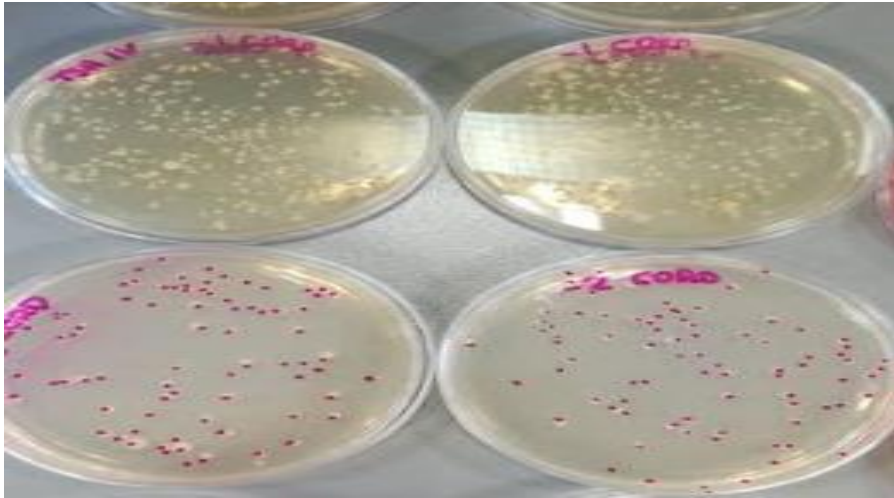


Figura 6. Ejemplo de recuento de placas de TSA, placa elegida: 30-300 colonias, cada punto morado es una colonia

3.4.2 Tinción de Gram.

Para la tinción de Gram se deberán seleccionar las colonias que presenten morfologías o coloración diferente obtenidas en cada medio empleado de cada alimento. Se hará en las placas de medios selectivos. Para así poder observar e identificar el tipo de bacteria acorde a su morfología y coloración.

La tinción consta de los siguientes pasos:

1. Poner una gota de agua destilada encima de un portaobjetos estéril ayudándonos del asa de siembra flameada y enfriada.
2. Elegir la colonia distinta, picarla y extenderla sobre la gota de agua.
3. Fijarla gracias al mechero Bunsen, con precaución de no calentar mucho el portaobjetos ya que puede destrozarse a las bacterias o bien romper el portaobjetos.
4. Enfriar el portaobjetos.
5. Verter Cristal Violeta encima del portaobjetos donde estará la bacteria extendida y dejar que se tiña durante 2 minutos.
6. Verter Lugol encima del Cristal Violeta y dejar que se tiña durante 2 minutos.
7. Limpiar con etanol (Precaución con el uso de etanol ya que un uso excesivo decolorará la muestra haciendo que no se pueda observar al microscopio)

8. Limpiar el etanol con agua destilada.
9. Verter Safranina y dejar que se tiña durante 3 minutos.
10. Limpiar con agua.
11. Secar el portaobjetos.
12. Observar al objetivo de 100x con aceite de inmersión

Las bacterias gram + adquirirán una coloración azul-violeta mientras que las gram – adquirirán una coloración rosácea; y al picar solo una colonia sólo deberíamos observar un tipo de bacteria.

3.4.3. Prueba de la catalasa.

Necesitamos un portaobjetos y un frasco de agua oxigenada (H_2O_2). Elegiremos las colonias a las cuales les hemos realizado la tinción de Gram. Esta prueba consiste en verter una gota de H_2O_2 en el portaobjetos e inocular en dicha gota la colonia. Después de esto puede ocurrir dos cosas:

- Hay burbujeo. Prueba catalasa positiva.
- No hay burbujeo. Prueba catalasa negativa.

Esta prueba nos indicará si la bacteria posee enzima catalasa o no, si posee enzima catalasa descompondrá el peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , en H_2O y O_2 y por eso se observarán las burbujas.

Esta prueba se realizó en las placas de EMB, KAA y Vogel-Johnson.

Con esta prueba y la tinción de Gram podremos identificar y clasificar las bacterias de cada colonia presentes en cada placa.

4. RESULTADOS.

Ahora procedemos a la visualización de los resultados por cada tipo de alimento, tanto fresco como procesado.

4.1 Cerdo fresco.

Medio cultivo	UFC/g	Colonia	Visu tinción	Catalasa
TSA	$4,2 \times 10^5$			
MRS	$1,23 \times 10^5$	Blanca	levadura	

EMB	$1,85 \times 10^4$	Rosa	Cocobacilos Gram -	+
		Morada	Cocobacilos Gram -	+
		Morada punto negro	Cocobacilos Gram -	+
KAA	Debajo del límite de detección			
Vogel-Johnson	$3,8 \times 10^3$	Negra	Estafilococos	+
		Naranja punto negro	Levaduras	+

Tabla 4. Recuento de microorganismos en cerdo fresco.

En el cerdo fresco observamos (tabla 4) que el recuento de mesófilos totales en TSA, medio no selectivo, es de $4,2 \times 10^5$. El mayor valor de UFC/g en medios selectivos se da en el MRS, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias del ácido láctico, con un valor de $1,23 \times 10^5$; seguido por el medio selectivo EMB, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de enterobacterias, con un valor de $1,85 \times 10^4$ y por último el medio selectivo Vogel-Johnson, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estafilococos, con un valor de $3,8 \times 10^3$. En el medio selectivo KAA, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estreptococos, no se ha dado crecimiento.

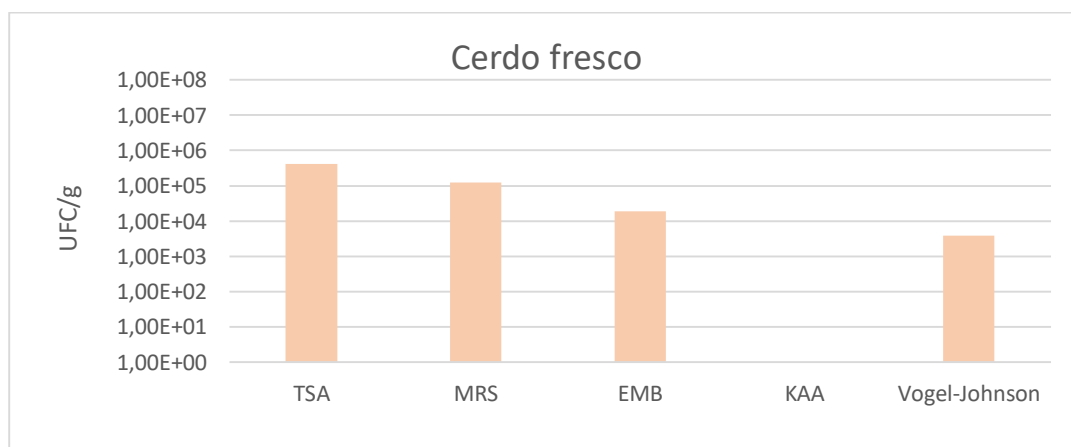


Figura 7. Gráfica del recuento medio en cerdo fresco.

4.2 Cerdo procesado.

Medio cultivo	UFC/g	Colonia	Visu tinción	Catalasa
TSA	$4,38 \times 10^6$			
MRS	$6,7 \times 10^4$	Blanca	Levadura	+
EMB	$1,61 \times 10^4$	Rosa	Cocobacilos	+
		Morada	Cocobacilos Gram -	+
		Rosa punto morado	Cocobacilos	
KAA	Debajo del límite de detección			
Vogel-Johnson	$4,8 \times 10^3$	Negra	Estafilococos Gram +	+
		Blanca	Levadura	+
		Negra halo gris	Estafilococos	+

Tabla 5. Recuento de microorganismos en cerdo procesado.

En el cerdo procesado observamos (tabla 5) que el recuento de mesófilos totales en TSA, medio no selectivo, es de $4,38 \times 10^6$. El mayor valor de UFC/g en medios selectivos se da en el MRS, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias del ácido láctico, con un valor de $6,7 \times 10^4$; seguido por el medio selectivo EMB, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de enterobacterias, con un valor de $1,61 \times 10^4$ y por último el medio selectivo Vogel-Johnson, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estafilococos, con un valor de $4,8 \times 10^3$. En el medio selectivo KAA, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estreptococos, no se ha dado crecimiento.

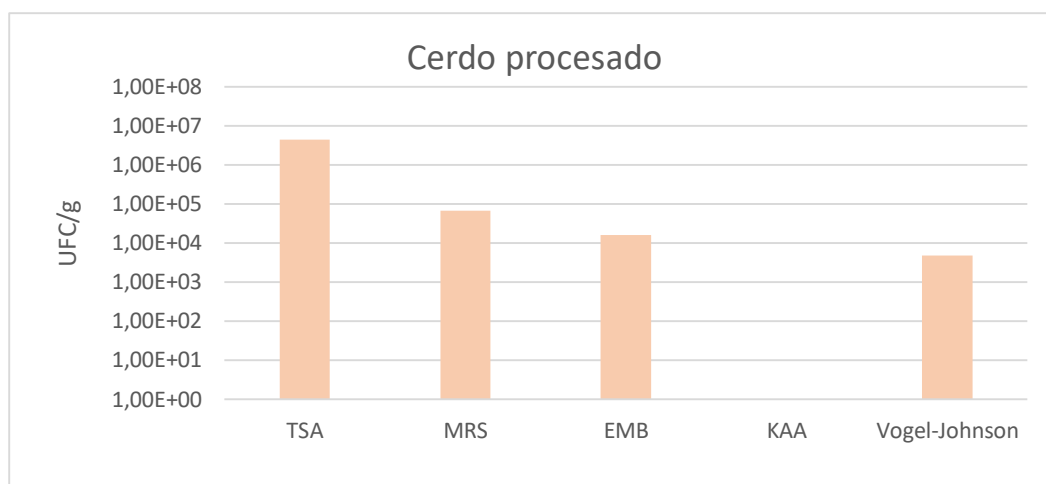


Figura 8. Gráfica del recuento medio en cerdo procesado.

4.3 Pollo fresco.

Medio cultivo	UFC/g	Colonia	Visu tinción	Catalasa
TSA	1×10^5			
MRS	$3,9 \times 10^3$	Blanca	Cocos Gram +	
EMB	$3,2 \times 10^4$	Negra	Enterobacteria	-
		Morada	Enterobacteria	-
KAA	Debajo del límite de detección			
Vogel-Johnson	7×10^2	Negra	Estafilococos	+

Tabla 6. Recuento de microorganismos en pollo fresco.

En el pollo fresco observamos (tabla 6) que el recuento de mesófilos totales en TSA, medio no selectivo, es de 1×10^5 . El mayor valor de UFC/g en medios selectivos se da en el EMB, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de enterobacterias, con un valor de $3,2 \times 10^4$; seguido por el medio selectivo MRS, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias del ácido láctico, con un valor de $3,9 \times 10^3$ y por último el medio selectivo Vogel-Johnson, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estafilococos, con un valor de 7×10^2 . En el medio selectivo

KAA, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estreptococos, no se ha dado crecimiento.

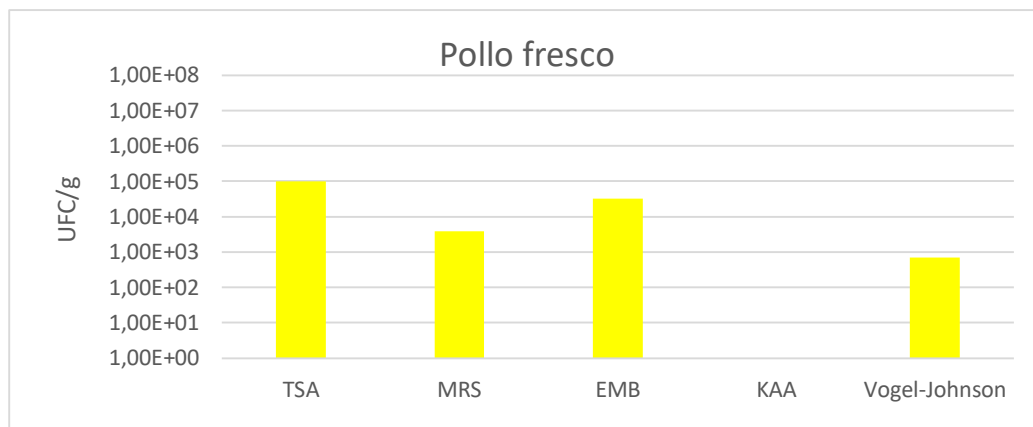


Figura 9. Gráfica del recuento medio en pollo fresco.

4.4 Pollo procesado.

Medio cultivo	UFC/g	Colonia	Visu tinción	Catalasa
TSA	$1,73 \times 10^7$			
MRS	$1,9 \times 10^5$	Blanca	Levadura	
EMB	$3,38 \times 10^4$	Rosa	Cocobacilos Gram -	+
		Naranja	Cocobacilos Gram -	+
		Morada punto negro	Cocobacilos Gram -	+
KAA	$1,5 \times 10^3$	Negra	Enterococos Gram +	-
Vogel-Johnson	$2,11 \times 10^4$	Negra	Bacilos	+
		Gris	Estafilos	+

Tabla 7. Recuento de microorganismos en pollo procesado.

En el pollo procesado observamos (tabla 7) que el recuento de mesófilos totales en TSA, medio no selectivo, es de $1,73 \times 10^7$. El mayor valor de UFC/g en medios

selectivos se da en el MRS, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias del ácido láctico, con un valor de $1,9 \times 10^5$; seguido por el medio selectivo EMB, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de enterobacterias, con un valor de $3,38 \times 10^4$; seguido por el medio selectivo Vogel-Johnson, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estafilococos, con un valor de $2,11 \times 10^4$ y por último el medio selectivo KAA, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estreptococos, con un valor de $1,5 \times 10^3$.

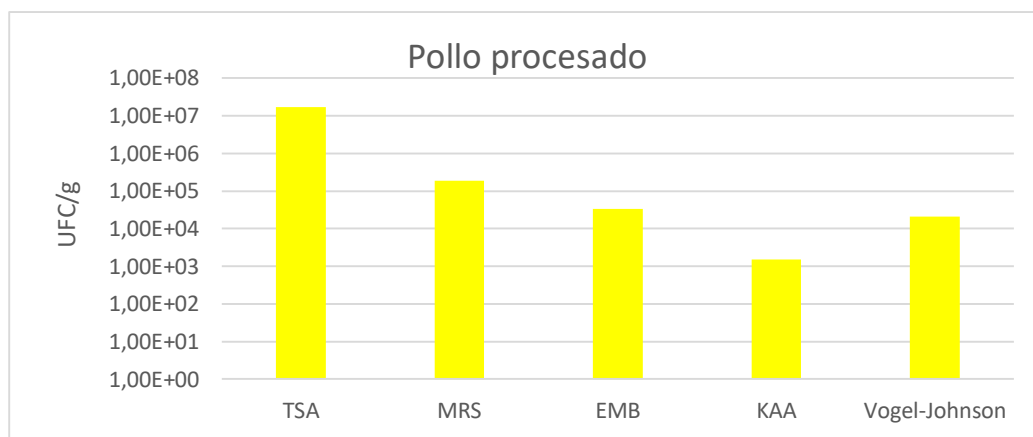


Figura 10. Gráfica del recuento medio en pollo procesado.

4.5 Pavo fresco.

Medio cultivo	UFC/g	Colonia	Visu tinción	Catalasa
TSA	$2,05 \times 10^7$			
MRS	6×10^4	Blanca	Levaduras	
EMB	$1,04 \times 10^5$	Rosa	Cocobacilos	+
		Rosa punto negro	Bacilos Gram -	+
		Amarillo	Bacilos Gram -	+
		Marrón	Cocobacilos	+
KAA	5×10^2	Blanca	Enterococos	-
Vogel-Johnson	2×10^2	Negra	Cocos Gram +	+

Tabla 8. Recuento de microorganismos en pavo fresco.

En el pavo fresco observamos (tabla 8) que el recuento de mesófilos totales en TSA, medio no selectivo, es de $2,05 \times 10^7$. El mayor valor de UFC/g en medios selectivos se da en el EMB, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de enterobacterias, con un valor de $1,04 \times 10^5$; seguido por el medio selectivo MRS, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias del ácido láctico, con un valor de 6×10^4 ; seguido por el medio selectivo KAA, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estreptococos, con un valor de 5×10^2 y por último el medio selectivo Vogel-Johnson, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estafilococos, con un valor de 2×10^2 .

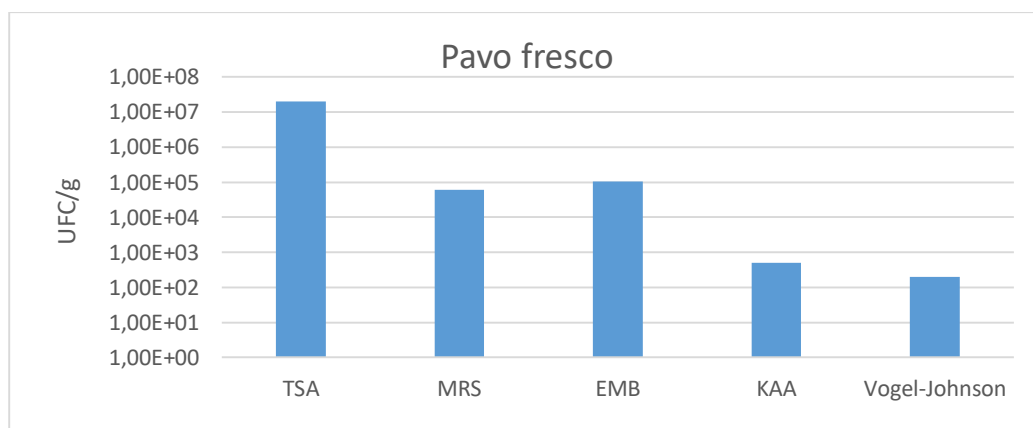


Figura 11. Gráfica del recuento medio en pavo fresco.

4.6 Pavo procesado.

Medio cultivo	UFC/g	Colonia	Visu tinción	Catalasa
TSA	$2,5 \times 10^7$			
MRS	$5,95 \times 10^5$	Blanca	Levadura	
EMB	$5,7 \times 10^4$	Rosa	Cocobacilos Gram -	+
		Rosa punto morado	Cocobacilos Gram -	+
		Marrón	Bacilos Gram -	+
		Marrón punto marrón	Cocobacilos Gram -	+

KAA	$1,76 \times 10^5$	Negro	Enterococos	+
Vogel-Johnson	$2,38 \times 10^4$	Negra	Estafilococos Gram +	+
		Blanca	Levaduras	+
		Gris	Estafilo	+

Tabla 9. Recuento de microorganismos en pavo procesado.

En el pavo procesado observamos (tabla 9) que el recuento de mesófilos totales en TSA, medio no selectivo, es de $2,5 \times 10^7$. El mayor valor de UFC/g en medios selectivos se da en el MRS, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias del ácido láctico, con un valor de $5,95 \times 10^5$; seguido por el medio selectivo KAA, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estreptococos, con un valor de $1,76 \times 10^5$; seguido por el medio selectivo EMB, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de enterobacterias, con un valor de $5,7 \times 10^4$ y por último el medio selectivo Vogel-Johnson, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estafilococos, con un valor de $2,38 \times 10^4$.

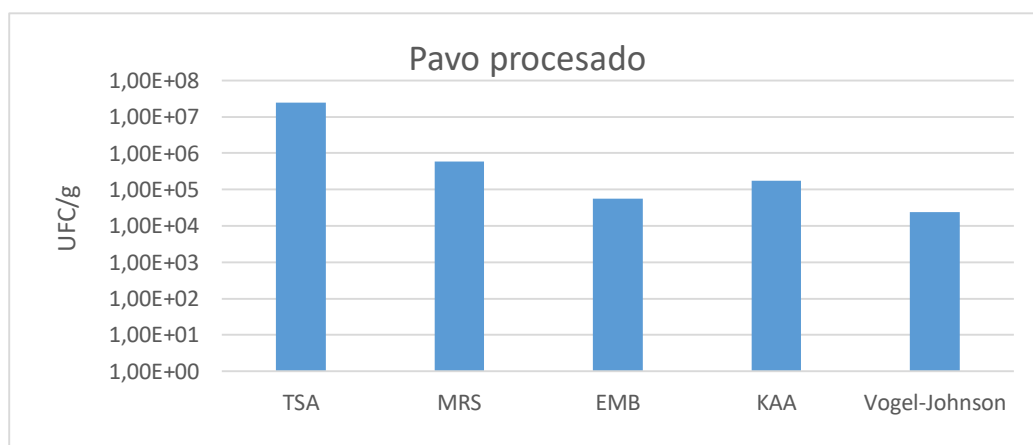


Figura 12. Gráfica del recuento medio en pavo procesado.

4.7 Ternera fresca.

Medio cultivo	UFC/g	Colonia	Visu tinción	Catalasa
TSA	$1,5 \times 10^5$			
MRS	$2,89 \times 10^5$	Blanca	Lactobacilos	

EMB	2×10^4	Rosa	Cocobacilos	+
KAA	$1,1 \times 10^3$	Negra	Enterococos Gram +	-
Vogel-Johnson	$1,6 \times 10^3$	Negra	Estafilos	+
		Blanca	Levadura	+

Tabla 10. Recuento de microorganismos en ternera fresca

En la ternera fresca observamos (tabla 10) que el recuento de mesófilos totales en TSA, medio no selectivo, es de $1,5 \times 10^5$. El mayor valor de UFC/g en medios selectivos se da en el MRS, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias del ácido láctico, con un valor de $2,89 \times 10^5$; seguido por el medio selectivo EMB, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de enterobacterias, con un valor de 2×10^4 ; seguido por el medio selectivo Vogel-Johnson, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estafilococos, con un valor de $1,6 \times 10^3$ y por último el medio selectivo KAA, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estreptococos, con un valor de $1,1 \times 10^3$.

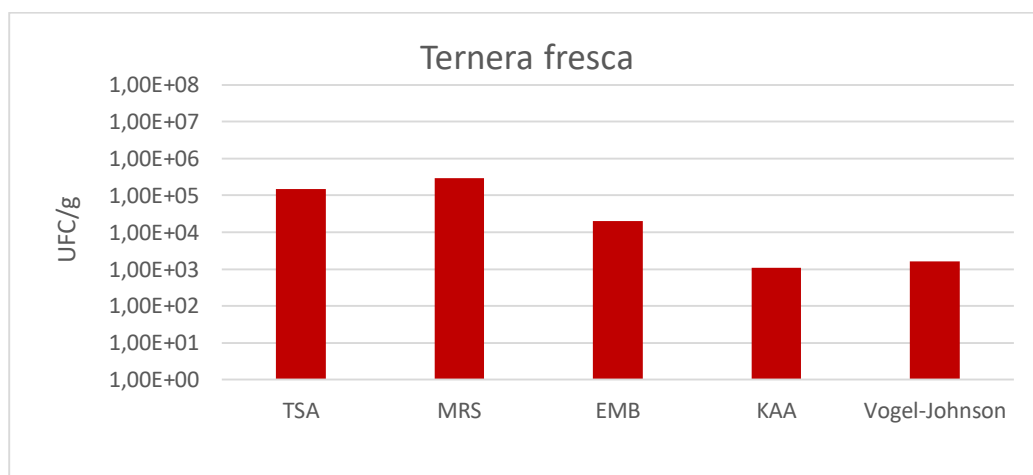


Figura 13. Gráfica del recuento medio en ternera fresca.

4.8 Ternera procesada.

Medio cultivo	UFC/g	Colonia	Visu tinción	Catalasa
TSA	$2,1 \times 10^6$			

MRS	$1,77 \times 10^4$	Blanca	Levadura	
		Naranja	Levadura	
EMB	4×10^4	Rosa	Cocobacilos	+
		Rosa punto negro	Bacilos Gram -	+
		Naranja punto negro	Cocobacilos	+
		Negra verdosa	Bacilos Gram -	+
KAA	Debajo del límite de detección			
Vogel-Johnson	8×10^2	Negra	Estafilococos Gram +	+
		Blanca	Levadura	+
		Gris	Levadura	+

Tabla 11. Recuento de microorganismos en ternera procesado.

En la ternera procesada observamos (tabla 11) que el recuento de mesófilos totales en TSA, medio no selectivo, es de $2,1 \times 10^6$. El mayor valor de UFC/g en medios selectivos se da en el EMB, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de enterobacterias, con un valor de 4×10^4 ; seguido por el medio selectivo MRS, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias del ácido láctico, con un valor de $1,77 \times 10^4$ y por último el medio selectivo Vogel-Johnson, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estafilococos, con un valor de 8×10^2 . En el medio selectivo KAA, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estreptococos, no se ha dado crecimiento.

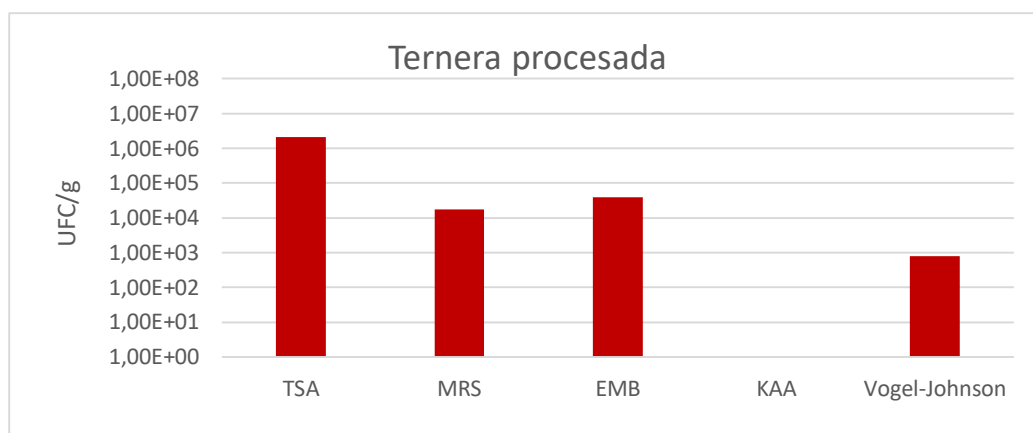


Figura 14. Gráfica del recuento medio en ternera procesada.

4.9 Cordero fresco.

Medio cultivo	UFC/g	Colonia	Visu tinción	Catalasa
TSA	8×10^5			
MRS	$6,4 \times 10^3$	Blanca	Levaduras	+
		Naranja	Levaduras	+
EMB	$3,19 \times 10^4$	Rosa	Cocobacilos Gram -	+
		Morada	Cocobacilos	+
		Rosa punto negro	Cocobacilos Gram -	+
		Negro	Cocobacilos	+
KAA	Debajo del límite de detección			
Vogel-Johnson	$1,5 \times 10^3$	Negra	Levaduras	+
		Blanca	Estafilos	-

Tabla 12. Recuento de microorganismos en cordero fresco

En el cordero fresco observamos (tabla 12) que el recuento de mesófilos totales en TSA, medio no selectivo, es de 8×10^5 . El mayor valor de UFC/g en medios selectivos se da en el EMB, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de enterobacterias, con un valor de $3,19 \times 10^4$; seguido por el medio selectivo MRS, que

se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias del ácido láctico, con un valor de $6,4 \times 10^3$ y por último el medio selectivo Vogel-Johnson, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estafilococos, con un valor de $1,5 \times 10^3$. En el medio selectivo KAA, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estreptococos, no se ha dado crecimiento.

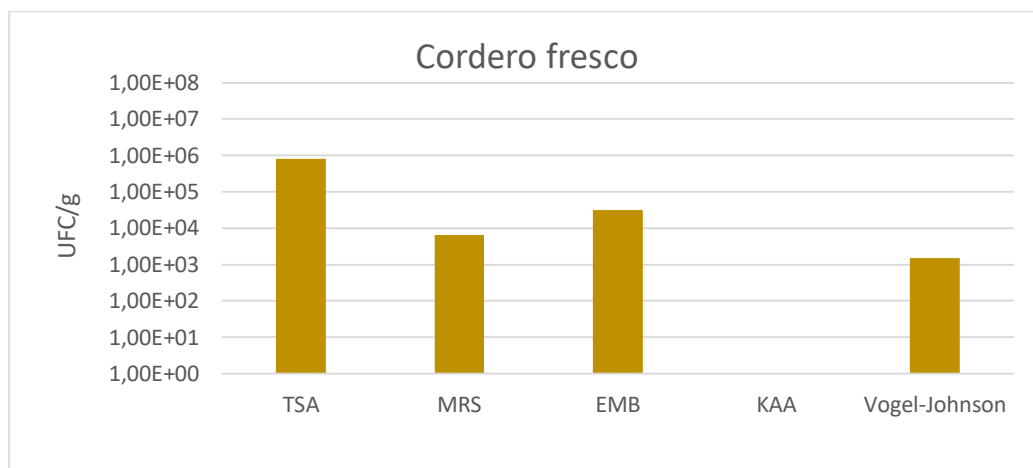


Figura 15. Gráfica del recuento medio en cordero fresco.

4.10 Cordero procesada.

Medio cultivo	UFC/g	Colonia	Visu tinción	Catalasa
TSA	$1,27 \times 10^6$			
MRS	$2,35 \times 10^4$	Blanca	Levadura	
EMB	2×10^2	Rosa	Bacilos Gram -	+
		Rojo	Bacilos Gram -	-
KAA	Debajo del límite de detección			
Vogel-Johnson	5×10^2	Negra	Estafilos	+

Tabla 13. Recuento de microorganismos en cordero procesado.

En el cordero procesado observamos (tabla 13) que el recuento de mesófilos totales en TSA, medio no selectivo, es de $1,27 \times 10^6$. El mayor valor de UFC/g en medios

selectivos se da en el MRS, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias del ácido láctico, con un valor de $2,35 \times 10^4$; seguido por el medio selectivo Vogel-Johnson, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estafilococos, con un valor de 5×10^2 y por último el medio selectivo EMB, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de enterobacterias, con un valor de 2×10^2 . En el medio selectivo KAA, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estreptococos, no se ha dado crecimiento.

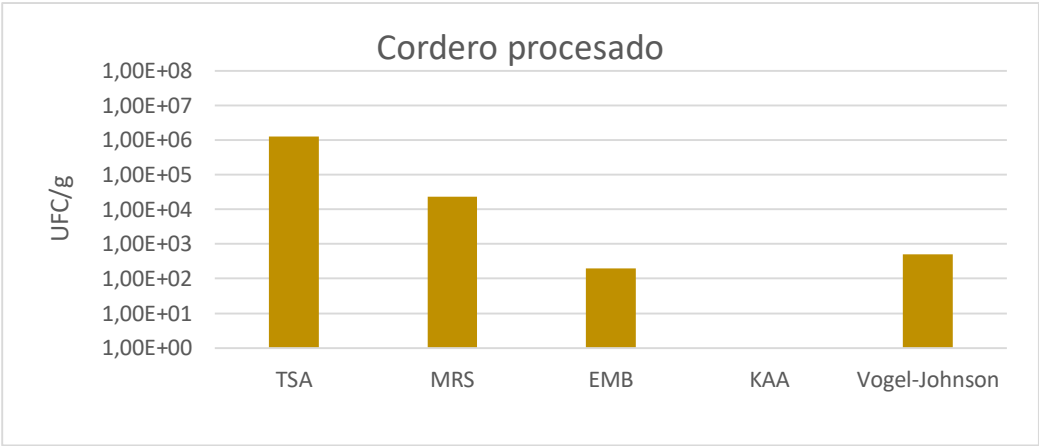


Figura 16. Gráfica del recuento medio en cordero procesado.

5. COMPARATIVA ENTRE CARNES FRESCAS Y PROCESADAS DEL MISMO ORIGEN.

Procederemos a la comparativa entre las diferentes carnes en crudo y procesadas procedentes del mismo animal.

5. 1 Cerdo.

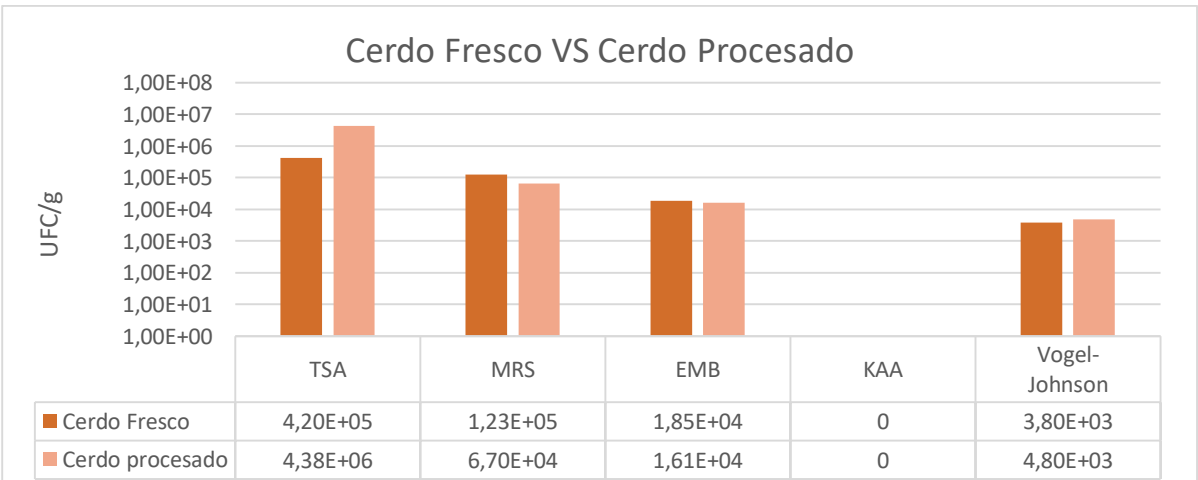


Figura 17. Gráfica comparativa cerdo.

En la tabla de comparativa de carnes procedentes de cerdo observamos (tabla 17) que el recuento en MRS, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias del ácido láctico; y EMB, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de enterobacterias, es mayor en carne fresca que en carne procesada, mientras que en TSA, medio no selectivo para mesófilos totales y Vogel-Johnson, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estafilococos, es mayor en carne procesada que en carne fresca. En KAA, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estreptococos, no se ha dado crecimiento para ninguna de las dos muestras.

5. 2 Pollo.

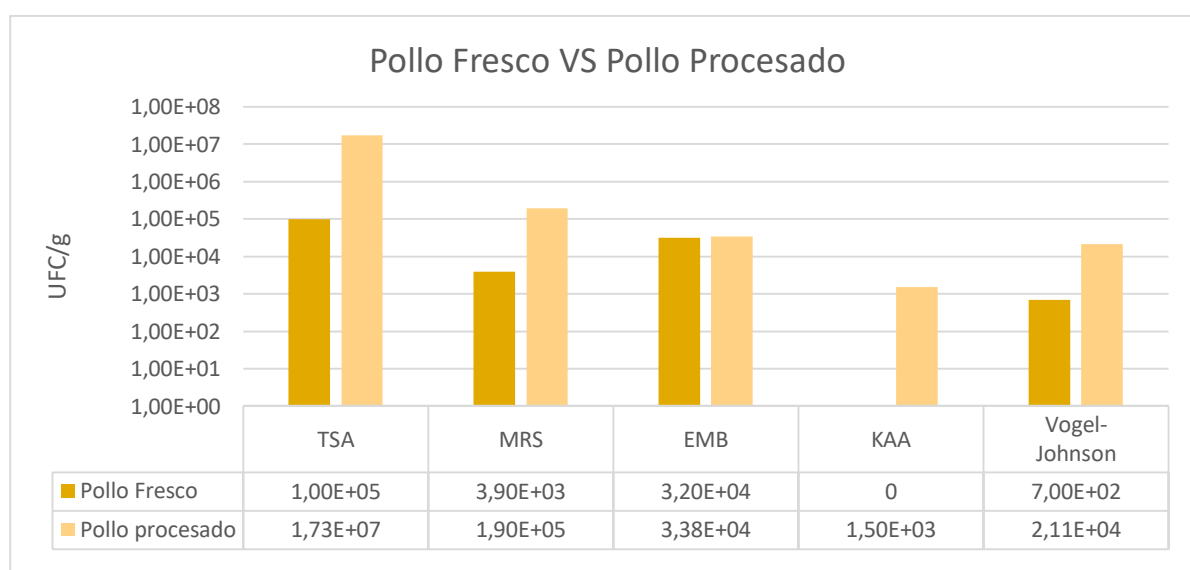


Figura 18. Gráfica comparativa pollo.

En la tabla de comparativa de carnes procedentes de pollo observamos (tabla 18) que el recuento de mesófilos totales en TSA, medio no selectivo; MRS, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias del ácido láctico; EMB, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de enterobacterias; KAA, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estreptococos y Vogel-Johnson, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estafilococos, es mayor en la carne procesada que en carne fresca.

5.3 Pavo.

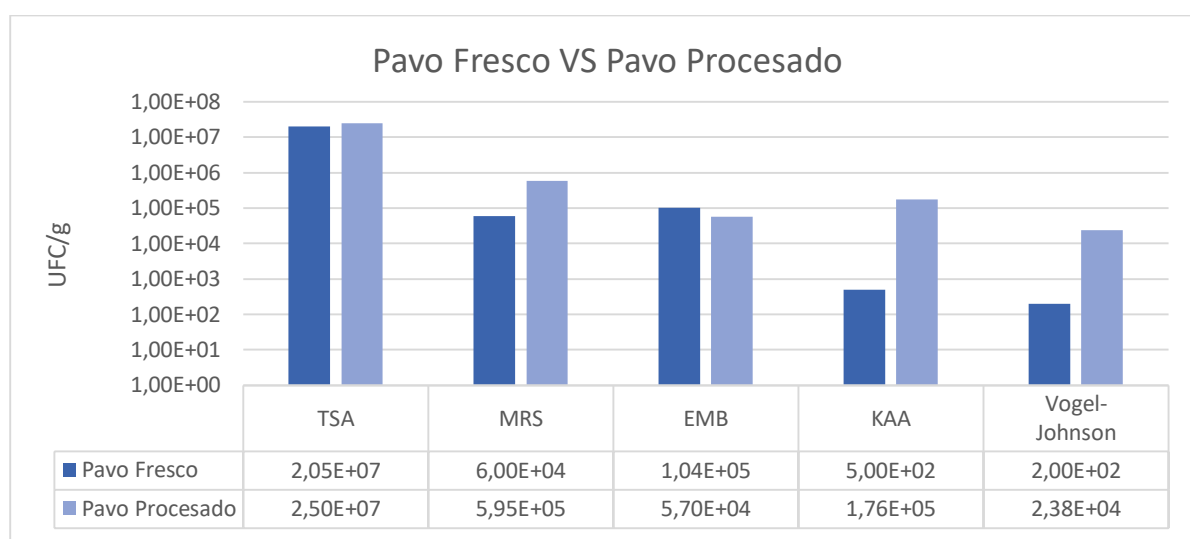


Figura 19. Gráfica comparativa pavo.

En la tabla de comparativa de carnes procedentes de pavo observamos (tabla 19) que el recuento en EMB, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de enterobacterias, es mayor en carne fresca que en carne procesada. Mientras que en TSA, medio no selectivo para recuento de mesófilos totales; MRS, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias del ácido láctico; KAA, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estreptococos y Vogel-Johnson, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estafilococos, es mayor en la carne procesada que en carne fresca.

5.4 Ternera.

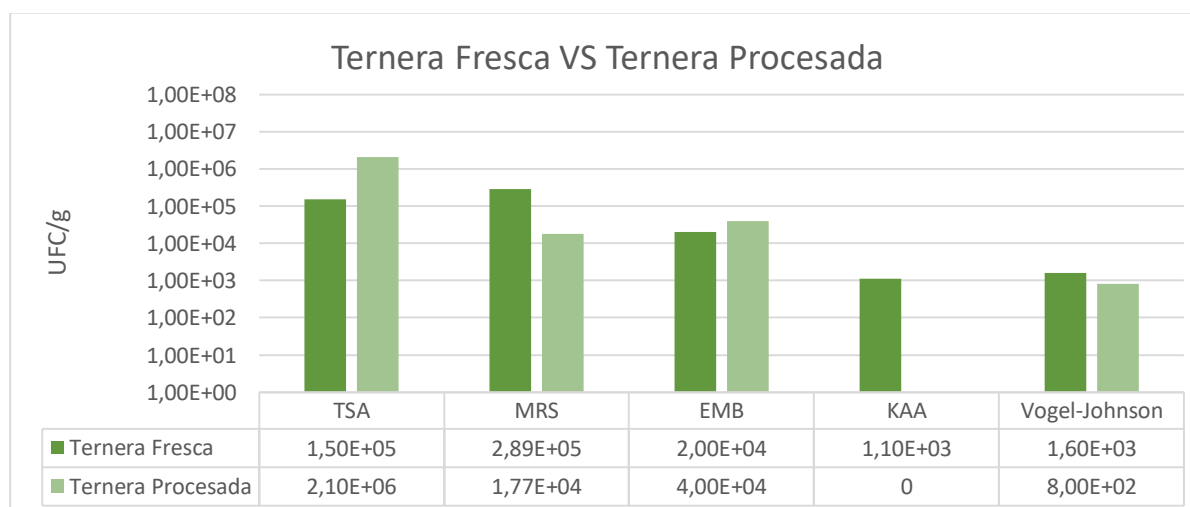


Figura 20. Gráfica comparativa ternera.

En la tabla de comparativa de carnes procedentes de ternera observamos (tabla 20) que el recuento en MRS, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias del ácido láctico; y Vogel-Johnson, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estafilococos, es mayor en carne fresca que en carne procesada, mientras que en TSA, medio no selectivo para recuento de mesófilos totales; EMB, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de enterobacterias y KAA, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estreptococos, es mayor en carne procesada que en carne fresca.

5.5 Cordero.

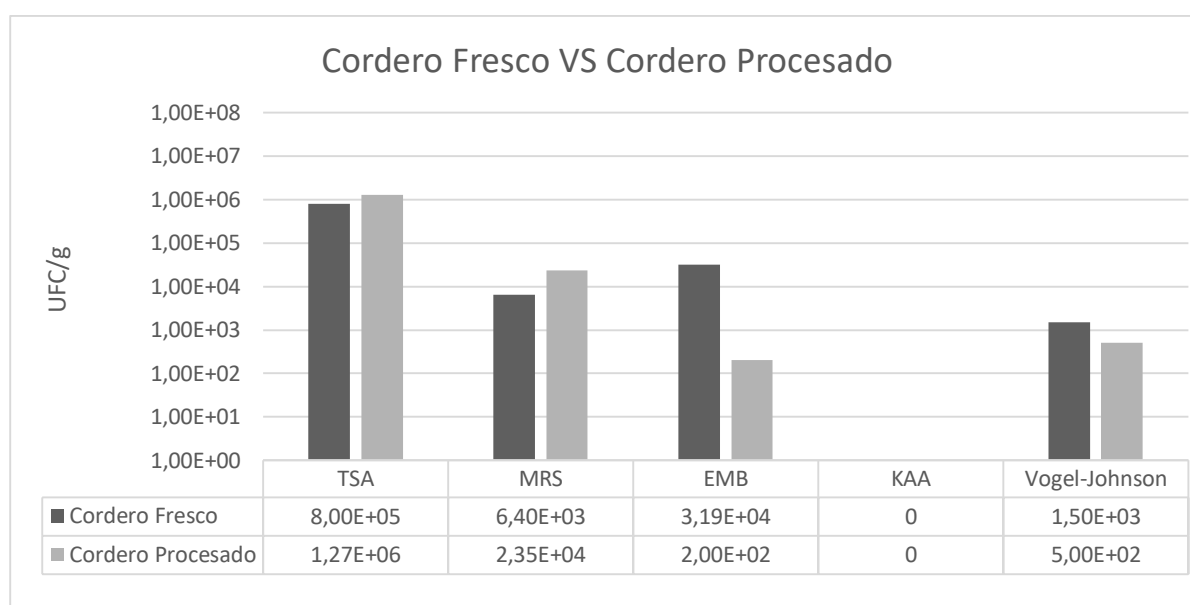


Figura 21. Gráfica comparativa cordero.

En la tabla de comparativa de carnes procedentes de cordero observamos (tabla 21) que el recuento en EMB, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de enterobacterias y Vogel-Johnson, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estafilococos, es mayor en carne fresca que en carne procesada, mientras que en TSA, medio no selectivo para recuento de mesófilos totales y MRS, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias del ácido láctico, es mayor en carne procesada que en carne fresca. En KAA, que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de estreptococos, no se ha dado crecimiento para ninguna de las dos muestras.

6. DISCUSIÓN.

Una vez expuestos los resultados procedemos a la discusión de los mismos.

En la carne de cerdo encontramos bacterias del ácido láctico, las cuales sirven como protección a la descomposición de la carne por enterobacterias (Marcelo Signorini, 2007). Por tanto, podemos explicar que sean las que se encuentran en mayor cantidad en medios selectivos.

Las bacterias patógenas más comunes de la carne de cerdo son *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, y *Y. enterocolitica* (Self et al, 2017). *Salmonella* y *Yersinia* son enterobacterias, las enterobacterias poseen el segundo mayor recuento en placa, mientras que los *Staphylococcus* ocupan el tercer lugar de los recuentos de los medios selectivos. En la carne de cerdo procesada la carga microbiana es mayor que en carne fresca, esto puede deberse a la manipulación sufrida por la misma.

En la carne de pollo encontramos bacterias patógenas como *Salmonella*, *Campylobacter* y *Listeria monocytógenes*. (Pérez Arnedo, 2015). La contaminación por *Salmonella* se debe a una incorrecta desinfección o limpieza en las explotaciones avícolas y en los mataderos (EFSA, 2010). *Salmonella* crece junto a otras enterobacterias, estas han sido las que mayor recuento han dado en medios selectivos. La carga microbiana es mayor en carne procesada que en carne fresca, en muchas ocasiones se debe a la falta de limpieza de las máquinas o utensilios para el procesamiento de carne combinado con su gran manipulación.

La carne de pavo comparte muchas similitudes con la carne de pollo ya que las dos especies son aves de corral y crecen en granjas avícolas muy parecidas en igualdad de condiciones, la carga microbiana es mayor en carne procesada que en carne fresca también debida a su alta manipulación.

En la carne de ternera encontramos como principales patógenos, *Salmonella* y *E. coli*, además de *Listeria*, *Campylobacter*, *C.perfringens* y *Clostridium*. (Koohmaraie et al, 2005). Al igual que en la carne de cerdo, las bacterias del ácido láctico son las que poseen el recuento total más elevado. La carga microbiana es mayor en carne procesada que en carne fresca, pero en este caso en la carne procesada hay menos bacterias del ácido láctico y más enterobacterias que en la carne fresca, el motivo de

este hecho puede deberse a que la presencia de bacterias del ácido láctico es inversamente proporcional a la presencia de enterobacterias (Flores-Rondón, 2011)

En la carne de cordero encontramos como principales patógenos a *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. (Al-Sheddyla, 1995). Las enterobacterias son las que más valor de carga microbiana han dado. La carga microbiana es mayor en carne procesada que en carne fresca, pero en este caso en la carne procesada hay más bacterias del ácido láctico y menos enterobacterias que en la carne fresca, esto puede deberse a que mientras más bacterias del ácido láctico haya, más se inhibe el crecimiento de enterobacterias (Flores-Rondón, 2011).

Según el reglamento (CE) N° 2073/2005, las UFC/g para mesófilos totales de las canales ovinas, bovinas, caprinas y equinas después de su faenado, pero antes del enfriamiento, deben de tener un valor mínimo de 3×10^3 UFC/g de media diaria y un máximo de 1×10^5 UFC/g. Los resultados para este experimento son insatisfactorios pues superan este máximo valor, y esto puede deberse a falta de higiene durante el sacrificio o bien, durante su llegada hasta el consumidor. Las UFC/g para enterobacterias para estas mismas canales posee un mínimo de 30 UFC/g y un máximo de 350 UFC/g, en este caso los resultados de nuestro experimento también son insatisfactorios puesto que superan el valor máximo, los motivos pueden ser los mismos que los mencionados anteriormente.

Las UFC/g para mesófilos totales de las canales porcinas después de su faenado, pero antes del enfriamiento, deben de tener un valor mínimo de 1×10^4 UFC/g de media diaria y un máximo de 1×10^5 UFC/g. Los resultados para este experimento son insatisfactorios pues supera este máximo valor, y esto puede deberse a falta de higiene durante el sacrificio o bien, durante su llegada hasta el consumidor. Las UFC/g para enterobacterias para esta misma canal posee un mínimo de 100 UFC/g y un máximo de 1000 UFC/g, en este caso los resultados de nuestro experimento también son insatisfactorios puesto el valor de UFC/g = $1,85 \times 10^4$ superan el valor máximo, los motivos pueden ser los mismos que los mencionados anteriormente.

Las UFC/g para mesófilos totales en carne picada deben de tener un valor mínimo de 5×10^5 UFC/g de media diaria y un máximo de 5×10^6 UFC/g. Los resultados para las dos carnes picadas (de ternera y de pavo) son:

Para la carne de ternera es aceptable, el valor de UFC/g se encuentra entre el valor mínimo y el máximo.

Para la carne de pavo es insatisfactorio, puesto que el valor supera el valor máximo, esto puede ser consecuencia de falta de higiene durante la producción o hasta que ha llegado a mano del consumidor.

7. CONCLUSIONES.

Las conclusiones a las que podemos llegar después de este estudio son las siguientes:

1. En los productos procesados encontramos mayor carga microbiológica total que en los productos frescos, esto se deberá a que, durante su procesado, se produce una alta manipulación que repercute en un aumento la carga microbiológica. Por tanto, en el objetivo “Análisis microbiológico de carnes frescas y procesadas procedentes del mismo origen para poder comparar en que producto se observa una mayor carga de microorganismos patógenos”, se ha demostrado que existe diferencia y que en los productos procesados hay mayor carga microbiológica total que en los productos frescos.
2. En el objetivo de “Analizar microbiológicamente carnes de cerdo, pollo, pavo, ternera y cordero, para compararlas entre sí y observar cuál de ellas tiene más carga de microorganismos patógenos” hemos demostrado que la carne que más carga microbiana total tiene es la carne de pavo, seguida de la carne de pollo, carne de cerdo, carne de ternera y por último la carne de cordero.
3. En el objetivo de “Análisis microbiológico comparativo de carnes frescas y procesadas procedentes de distintos animales, con el fin de comprobar si el origen de la carne afecta a la mayor o menos presencia de microorganismos patógenos” hemos demostrado que la carne con mayor carga microbiana total es la carne de pavo procesada, en este caso, carne de pavo picada y el que menos carga microbiana total posee es la pechuga de pollo fresca.
4. En las aves de corral, pollo y pavo, encontramos los valores más altos de estreptococos en carnes procesadas, esto puede deberse a que la maquinaria con la que se trató, estuviese contaminada por falta de higiene y/o algún descuido, o simplemente que el proceso altera la carga microbiológica total.

5. Un aumento de bacterias del ácido láctico en placa de MRS, significa un descenso en las enterobacterias en placa de EMB dentro de cada grupo de carne, y viceversa.
6. Durante el faenado de las canales, o bien desde los procesos y transformaciones de la carne hasta su llegada al consumidor han debido de acontecer una serie de errores por los cuales algunas carnes son insatisfactorias puesto que no cumple los criterios expuestos por el reglamento (CE) N° 2073/2005, salvo la carne de ternera que si ha tenido resultados aceptables.

8. BIBLIOGRAFÍA.

- Aguilar Morales, J. (2012). Métodos de conservación de alimentos. México. Red Tercer Milenio S.C.
- al-Sheddy, I.A., Fung, D.Y., and Kastner, C.L. (1995). Microbiology of Fresh and Restructured Lamb Meat: A Review. *Critical Reviews in Microbiology*. 21(1): 31-52.
- Mejia, D. B., Peñuela-S, L. M., and Sanmiguel, R. A. (2018). El gran impacto de *Clostridium perfringens* en aves de corral. *Pubvet*. 12(9): 1–9.
- Cervantes-García, E., García-González, R., and Salazar-Schettino, P.M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*. 61(1): 28-40.
- CULTIMED (1992). Manual Básico de Microbiología. Recomendaciones generales. pp: 1–545.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2010). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008. Part B: Analysis of factors associated with *Campylobacter* colonisation of broiler batches and with *Campylobacter* contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples. *The EFSA Journal* 8:1602.
- FAO (2015). División de Producción y Sanidad Animal
- FAO (2016). Manipuladores de Alimentos, Gobierno de Cantabria.
- Flores-Rondón, C., Leal, M., Ruiz-Ramírez, J., Sánchez, E., Moreno, M., Castro, G., and Barboza, Y. (2011). Tiempo de almacenamiento e identificación

de bacterias ácido lácticas en carnes de res picada empacadas al vacío. Revista Científica, [en línea] XXI(5): 425-433.

- Guadalupe Rodríguez-Angeles, M. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Publica de Mexico. 44(5): 464–475.
- Koohmaraie, M., Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Guerini, M., Shackelford, S.D., and Wheeler, T.L. (2005). Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. Meat Science 71: 79-91
- León Bonillo, M. and Ramírez Juidías, E. (2004). Higiene Y Manipulación De Alimentos Como Factores De La Prevención En La Calidad Agroalimentaria. I Congreso Nacional de calidad alimentaria.
- Martín Cerdeño, V. J. (2019). Consumo y gasto en carne de pollo. 2.
- Muñoz Pérez del Pulgar, A. (2006). Optimización de la producción de la enterocina AS-48 y ensayo de su eficacia como bioconservador de los alimentos. Tesis doctoral.
- Parra, M., Durango, J. and Máttar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. Mvz-Córdoba. 7(2): 187–200.
- Pastor, R. (2017). Manipulacion-De-Carne-Pescados-Y-Productos Congelados.
- Pérez Pérez, H., Rubio, C., Pozuelo, MR., Revert, C., and Hardisson, A. (2003). Botulismo y toxina botulínica. Revista de Toxicología. 20(1): 8–12.
- Rodríguez Fernández, O., Sanchén Casas, A., Hernández Cisnero, R., and Cordero Rodríguez, M. (2007). Yersinia enterolítica. Reporte de dos casos con enfermedad diarreica aguda. Revista Archivo Médico de Camagüey. AMC.11(2)
- Sanchez-Escalante, A. (2008). Sistemas combinados de conservación para prolongar la vida útil de la carne y los productos cárnicos. Nacameh. 2: 124–159.
- Sánchez, J., Correa, M. and Castañeda-Sandoval, L.M. (2016). *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. Revista Facultad Nacional de Salud Pública. 34(2).

- Self, J., Luna-Gierke. R., Fothergill, A., Holt, K.G., and Vieira, A.R. (2017). Outbreaks attributed to pork in the United States, 1998-2015, *Epidemiology and Infection*. 145(14): 2980–2990.
- Suárez, R. (2001). Conservación de alimentos por irradiación. *Invenio*. Junio. pp: 85–124.
- Suárez Pita, M. (2002). Tendencia Actual Del *Estreptococo* Como Indicador De Contaminación Fecal, *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 40(1): 38–43.
- Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, M. (2007). *Nacameh*. 1(1): 26–40.
- Velazquez, G., Vázquez, P., Vázquez, M., and Torres, J.A. (2005). Aplicaciones del procesado de alimentos por alta presión, *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. 4(5): 343–352.

Normativa consultada.

- Real decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español. «BOE» núm. 248, de 17 de octubre de 1967, páginas 14180 a 14187 (8 págs.)
- Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos. «BOE» núm. 147, de 18 de junio de 2014, páginas 46058 a 46078 (21 págs.)
- Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Página web consultada.

- <https://www.zonadiet.com/> - Sección de tablas. Consultada el 15 de abril.
- www.scharlab.com - Consultada el 28 de abril.