



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis Microbiológico de alimentos cárnicos procesados

Rosa Pancorbo Parras

Jaén, Julio, 2015



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis Microbiológico de alimentos cárnicos procesados

Rosa Pancorbo Parras

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser la del autor, Rosa Pancorbo Parras.

Jaén, Julio, 2015

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	4
2. ABSTRACT.....	4
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1 Importancia de la conservación de los productos cárnicos.....	5
3.2 Posibles vías y causas de contaminación de alimentos cárnicos.....	6
3.3 Mecanismos para la eliminación de microorganismos en cárnicos.....	9
3.4 Microorganismos contaminantes en carnes.....	12
3.5 Identificación de bacterias contaminantes en productos cárnicos.....	18
4. OBJETIVOS.....	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1 Material necesario.....	22
5.2 Medios de cultivo.....	23
5.3 Preparación del material.....	27
5.4 Procesado de alimentos.....	28
5.5 Identificación preliminar de colonias.....	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
7. CONCLUSIONES.....	46
8. BIBLIOGRAFÍA.....	47

1. RESUMEN

Los alimentos cárnicos procesados requieren un estricto control a lo largo de toda la cadena alimentaria para evitar posibles contaminaciones, ya que suponen un medio de cultivo óptimo para el desarrollo de patógenos microbianos. En este estudio se llevó a cabo la estimación de la carga microbiana e identificación preliminar de las cepas aisladas de dos lotes de alimentos cárnicos procesados, obtenidos en el mismo establecimiento en dos tiempos diferentes. También se evaluó la influencia del envasado en la carga y diversidad microbiana obtenidas en los alimentos analizados. De acuerdo con nuestros resultados, los alimentos no envasados presentan una carga microbiana significativamente superior a los envasados y se observan también diferencias significativas en los recuentos bacterianos de alimentos obtenidos en tiempos diferentes en el mismo establecimiento.

2. ABSTRACT

Microbial pathogens can easily grow on processed meat, so this food must be closely monitored along the food chain to avoid foodborne infections. This study was conducted to estimate the microbial content of two batches of processed meat, obtained from the same food store within two weeks. We have also estimated the influence of food packaging on the microbial content and diversity found in samples from processed meat. According to our results, higher microbial counts are found in unpacked samples compared to packed ones. Significant differences were also detected in meat samples obtained at different times in the same food store.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Importancia de la conservación los productos cárnicos

La carne de los animales constituye uno de los pilares básicos de la alimentación humana, por su alto valor nutritivo, debido a su riqueza proteica.

Pero también constituye uno de los alimentos más perecederos. Debido a sus características de composición y pH, constituye un medio muy favorable para el desarrollo de la mayor parte de las contaminaciones microbianas.

La profundidad del músculo de un animal recién sacrificado contiene una flora muy escasa. Esta proviene, generalmente, del intestino y es transportada al músculo por la sangre.

La parte superficial de la carne, especialmente en la canal, está mucho más contaminada por una flora muy diversa, que depende de las condiciones higiénicas de manipulación, así como del ambiente del matadero.

La contaminación de la carne comienza durante el sacrificio del animal, continúa en otras dependencias del matadero y lugares de venta, para terminar en el hogar del consumidor (Pascual and Calderón, 2000).

Es bien conocido que uno de los factores decisivos en la vida útil de un alimento es su tasa microbiana inicial. Cuanto más elevada, más corta es la vida útil (Borges *et al.*, 1999).

La ingeniería alimentaria ha desarrollado nuevas metodologías y tecnologías con el objetivo de mejorar la conservación de los alimentos y alargar su vida útil, garantizando la seguridad y la calidad de estos. A pesar de los tratamientos térmicos y la esterilización, siguen siendo los métodos de conservación los más utilizados para mejorar la vida útil de los alimentos sin dañar sus propiedades. El dióxido de carbono (CO₂) es un gas empleado en el envasado de numerosos productos alimentarios, generalmente combinado con otros gases como oxígeno y/o nitrógeno, gracias a sus propiedades bacteriostáticas (Al-Nehlawi *et al.*, 2014).

3.2 Posibles vías y causas de contaminación de alimentos cárnicos

Los alimentos son fácilmente colonizados (contaminados), ya sea de forma natural, en origen o durante el procesamiento y manipulación. La multiplicación de los microorganismos en el alimento puede implicar desde una alteración inapreciable hasta su deterioro completo y puede ser, en cualquier caso, una vía de transmisión de enfermedades.

Los microorganismos se encuentran presentes en todos los ambientes: aire, agua, superficie de objetos e incluso sobre nuestra piel.

El aire, además de partículas en suspensión, es portador de bacterias y esporas. Por ello puede ser causa tanto de contaminación de alimentos y superficies como de infecciones en el hombre.

Para llevar a cabo una correcta manipulación de los alimentos, es necesario mantener una limpieza adecuada tanto en las superficies como en los utensilios de trabajo. A no ser que los alimentos hayan sido esterilizados, todos los productos contienen microorganismos.

El alimento puede estar contaminado en su origen o bien puede ser el manipulador quien lo contamine durante el procesado. (Gamazo C. *et al*; 2005)

Por tanto, las vías de contaminación de la carne más frecuentes son:

1. Animal:

- Piel (*Micrococcus*, *Pseudomonas* y otros Gram negativos, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*)
- Contenido intestinal (coliformes, *Escherichiacoli*, *Clostridium*, *Streptococcus* y a veces, *Salmonella*)

2. Matadero:

- Mala salud de los manipuladores
- Falta de higiene de los manipuladores
- Contaminación de los instrumentos y espacios utilizados en el matadero
- Insectos y roedores

3. Otras fuentes:

Durante el almacenamiento, transporte y manipulación posterior hay gérmenes del suelo, aire, agua (*Pseudomonas*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, y a veces, *Clostridium botulinum*, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Cladosporium*, *Sporotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, levaduras etc.) que también pueden pasar al alimento.

La carne además de contaminarse con bacterias, puede contener parásitos helmintos (cestodos y nematodos) y protozoarios, pero estos microorganismos no han sido objeto de estudio durante este proyecto.

Hay varias enfermedades humanas que se pueden transmitir por la carne: salmonelosis (*Salmonella*), brucelosis (*Brucella*), carbunco (*Bacillus anthracis*) etc. Puesto que la carne es un producto fácilmente alterable, resulta necesario que todas las manipulaciones posteriores al sacrificio se realicen en un ambiente refrigerado. La cadena de frío nunca debe ser interrumpida.

En el proceso de maduración de la carne se pueden producir alteraciones como consecuencia de su degradación, según sus caracteres fisicoquímicos, que son originados por microorganismos:

- Degradación por microorganismos aerobios
- Viscosidad: se manifiesta por la aparición de una capa viscosa, acompañada de un olor desagradable, cuando la tasa de gérmenes que causan la alteración sobrepasa la cifra de 10^7 gérmenes por centímetro cuadrado. Esta alteración es producida generalmente por microorganismos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, levaduras y mohos, que, al ser entre ellos gérmenes aerobios, psicotróficos e hidrófilos, ven favorecido su crecimiento en ambiente frío y húmedo.
- Decoloración: se debe a fenómenos de oxidación originados por levaduras y especies bacterianas de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*.
- Pigmentación: alteración originada por *Pseudomonas*, *Micrococcus*, levaduras y mohos principalmente.

- Enmohecimiento: se debe a la presencia de flora micótica variada.
- Enranciamiento: alteración de la grasa producida por *Pseudomonas*, levaduras y mohos.
- Decoloración verde: frecuentemente afecta a carnes almacenadas a temperaturas de refrigeración comprendidas entre 1 y 2 °C y baja tensión de oxígeno. En estas condiciones la decoloración tiene lugar al transformarse la mioglobina en sulfomioglobina, en presencia del SH₂ preformado por *Pseudomonasmephitica* cuando se multiplica sobre la carne.
- Lipólisis: producida por el desarrollo de gérmenes lipolíticos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Achromobacter*, levaduras y mohos. La hidrólisis de las grasas da lugar a la formación de compuestos químicos que producen olores particulares, por ejemplo, el ácido butírico.
- Olores y sabores anormales:
 - Olor y sabor agrio, por la producción de ácidos volátiles, al crecer bacterias y levaduras acidificantes
 - Sabor a rancio, por crecimiento de actinomicetos
 - Sabor a tierra, por crecimiento de actinomicetos
 - Sabor a humedad, por crecimiento de mohos
- Degradación por microorganismos anaerobios:
- Agriado: se debe a la presencia de ácidos volátiles y no volátiles, como consecuencia de:
 - a. La acción enzimática de la carne durante su maceración
 - b. Procesos de fermentación microbiana con formación de ácidos grasos y ácido láctico
 - c. Proteólisis microbiana cuyo origen no es la putrefacción. Intervienen en esta alteración: bacterias lácticas, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Clostridium*, principalmente
- Putrefacción: alteración que indica descomposición anaeróbica de las proteínas con formación de compuestos de olor nauseabundo (amoníaco, ácido sulfhídrico, indol etc.). Las carnes que presentan esta alteración están

repletas de gas, tienen un color gris-verdoso y despiden un olor desagradable. La alteración se presenta en carnes no refrigeradas o mal refrigeradas, puesto que las bacterias que las originan se inhiben a temperaturas inferiores a 20 °C. Las carnes con pH superior a 6,2 son las más afectadas. Las bacterias que intervienen principalmente son: *Proteus*, *Enterobacteriaceae* y *Clostridium*.

La carne puede transmitir a los consumidores microorganismos causantes de toxiinfecciones alimentarias, entre los que figuran *Salmonella spp.*, *Escherichiacolienterohemorrágico*, algunos serotipos de *Yersiniaenterocolítica*, *Campylobacterjejuni*, *Staphylococcusaureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridiumperfringens*, *Clostridiumbotulinum* y *Bacilluscereus*. Las carnes también pueden verse alteradas debido a una serie de microorganismos deteriorantes como, *Pseudomonasspp.*, *Shewanella*, *Enterobacteriaceae*, *Brochothrixthermosphacta*, bacterias lácticas, levaduras y mohos.

3.3 Mecanismos para la eliminación de microorganismos en alimentos cárnicos

La carne de los animales de abasto procede de varias especies animales (vacas, ovejas, cabras, pollos, ciervos, pavos, caballos, cerdos etc.) y es objeto de un importante comercio internacional.

La carne de los animales de abasto es fundamentalmente su músculo esquelético estriado. La carne, tal y como se define legalmente, incluye diversos órganos (despojos o productos de casquería).

Los animales proceden de explotaciones agrarias en donde algunos viven en pastizales y otros se crían en condiciones intensivas. La microflora del tracto intestinal y de las superficies externas de los animales varía con el sistema de explotación. Además, cuanto más tiempo permanecen los animales en los locales de espera del matadero, mayor será su contaminación externa y mayor su incidencia de salmonelas en el tracto intestinal (Anderson et al; 1961). Los animales pueden sacrificarse cuando son jóvenes o cuando tienen varios años. En los mataderos es donde se realiza el sacrificio, evisceramiento y lavado de la carne, enfriándose después.

Los microorganismos alterantes crecen rápidamente en la carne, por ello es un alimento muy perecedero. Por lo tanto, el comercio cárnico depende de los sistemas de conservación que controlan la flora alterante. Cuanto mayor sea el procesado y manipulación y también la distancia hasta el mercado, más necesaria será la conservación. Los sistemas de conservación más importantes son la refrigeración y la congelación, el tratamiento térmico (incluido el enlatado), el curado y la desecación.

Con la refrigeración se inhibe el desarrollo de la flora microbiana en general, excepto la psicrófila y algunos mohos y levaduras. La congelación puede destruir algunas bacterias o inhibir el crecimiento de otras. Durante la descongelación del producto, si es lenta, puede proliferar abundantemente la flora psicrófila que se ha mantenido inhibida cuando el alimento estaba congelado. Algunos patógenos, como especies del género *Salmonella*, son inhibidos a temperatura de congelación, pero sobreviven y se hacen, incluso, más resistentes (Pascual and Calderón, 2000).

Después del sacrificio del animal, se practica el recorte y el lavado para mejorar el aspecto de la carne y eliminar restos de sangre, serrín, huesos, pelo y tierra. El recorte elimina algunas bacterias contaminantes y el lavado elimina otras y redistribuye algunos microorganismos de unas regiones hacia otras. La eficacia del lavado depende de la temperatura, presión y volumen del agua. El lavado con agua a menos de 40-50 °C disminuye relativamente poco la contaminación bacteriana y sus resultados varían. Los recuentos de zonas muy contaminadas se reducen, mientras que no cambian los de las que presentan un nivel de contaminación inicial bajo (Kelly *et al.*, 1981). El aumento de la temperatura del agua de lavado por encima de 80°C causa una mayor reducción de la contaminación de las carnes que, no obstante, puede ser pequeña (Patterson, 1968, 1970; Bailey, 1971).

Para que el agua caliente sea efectiva, tiene que contactar con todas las partes de la carne durante un tiempo suficiente. Una cabina de lavado automático con agua caliente, diseñada para aplicar un chorro continuo de vapor sobre todas

las superficies y evitar que el calor y el vapor se pierdan en el medio, da lugar a una reducción del recuento de *E.coli* mayor de $2 \log_{10}$ (Smith and Davey, 1990). Experimentos realizados con este sistema han demostrado que la temperatura de la película acuosa de la superficie de la carne debe ser de unos 55°C para ejercer un efecto letal significativo en los microorganismos.

Normalmente el lavado sólo ejerce un efecto pequeño en la carga microbiana global de la carne. Si se emplean sistemas especiales (como agua a temperaturas de choque, soluciones de ácido láctico o acético) se pueden conseguir disminuciones significativas de la contaminación bacteriana. En estos casos deben controlarse la temperatura, el tiempo de aplicación y el volumen para asegurar la efectividad del sistema.

Por tanto, el lavado de la carne elimina algunas bacterias y redistribuye otras por distintas zonas. El lavado influye poco en la contaminación de *Salmonella* y *E.coli* (Childers *et al.*, 1973) y salvo que se prolongue, su efecto es escaso en los psicrótrofos (Skelley *et al.*, 1985). Al aplicar soluciones de ácidos orgánicos a la superficie de la carne se consiguen disminuciones (de 10 veces o más) del número de mesófilos y enterobacterias (Reynolds and Carpenter, 1974; Smulders, 1987).

La refrigeración es el punto de control crítico en el proceso de almacenamiento y transporte de la carne. La refrigeración bien aplicada previene el desarrollo de patógenos mesófilos (como salmonelas) y limita el crecimiento de psicrótrofos. Ninguno de los procesos utilizados para convertir el ganado en carne puede garantizar la ausencia de patógenos humanos en este alimento. La fuente principal de contaminantes microbianos de las carnes son los microorganismos que existían en los animales vivos. Se necesita controlarlos durante el crecimiento, transporte y sacrificio de los animales y durante la refrigeración, almacenamiento y transporte de las carnes y despojos (Simonsen *et al.*, 1987; Snijders, 1988; Kasproviak and Hechelmann, 1992; Mackey and Roberts, 1993).

3.4 Microorganismos contaminantes en carnes

A continuación se describen los principales géneros patógenos asociados a alimentos cárnicos, clasificados según su morfología y si son Gram positivos o negativos.

- Cocos Gram positivos

STAPHYLOCOCCUS

Las bacterias del género *Staphylococcus*, denominadas coloquialmente estafilococos, son cocos Gram positivos, aerobios y catalasa positivos que se presentan generalmente agrupados de forma irregular o en racimos. La producción de catalasa permite diferenciar a los estafilococos de los estreptococos.

Este género está compuesto por un gran número de especies, que podemos clasificar en dos grandes grupos:

- Intrínsecamente patógeno: *Staphylococcus aureus*.
- No patógenos: formado por otros grupos que tienen menor virulencia y habitualmente no son patógenos para el hombre, denominados coloquialmente estafilococos blancos.

Pese a su potencial patógeno, los estafilococos forman parte de la flora normal de la piel y de las mucosas.

Staphylococcus aureus: durante el sacrificio y despiece, las carnes de los rumiantes se contaminan a partir de la piel de los animales, del equipo utilizado y de las manos de los operarios (Peelet *et al.*, 1975). Las temperaturas menores de 7°C, durante la refrigeración y transporte evitan el crecimiento microbiano. No obstante en la carne cruda, incluso a temperaturas mayores, *S. aureus* es un mal competidor y es sobrepasado en su crecimiento por otros miembros de la microbiota. Para producir enterotoxina suficiente para originar intoxicación alimentaria tiene que alcanzar unos recuentos de, al menos, 10^6 UFC/g (Unidades Formadoras de Colonias). Además, las cepas de *S. aureus* de origen animal producen más difícilmente enterotoxinas que las de procedencia humana (Devriese, 1990).

STREPTOCOCCUS

Las bacterias del genero *Streptococcus* son cocos Gram positivos aerobios facultativos, catalasa negativos, que se disponen formando cadenas de longitud variable. Poseen distintos antígenos polisacáridos en la pared celular, que permiten su clasificación en grupos serológicos denominados grupos Lancefield. Las especies que poseen antígenos polisacáridos en la pared se designan también según el grupo serológico al que pertenezcan, como puede ser *Streptococcus pyogenes* o estreptococo grupo A.

En este género existen especies con patogenicidad intrínseca, como es *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*; no obstante la mayoría de las especies que integran este género son muy poco virulentas y forman parte de la microbiota normal del hombre.

- Cocos Gram negativos

Ningún género dentro de este grupo destaca como patógeno asociado a alimentos cárnicos. Pero hay una serie de Cocos Gram negativos, que aunque no son patógenos asociados a alimentos cárnicos también producen enfermedades.

NEISSERIA

Las bacterias del género *Neisseria* son diplococos Gram negativos que se agrupan en parejas (diplococos). Existen dos especies que son patógenas: *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*. *N. gonorrhoeae* siempre se considera productor de enfermedad, en cambio *N. meningitidis* puede aislarse de la nasofaringe de muchas personas sanas que no tienen enfermedad pero sí son portadores. Otras especies de *Neisseria* son saprófitas y sólo raramente se comportan como patógenos oportunistas.

- Bacilos Gram positivos

LISTERIA

Las bacterias del genero *Listeria* son bacilos Gram positivos aerobios no esporulados, catalasa positivos y móviles. La especie más importante es

Listeria monocytogenes, que es betahemolítica y se desarrolla bien a temperatura ambiente.

Listeria monocytogenes: esta y otras especies de *Listeria* pueden contaminar las carnes a partir de la piel, pelos y heces del ganado o a partir de las superficies de las salas de matanza y carnización (Lowry and Tiong, 1988). Las listerias de las carnes de cerdo proceden de su contaminación durante el escaldado y su paso por cámaras de refrigeración (Gobat and Jemmi, 1991). Después, las carnes pueden sufrir contaminaciones adicionales a su paso por frigoríficos y salas de almacenamiento. Incluso con buenas condiciones (<5°C) puede haber cierto crecimiento. Durante el cocinado de la carne se destruye el microorganismo, pero la carne cruda puede provocar la contaminación de las carnes procesadas listas para el consumo, es lo que se conoce como contaminación cruzada.

BACILLUS

Las características del género *Bacillus* son bacilos Gram positivos esporulados, aerobios facultativos y catalasa positivos. *Bacillus* está muy ampliamente distribuido en la naturaleza, son contaminantes frecuentes de las muestras clínicas y raramente causan enfermedad. Por ello un simple hallazgo de un *Bacillus* en una muestra no es suficiente para considerar que está produciendo una infección.

Bacillus cereus es un agente causal de una toxinfección alimentaria debida a una enterotoxina que se forma cuando el microorganismo se reproduce en los alimentos (arroz, carnes, salsas...). Esta toxinfección es consecuencia directa de que las esporas de *B. cereus* pueden sobrevivir a los procedimientos normales de cocinado y, cuando las condiciones de conservación del alimento no son las adecuadas. La infección se manifiesta en vómitos y, ocasionalmente, con diarrea.

CLOSTRIDIUM

Las bacterias del genero *Clostridium* son bacilos Gram positivos anaerobios esporulados y catalasa negativos. Se encuentran distribuidos por la naturaleza, en el suelo, polvo y forman parte de la flora normal del tracto intestinal, tanto del hombre como de numerosos animales. Se comporta como patógeno oportunista.

La mayoría de infecciones por *Clostridium* son de origen endógeno, aunque en algunos casos pueden producirse infecciones por adquisición de *Clostridium* de fuentes exógenas, como ocurre con: botulismo, tétanos, gastroenteritis por *Clostridium perfringens* e infecciones de heridas.

Dado que *Clostridium* forma parte de la microbiota normal del intestino y se encuentra en gran abundancia en las heces, es uno de los microorganismos utilizados para comprobar si el agua de consumo humana ha sufrido contaminación fecal.

Las dos especies de *Clostridium*, que causan intoxicación alimentaria son:

- *Clostridium botulinum*: la mayoría de los clostridios de las carnes crudas son mesófilos putrefactivos inocuos. Sin embargo, a veces se puede encontrar *C. botulinum*. La mayoría de los casos de botulismo debido 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).
- *Clostridium perfringens*: es un contaminante corriente de la superficie de las carnes de vacunos, ovinos y porcinos (Smart *et al.*, 1979). Se encuentra en pequeño número y principalmente en forma vegetativa. La contaminación tiene lugar a partir de los animales, de los tejidos internos (como el hígado), que pueden contener *C. perfringens*. La carne fresca se almacena a temperaturas menores de 15°C, lo que asegura la inhibición de su crecimiento. Las formas vegetativas viables disminuyen durante el almacenamiento en refrigeración y se destruyen durante el cocinado. La toxinfección alimentaria se debe a la supervivencia de esporas en las carnes cocinadas y a un gran crecimiento durante la refrigeración deficiente.

- Bacilos Gram negativos

ENTEROBACTERIACEAE

Con el nombre genérico de enterobacterias, son bacilos Gram negativos aerobios que se encuentran en gran cantidad en el intestino humano. Crecen bien en la mayoría de los medios de cultivo y forman colonias de distinta morfología, según sus propiedades metabólicas y los componentes del medio. Dentro de esta familia se encuentra el género *Salmonella*, *Escherichia* y *Yersinia*.

SALMONELLA

Salmonella: la incidencia de *Salmonella* en las carnes varía mucho. A veces se encuentran raramente (Biemuller *et al.*, 1973), en otras ocasiones aparecen en la mitad de las muestras analizadas aproximadamente (Oosterom and Notermans, 1983) y otras se encuentran en todas las carnes de un rebaño (Grau and Smith, 1974). El grado de contaminación de las carnes depende de la incidencia y del número de salmonelas del trato intestinal. También está influenciado por el cuidado observado en el sacrificio y despiece. Generalmente en las carnes y despojos sólo hay un número muy pequeño de salmonelas, sin embargo, la refrigeración, el transporte y el almacenamiento mal, realizados a temperaturas mayores de 7°C, permite su desarrollo.

ESCHERICHIA

Es un género perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos Gram negativos, aerobios facultativos y crecen bien en la mayoría de los medios de cultivo. Todas fermentan la glucosa, reduciendo los nitratos a nitritos y son oxidasa negativa.

La especie más conocida de este género es *Escherichia coli*, que se encuentra en la flora normal del tracto gastrointestinal del hombre y numerosos animales. En el ser humano constituye el microorganismo más abundante: alcanza concentraciones de 10^9 bacterias por gramo.

E. coli posee numerosos factores de virulencia, pero éstos no están presentes en todas las cepas. Así, la mayoría de las cepas son saprófitas y sólo son

capaces de producir infecciones en personas inmunodeprimidas. Otros *E.coli* tienen factores específicos de virulencia que les permiten causar desde infecciones urinarias hasta infecciones muy graves, como el síndrome hemolítico urémico.

Un pequeño porcentaje de vacuno que llega al matadero puede albergar en sus intestinos *E.coli* enterohemorrágico. Una cuidadosa evisceración y degollado pueden limitar pero no prevenir por completo la contaminación cárnica. Este patógeno crece cuando la refrigeración o el transporte no son adecuados (temperaturas superiores a 7°C). La carne picada mal cocinada, contaminada con *E.coli* O157:H7, puede causar brotes de diarrea sanguinolenta (colitis hemorrágica) y del síndrome urémico hemolítico (Doyle, 1991; Griffin and Tauxe, 1991). Por ello se ha recomendado el cocinado de alimentos tipo hamburguesa a una temperatura superior a 68°C (Meng *et al.*, 1994).

YERSINIA

Dentro de este género se incluye la especie *Yersinia enterocolítica*, causante de la gastroenteritis y *Yersinia pestis*, agente causal de la peste bubónica. Este género se encuentra dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, por lo tanto son bacilos gram negativos y aerobios facultativos.

Yersinia enterocolítica: la incidencia de serotipos de *Y. enterocolítica* en las carnes de cerdo varía desde muy baja (Boer and Nouws, 1991; Mafu *et al.*, 1989) a muy alta (Christensen, 1987; Nesbakken, 1988). El cuidado en la evisceración influye mucho en la contaminación (Andersen *et al.*, 1991). Estudios epidemiológicos han asociado la yersiniosis humana con el consumo de carne picada cruda de cerdo (Tauxe *et al.*, 1987) y con magro de cerdo poco hecho (Ostroff *et al.*, 1994).

CAMPYLOBACTER

Son bacilos Gram negativos, con forma curvada en espiral, microaerófilos, oxidasa positivos y móviles. La especie más importante es *Campylobacter jejuni*, que produce infecciones intestinales con diarrea. Su reservorio principal lo constituyen las aves.

Campylobacter jejuni: se han encontrado *C. jejuni* en el 2-32% de vacunos, en el 20-79% de terneros, en el 20-60% de porcinos según los estudios. Durante la refrigeración de las carnes se reducen significativamente la incidencia y los recuentos de *Campylobacter* viables. La contaminación de los despojos es mayor que la de la carne, lo que probablemente se debe a sus mayores tasas de contaminación inicial y a su mayor supervivencia en los despojos ya que se desecan menos durante la refrigeración.

PSEUDOMONAS

Son bacilos Gram negativos aerobios, con un metabolismo oxidativo, por lo que se incluyen dentro del grupo de bacilos Gram negativos no fermentadores. Sus colonias producen una pigmentación característica.

Se encuentra en la naturaleza, tanto en suelo como en agua, y tienen muy pocos requerimientos nutritivos, por lo que pueden sobrevivir en ambientes hostiles.

(De la Rosa M. and Prieto J., 1997)

3.5 Identificación de bacterias contaminantes de alimentos cárnicos

En algunos casos de intoxicaciones o toxiinfecciones alimentarias se hace necesario identificar al microorganismo responsable para realizar un adecuado diagnóstico y tratamiento o bien con fines epidemiológicos para localizar la fuente de contaminación.

Identificar una bacteria consiste en determinar la especie a la que pertenece y, en algunos casos, el serogrupo e incluso la cepa. La primera fase y, quizás, la fundamental para identificar una bacteria es la obtención de un cultivo puro utilizando técnicas de aislamiento. Una vez obtenido el cultivo puro, habitualmente se determina:

1. Morfología y agrupación (cocos, bacilos etc.)

Se lleva a cabo realizando una tinción de Gram. Estos datos, junto con el tipo de pared celular Gram positivo o negativo, permiten encuadrar la bacteria en

alguno de los grandes grupos, como cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos etc.

2. Características de los cultivos

A partir de este punto, suelen determinarse las características de los cultivos, lo que se efectúa sembrando la bacteria en diversos medios y en distintas condiciones de incubación. Por ejemplo:

- a) La falta de crecimiento en medios sin suplementos nos indica que es una bacteria exigente.
- b) La falta de crecimiento en ausencia de oxígeno nos indicará que es aerobia.
- c) El crecimiento en medios de cultivo que contiene sangre nos indicará si la bacteria lisa los hematíes, en cuyo caso, será hemolítica.
- d) El crecimiento en medios selectivos nos orientará sobre el grupo al cual pertenece.

3. Caracteres fisiológicos

Se efectuarán múltiples pruebas para determinar caracteres fisiológicos, llamadas pruebas bioquímicas:

- a) Prueba de la catalasa: consiste en poner una porción de una colonia en contacto con agua oxigenada. El que se produzcan burbujas de oxígeno nos indicará la existencia de la enzima catalasa.
- b) Tipo de vía metabólica (oxidativa o fermentativa): la bacteria puede usar uno u otro tipo de vía para obtener su energía a partir de la glucosa. Para ello cultivamos la bacteria en anaerobiosis y aerobiosis en un medio de cultivo con glucosa y observamos el cambio de pH con un indicador. Si la bacteria obtiene la energía por la vía metabólica de la oxidación, el pH cambia poco en el tubo en anaerobiosis, por lo que la bacteria será oxidadora o no fermentadora. Y si obtiene su energía por la vía fermentativa obtendremos el resultado contrario.
- c) Lactosa: podemos cultivar la bacteria en un medio que contenga lactosa y un indicador de pH, el cambio de color del indicador hacia el pH ácido

indicará que la bacteria ha utilizado la lactosa por la vía metabólica fermentativa y diremos que la bacteria fermenta la lactosa.

- d) Oxidasa: podemos comprobar la existencia de la vía oxidasa de los citocromos en el metabolismo de la bacteria mediante la detección de la enzima oxidasa, que clasificará a las bacterias en oxidasa positiva y oxidasa negativa.

En ocasiones es necesario recurrir a la identificación de un microorganismo utilizando anticuerpos específicos y reacciones serológicas, principalmente aglutinación e inmunofluorescencia. También es posible la identificación mediante técnicas moleculares, detectando fragmentos específicos de su genoma mediante PCR o cebadores adecuados.

4. OBJETIVOS

- Evaluar la carga microbiana en alimentos cárnicos procesados envasados y no envasados.
- Realizar una identificación preliminar de los microorganismos aislados.
- Evaluar la influencia del envasado en la cantidad y diversidad de microorganismos aislados.
- Estimar la variabilidad de los resultados obtenidos en lotes procedentes de distintos tiempos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento tiene como objetivo el análisis microbiológico de dos tipos diferentes de alimentos cárnicos: envasados y no envasados. Los alimentos cárnicos envasados empleados son: hamburguesa de pollo, hamburguesa de ternera, pechuga de pollo, longaniza de pavo y carne picada de pollo; los alimentos cárnicos no envasados son: hamburguesa de ternera, pechuga de pollo, lomo de cerdo, conejo y asadura (hígado) de pollo. Dos de cada uno de los cinco alimentos son repetidos, tanto envasados como no envasados, como son la hamburguesa de ternera y la pechuga de pollo, lo que nos permite evaluar si el hecho de que estén envasados o no influye en la cantidad y variedad de microorganismos presentes. El resto son distintos tipos de carne envasada (hamburguesa de pollo, longaniza de pavo y carne picada de pollo) y no envasada (lomo de cerdo, asadura de pollo y conejo), lo que nos permitirá además evaluar la carga y variedad microbiológica en distintos tipos de productos cárnicos. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y con dos lotes de alimentos iguales, comprados en los mismos establecimientos, y con una diferencia de tiempo de dos semanas.

Para el análisis microbiológico de los productos cárnicos se han utilizado cinco tipos de medios de cultivos distintos, como son: Tríptica Soja Agar (TSA), MacConkey Agar, MRS, Vogel Johnson Agar (VJ Agar) y KAA Agar.

5.1 Material necesario:

5.1.1 Material fungible

- Cinco tipos distintos de medios de cultivo: Tríptica Soja Agar (TSA), MacConkey Agar, MRS, Vogel Johnson Agar (VJ Agar) y KAA Agar.
- Agua destilada
- Solución salina
- Placas petri
- Tubos Eppendorf de 1,5ml
- Portaobjetos de vidrio
- Puntas de pipetas

- Bolsas herméticas para el homogeneizador
- Guantes
- Colorantes: safranina, lugol y cristal violeta
- Alcohol 96°
- Agua oxigenada (H₂O₂)

5.1.2 Material de laboratorio

- Asas de siembra
- Asas de Drigalski
- Matraces
- Tijeras
- Mechero Bunsen
- Balanza
- Pipetas automáticas (micropipetas)
- Homogeneizador de paletas (Stomacher)
- Estufa de cultivo microbiológico
- Autoclave
- Gradillas
- Cámara fría o refrigerada
- Microscopio óptico

5.2 Medios de cultivo

➤ TSA

Medio recomendado para la detección y recuento de una amplia gama de microorganismos. Es un medio de uso general que permite el crecimiento de una amplia gama de microorganismos, tanto aerobios como anaerobios. La presencia de Lecitina y Tween permite neutralizar la actividad antibacteriana, facilitando la investigación de los gérmenes en productos o superficies que contengan: Aldehídos, derivados fenólicos, o amonio cuaternario. (Panreac Manual básico de microbiología, 2003).

Composición (g/l):

- Polisorbato80 5,0

- Lecitina0,7
- Histidina..... 1,0
- Peptona de Caseína.....15,0
- Peptona de Soja..... 5,0
- Cloruro de Sodio.....5,0
- Tiosulfato de Sodio..... 0,5
- Agar.....15,0

Final pH 7,3 ± 0,2

➤ MacConkey Agar

Este medio se basa en la fórmula original de MacConkey a base de sales biliares, rojo neutro y lactosa para el aislamiento de bacilos entéricos Gram-negativos. El medio ha sufrido múltiples variaciones en el transcurso del tiempo, ya sea por la adición de otros ingredientes o por la modificación de las proporciones entre ellos.

Su fundamento se basa en la presencia de las sales biliares y el cristal violeta, que inhiben el crecimiento de las bacterias Gram-positivas. Por la presencia de la lactosa, las bacterias capaces de fermentarla acidifican el medio, cambiando el color del rojo neutro y formando colonias rojas o rosadas, pudiendo presentar un halo turbio correspondiente al precipitado biliar. Las bacterias lactosa-negativas dan colonias incoloras.

(Panreac Manual básico de microbiología, 2003).

Composición (g/l):

- Lactosa10,0
- Peptona (carne y caseína).....3,0
- Sales Biliares1,5
- Peptona de Gelatina17,0
- Rojo Neutro.....0,03
- Sodio Cloruro.....5,0
- Violeta Cristal.....0,001
- Agar13,5 g

Final pH 7,1 ± 0,2

➤ MRS Agar

Se emplea para el cultivo y recuento de lactobacilos, tanto en productos lácteos como en productos alimenticios en general. Si se acidifica a pH=5,5 ±0,1 permite el recuento de los lactobacilos propios del yogur. Por la presencia de la peptona, glucosa, manganeso y magnesio se aportan los componentes nutritivos y energéticos para el crecimiento de los lactobacilos. El Citrato diamónico inhibe el crecimiento de la mayor parte de gérmenes contaminantes. El Fosfato dipotásico se emplea para estabilizar el pH del medio, mientras que el Tween® constituye su fuente de ácidos grasos. De esta manera este medio es ideal para el crecimiento masivo de todas las cepas de lactobacilos, incluso aquellas de crecimiento lento y difícil.

(Panreac Manual básico de microbiología, 2003).

Composición (g/l):

- Citrato diamónico..... 2,0
- Extracto de Carne.....8,0
- Extracto de Levadura..... 4,0
- D(+)-Glucosa20,0
- Sulfato de Magnesio..... 0,2
- Sulfato de Manganeso(II).....0,05
- Peptona Bacteriológica..... 10,0
- Fosfato dipotásico2,0
- Acetato de Sodio..... 5,0
- Tween801,0
- Agar 10,0

Final pH 6,4 ± 0,2

➤ Vogel Johnson Agar (VJ Agar)

El Agar Vogel-Johnson es un medio sólido altamente selectivo para el aislamiento y la identificación de estafilococos manitol-positivos. La presencia del Cloruro de Litio, de la Glicina y del Telurito de Potasio dan a este medio una fuerte acción selectiva donde la flora secundaria es inhibida casi por completo. Los estafilococos reducen el telurito a telurio metal lo que da colonias sobre un fondo rojo si no son fermentadores del manitol. Los estafilococos fermentadores del manitol, (presuntivamente patógenos), dan colonias

rodeadas de un halo amarillo. El cambio de color del medio es debido al viraje del indicador de pH producido por la acumulación de productos ácidos, obtenidos en la fermentación del manitol.

(Panreac Manual básico de microbiología, 2003).

Composición (g/l):

- Extracto de Levadura..... 5,0
- Glicina.....10,0
- Cloruro de Litio 5,0
- D(-)-Manita10,0
- Fosfato dipotásico..... 5,0
- Rojo de Fenol.....0,025
- Triptona..... 10,0
- Agar.....15,0

Final pH 7,2 ± 0,2

➤ KAA Agar

Se emplea para la detección, aislamiento y confirmación de enterococos en alimentos, aguas y otras muestras biológicas. La selectividad de estos medios para los enterococos es muy elevada e incluso superior a la de otros medios comparables. La Kanamicina y la azida sódica inhiben el crecimiento de la flora acompañante, mientras que los enterococos pueden crecer sin restricción. A su vez estos microorganismos hidrolizan la esculina con la producción de glucosa y esculetina, la cual reacciona con el citrato férrico para dar un complejo de color variable entre el verde y el negro.

(Panreac Manual básico de microbiología, 2003).

Composición (g/l):

- Sulfato de Kanamicina0,02
- Esculina1,0
- Azida Sódica0,15
- Citrato férrico0,5
- Extracto de Levadura.....5,0
- Cloruro de sodio5,0
- Citrato disódico1,0
- Triptona20,0

Final pH 7,0 ± 0.2

5.3 Preparación del material

5.3.1 Preparación de medios de cultivo

El medio de cultivo constituye el aporte de nutrientes indispensables para el crecimiento de los microorganismos. La composición precisa dependerá de la especie que se quiera cultivar, porque las necesidades nutricionales varían considerablemente. Hay microorganismos muy poco exigentes que crecen bien en medios de laboratorio normales y microorganismos muy exigentes que necesitan determinadas sustancias como vitaminas, suero o sangre para crecer.

Es por ello que vamos a preparar cinco medios de cultivos diferentes. Cuatro de ellos son medios selectivos: MRSA, MacConkey, KAA y Vogel-Johnson; mientras que el quinto será no selectivo: TSA. Todos ellos de Scharlab (Barcelona), preparados según las instrucciones del fabricante. El número de placas necesarias en cada una de las fases del estudio son:

- TSA: 4 placas por cada muestra (5): 20 placas de TSA
- MRS: 2 placas por cada muestra (5): 10 placas MRS
- MacConkey: 2 placas por cada muestra (5): 10 placas de MacConkey
- KAA: 2 placas por cada muestra (5): 10 placas de KAA
- Vogel-Johnson: 2 placas por muestra (5): 10 placas de Vogel-Johnson

La preparación de cada uno de los medios se realiza pesando la cantidad adecuada de medio y diluyéndolas en agua destilada. Las cantidades de medios y agua destilada fueron:

- TSA: 800 ml de agua + 32 g de TSA (Dilución original 40g/l)
- MRS: 800 ml de agua + 49.6 g de MRS (Dilución original 62g/l)
- MacConkey: 800 ml de agua + 41.2 g MacConkey (Dilución original 51.5 g/l)
- KAA: 800 ml de agua + 34.4 g KAA (Dilución original 43 g/l)
- Vogel-Johnson: 800 ml de agua + 48 g Vogel-Johnson (Dilución original 60 g/l)

Una vez que los medios están diluidos en sus matraces, se procede a la esterilización por autoclavado, después se atemperan a 50 °C y se vierten en placas Petri, con la suficiente cantidad para cubrir el fondo.

Estas placas se dejan enfriar y a continuación, con rotulado indeleble, se escribe en la base el tipo de medio que es, el alimento que se va a sembrar y en que dilución.

Cada semana se repondrán los medios de cultivo en función de la cantidad que hagan falta para la siguiente siembra.



(Fig. 5.1 Medios de cultivos preparados para siembra)

5.4 Procesado de los alimentos

De cada alimento se pesan 5 gramos y se introducen en bolsas herméticas especiales para el homogeneizador. En estas bolsas se les añade posteriormente 45 ml de solución salina estéril al 0,9%, preparada con anterioridad. Esta mezcla de alimento y solución salina es procesada en un homogeneizador (Stomacher 80 Biomaster, Seward Ltd.).



(Fig. 5.2 Peso de muestras) (Fig. 5.3 Muestras en bolsas herméticas)

Una vez que los alimentos están homogeneizados, se preparan los tubos eppendorf para las diluciones. Se colocarán 15 tubos eppendorf en una gradilla, a razón de 3 para TSA, y 4 por cada uno de los medios selectivos, de

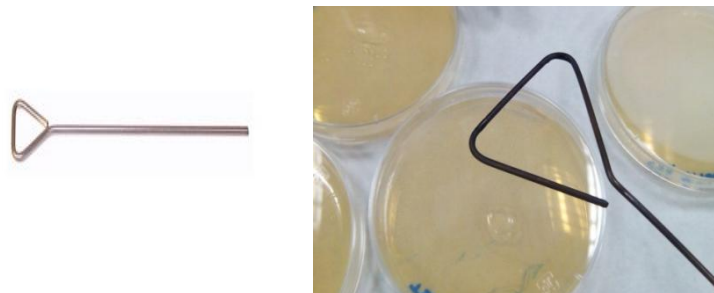
modo que permitan preparar las diluciones -1, -2 y -3. La solución madre se considera la dilución 0. Aunque de los medios selectivos sólo se sembrarán las diluciones 0 y -1, por la menor capacidad de crecimiento de los microorganismos en estos medios debido a la presencia de agentes inhibidores. Cada tubo estará numerado con la dilución oportuna y el tipo de alimento que le corresponde. Estos tubos eppendorf estarán rellenos con 0,9 ml de solución salina estéril. Las diluciones seriadas se preparan añadiendo 100 µl de la suspensión madre (mezcla del alimento más la solución salina homogeneizada) sobre los 0,9 ml de solución salina estéril y continuando de forma seriada sobre nuevos tubos eppendorf y de la misma manera para preparar las siguientes diluciones.



(Fig. 5.4 Diluciones en tubos eppendorf)

Una vez que se han completado las diluciones, se siembran 100 µl de cada dilución, de la 0 hasta la -3 en el medio general TSA y 100 µl de las dos primeras diluciones (0 y -1) en las placas de los medios selectivos.

La muestra inoculada en los medios de cultivo se distribuye a continuación de forma homogénea con la ayuda de asa de siembra de Drigalski triangulares.



(Fig. 5.5 Asas Drigalski)

Los recuentos se realizarán tras 48 horas de incubación en una estufa a 37 °C.

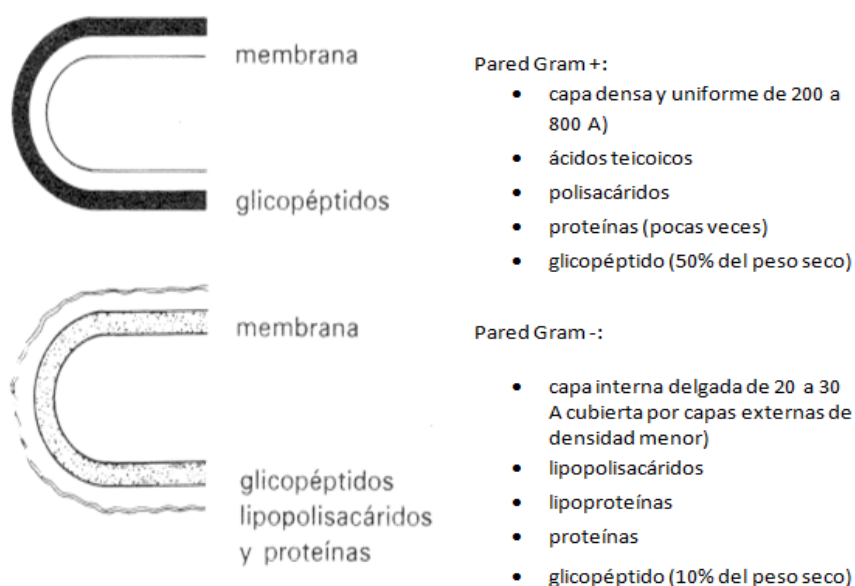
5.5 Identificación preliminar de las colonias

Una vez transcurridas las 48 horas de incubación, se realizará el recuento e identificación preliminar de las colonias obtenidas. Se apuntarán el número de colonias, la morfología y los cambios observados en los medios en una tabla.

Posteriormente, las colonias obtenidas en cada medio de cultivo utilizado y que presenten morfologías diferentes serán seleccionadas para realizarles una tinción de Gram y la prueba de la catalasa.

Tinción de Gram

Esta tinción se denominada así por el bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, Gram positivas y Gram negativas (en este caso, los términos positivo y negativo designan dos grupos morfológicos distintos de bacterias). Estos grupos morfológicos distintos hacen referencia a la forma estructural y química de las paredes bacterianas, de modo que:



(Fig. 5.6 Diferencias Gram negativas y Gram positivas)(www.geocities.ws)

Descrita en forma breve, la secuencia de la tinción es la siguiente:

(Gamazo *et al.* ,2005)

- Se añade una gota de agua sobre un porta limpio.

- Con el asa de siembra esterilizada se toma una muestra de la colonia deseada y se extiende sobre la gota de agua.
- Se seca la gota con la bacteria sobre el mechero y se fija por calor.
- Se deja enfriar.
- Se añade cristal violeta y se deja actuar durante 2 minutos.
- Se escurre el cristal violeta, sin lavar.
- Se añade lugol y se deja actuar durante 2 minutos.
- Se decolora con alcohol 96 °C.
- Se lava con abundante agua para eliminar el alcohol.
- Se añade safranina y se deja actuar durante 3 minutos.
- Se vuelve a lavar con agua destilada.
- Se deja secar y se observa al microscopio con una gota de aceite inmersión y el objetivo de 100X.



(Fig. 5.7 Tintes para la tinción Gram)

Prueba de la catalasa

La enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno de acuerdo con la reacción $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$. De esta manera las bacterias se protegen del efecto tóxico del H_2O_2 , que es un producto final del metabolismo aerobio de los azúcares.

La prueba se realiza colocando una gota de H_2O_2 al 3% sobre un portaobjetos y luego se transfiere una muestra de la colonia sobre el H_2O_2 y se homogeneiza la mezcla.

(Gamazo *et al.*, 2005)

El desprendimiento de burbujas indica que la prueba es positiva ya que si la bacteria es catalasa positiva va a poseer esta enzima que descompone el agua oxigenada en agua y oxígeno, lo que provoca la aparición de las burbujas en la muestra. Si la bacteria es catalasa negativa, al no poseer la enzima, no se observarán burbujas en la muestra.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Carga microbiana e identificación preliminar de las cepas aisladas

En la identificación preliminar de los microorganismos aislados se observan las características macroscópicas de las colonias, la morfología, agrupaciones y tipo de pared celular mediante la tinción de Gram y el resultado de la prueba de la catalasa. Además el recuento de las colonias expresado en Unidades Formadoras de Colonias por gramo de alimento (UFC/g) sirve para evaluar la carga microbiana de los alimentos cárnicos utilizados. Todas estas características se resumen en las siguientes tablas, clasificadas en alimentos envasados y no envasados, y posteriormente dependiendo del tipo de medio utilizado para la siembra y el alimento analizado.

Alimentos envasados:

McConkey	Primer recuento			
	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC/g
Pechuga de Pollo	Blancas	Bacilos cortos gram -	Positiva	$6,4 \cdot 10^3$
Hamburguesa de Ternera	Rosáceas y blancas	Bacilos cortos gram -	Positiva	$3,1 \cdot 10^3$
Hamburguesa de Pollo	Rosáceas y blancas	Bacilos cortos gram -	Positiva	$1,1 \cdot 10^3$
Longaniza de Pavo	Rosáceas	Bacilos cortos gram -	Positiva	$3,2 \cdot 10^3$
Carne picada de Pollo	Blancas y rosáceas	Bacilos largos gram -	Positiva	$0,6 \cdot 10^3$
McConkey	Segundo recuento			
	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC/g
Pechuga de Pollo	Rosáceas y blancas	Bacilos cortos gram -	Positiva	$12,6 \cdot 10^3$
Hamburguesa de Ternera	Blancas	Bacilos cortos gram -	Positiva	$4,6 \cdot 10^3$
Hamburguesa de Pollo	Rosáceas	Bacilos cortos gram -	Positiva	$1,7 \cdot 10^3$
Longaniza de Pavo	Rosáceas	Bacilos cortos gram -	Positiva	$7,1 \cdot 10^3$
Carne picada de Pollo	Blancas	Bacilos cortos gram -	Positiva	$0,8 \cdot 10^3$

Tabla 1: Recuento, características macro y microscópicas y resultados de la prueba de la catalasa de cepas aisladas en medio MacConkey de alimentos envasados.

En la Tabla 1 se muestran las características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas, resultados de la prueba de la catalasa y UFC/g de los alimentos envasados sembrados en medio MacConkey. Las bacterias lactosa-negativas dan lugar a las colonias blancas (incoloras) y las bacterias lactosa-positivas son las que forman las colonias rosáceas. Este medio además se caracteriza porque inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas, hecho

que se observa en la tabla ya que sólo se aislaron bacterias Gram negativas. La catalasa en todas las muestras es positiva.

El estudio comparativo entre los lotes procedentes de distintas compras en el mismo establecimiento, primer recuento (tiempo 0) y segundo recuento (tiempo 1), muestra que el tipo de microorganismos aislados es igual en ambos lotes, si bien los recuentos son más elevados en el segundo lote analizado, siendo las diferencias significativas en pechuga de pollo y longaniza de pavo, con recuentos a tiempo 1 que duplican los obtenidos a tiempo 0.

MRS	Primer recuento			
	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC/g
Pechuga de Pollo	Blancas pequeñas	Bacilos gram +	Negativa	$0,8 \cdot 10^3$
Hamburguesa de Ternera	Blancas pequeñas	Bacilos gram +	Negativa	$3 \cdot 10^3$
Hamburguesa de Pollo	Blancas pequeñas	Bacilos gram +	Negativa	$2,0 \cdot 10^3$
Longaniza de Pavo	Blancas pequeñas	Bacilos gram +	Negativa	$> 3 \cdot 10^5$
Carne picada de Pollo	Blancas pequeñas	Bacilos gram +	Negativa	$13,1 \cdot 10^3$
MRS	Segundo recuento			
	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC/g
Pechuga de Pollo	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Hamburguesa de Ternera	Blancas pequeñas	Bacilos gram +	Negativa	$3,1 \cdot 10^3$
Hamburguesa de Pollo	Blancas pequeñas	Bacilos gram +	Negativa	$1,3 \cdot 10^3$
Longaniza de Pavo	Blancas pequeñas	Bacilos gram +	Negativa	$0,9 \cdot 10^3$
Carne picada de Pollo	Blancas de mayor tamaño	Bacilos gram +	Negativa	$20,8 \cdot 10^3$

Tabla 2: Recuento, características macro y microscópicas y resultados de la prueba de la catalasa de cepas aisladas en medio MRS de alimentos envasados.

La Tabla 2 muestra las características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas, resultados de la prueba de la catalasa y UFC/g, en esta ocasión, de las muestras sembradas en medio MRS. Este medio es utilizado para el aislamiento de lactobacilos, e inhibe a otros microorganismos contaminantes. Se puede observar que las características macroscópicas y los resultados de la prueba de la catalasa en ambos tiempos son similares, en todos los alimentos excepto pechuga de pollo, en la cual en el segundo recuento no se observó crecimiento, así como en longaniza de pavo que presentó un recuento muy elevado a tiempo cero, viéndose muy reducido a tiempo 1. Por el contrario, en carne picada de pollo se obtuvieron recuentos superiores en este medio en el segundo lote de alimentos estudiado.

VJ	Primer recuento			
	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC/g
Pechuga de Pollo	Blancas y rosáceas	Cocos gram +	Positiva	12,5. 10 ³
Hamburguesa de Ternera	Blancas	Cocos gram +	Positiva	4,6. 10 ³
Hamburguesa de Pollo	Blancas y rosáceas	Bacilos gram -	Positiva	4,4. 10 ³
Longaniza de Pavo	Blancas y rosáceas	Bacilos gram -	Positiva	>3. 10 ⁵
Carne picada de Pollo	Blancas	Bacilos gram -	Positiva	4,7. 10 ³
VJ	Segundo recuento			
	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC/g
Pechuga de Pollo	Blancas	Cocos gram +	Positiva	> 3. 10 ⁵
Hamburguesa de Ternera	Anaranjadas (amarillentas)	Cocos gram +	Positiva	6,7. 10 ³
Hamburguesa de Pollo	Blancas	Bacilos gram -	Positiva	4,5. 10 ³
Longaniza de Pavo	Blancas y rosáceas	Bacilos gram -	Positiva	> 3. 10 ⁵
Carne picada de Pollo	Blancas	Bacilos gram -	Positiva	3,6. 10 ³

Tabla 3: Recuento, características macro y microscópicas y resultados de la prueba de la catalasa de cepas aisladas en medio VJ de alimentos envasados.

En la Tabla 3 se muestran las características anteriormente mencionadas, de los distintos alimentos en el medio VJ, que es un medio sólido selectivo para el aislamiento y la identificación de estafilococos. Como ocurre con los medios anteriores, las diferencias entre los lotes en los dos tiempos son prácticamente nulas en cuanto a morfología microscópica, características macroscópicas y prueba de la catalasa se refiere. En los recuentos sí se encontraron diferencias significativas en la pechuga de pollo del segundo tiempo, que tiene un valor significativamente más alto que el primer recuento, sin embargo el resto de alimentos mantienen valores similares en ambos tiempos.

KAA	Primer recuento		
	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa
Pechuga de Pollo	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Hamburguesa de Ternera	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Hamburguesa de Pollo	Blanca con halo oscuro	Cocos gram +	Negativa
Longaniza de Pavo	Blanca con halo oscuro	Cocos gram +	Negativa
Carne picada de Pollo	Blanca con halo oscuro	Cocos gram +	Negativa
KAA	Segundo recuento		
	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa
Pechuga de Pollo	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Hamburguesa de Ternera	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Hamburguesa de Pollo	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Longaniza de Pavo	Negra con halo oscuro	Cocobacilos gram +	Negativa
Carne picada de Pollo	Blanca con halo oscuro	Cocos gram +	Negativa

Tabla 4: Características macro y microscópicas y resultados de la prueba de la catalasa de cepas aisladas en medio KAA de alimentos envasados.

En la Tabla 4, correspondiente a las muestras sembradas en medio KAA, selectivo para enterococos, no se especifican las UFC/g, ya que el número de colonias obtenidas en las placas tras la incubación correspondiente fueron inferiores a las necesarias para que los datos se puedan considerar significativos. De hecho sólo se obtuvo una colonia en los tres últimos alimentos del primer lote y en los dos últimos del segundo lote analizado. Las características macro y microscópicas fueron similares en todos los casos, excepto en longaniza de pavo del segundo lote, en que se aisló una colonia correspondiente a un cocobacilo Gram positivo.

Alimentos no envasados

McConkey	Primer recuento			
	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC
Pechuga de Pollo	Rosaceas y anaranjadas	Bacilos cortos gram +	Positiva	9,6. 10 ⁴
Hamburguesa de Ternera	Rosaceas y amarillentas	Bacilos cortos gram +	Positiva	10,9. 10 ⁴
Lomo de Cerdo	Rosaceas	Bacilos cortos gram -	Positiva	4,9. 10 ⁴
Hígado de Pollo	Rosaceas	Bacilos gram -	Positiva	4,6. 10 ⁴
Conejo	Anaranjadas y rosaceas	Bacilos gram -	Positiva	4,4. 10 ⁴
McConkey	Segundo recuento			
	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC
Pechuga de Pollo	Blancas y rosaceas	Bacilos cortos gram +	Positiva	0,56. 10 ⁴
Hamburguesa de Ternera	Rosaceas y anaranjadas	Bacilos gram -	Positiva	2,17. 10 ⁴
Lomo de Cerdo	Blancas y rosaceas	Bacilos cortos gram -	Positiva	2,64. 10 ⁴
Hígado de Pollo	Rosaceas	Bacilos gram -	Positiva	2,7. 10 ⁴
Conejo	Anaranjadas y rosaceas	Bacilos gram -	Positiva	1,07. 10 ⁴

Tabla 5: Recuento, características macro y microscópicas y resultados de la prueba de la catalasa de cepas aisladas en medio MacConkey de alimentos no envasados.

En esta Tabla 5 se muestra las características de las colonias crecidas en el medio MacConkey. Al igual que con los alimentos envasados, aparecen colonias tanto blanquecinas como rosáceas (bacterias lactosa-negativas dan lugar a las colonias blancas o incoloras y las bacterias lactosa-positivas son las que forman las colonias rosáceas). La prueba de la catalasa es igual en los dos recuentos y en la tinción sólo hay cambios en la muestra de hamburguesa de ternera, la cual cambia de Gram positiva en el primer recuento a Gram negativa en el segundo recuento. En cuanto a los recuentos, fueron superiores en todos los alimentos del primer lote analizado.

MRS	Primer recuento			
	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC
Pechuga de Pollo	Blancas pequeñas	Bacilococos gram +	Positiva	1,02. 10 ⁴
Hamburguesa de Ternera	Blancas pequeñas	Cocos gram +	Positiva	15,1. 10 ⁴
Lomo de Cerdo	Blancas pequeñas	Bacilococos gram +	Negativa	1,54. 10 ⁴
Hígado de Pollo	Blancas pequeñas	Bacilococos gram +	Positiva	5,8 10 ⁴
Conejo	Blancas pequeñas	Bacilos gram +	Negativa	2,25. 10 ⁴
MRS	Segundo recuento			
	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC
Pechuga de Pollo	Blancas pequeñas	Bacilococos gram +	Positiva	5,8. 10 ⁴
Hamburguesa de Ternera	Blancas pequeñas	Cocos gram +	Positiva	2,79. 10 ⁵
Lomo de Cerdo	Blancas pequeñas	Bacilococos gram +	Positiva	1,28. 10 ⁴
Hígado de Pollo	Blancas pequeñas	Bacilococos gram +	Positiva	7,1. 10 ⁴
Conejo	Blancas pequeñas	Bacilococos gram +	Positiva	1,33. 10 ⁴

Tabla 6: Recuento, características macro y microscópicas y resultados de la prueba de la catalasa de cepas aisladas en medio MRS de alimentos no envasados.

En esta Tabla 6, las características macroscópicas y tinción es similar en ambos tiempos. La prueba de la catalasa es negativa en la muestra de lomo de cerdo y conejo en el tiempo 0, a diferencia del tiempo 1 que es positiva. En cuanto a los recuentos obtenidos, son superiores para pechuga de pollo, hamburguesa de ternera e hígado de pollo en el segundo tiempo, siendo por el contrario algo inferiores en los otros alimentos estudiados (lomo de cerdo y conejo).

VJ	Primer recuento			
	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC
Pechuga de Pollo	Blancas	Bacilos cortos gram +	Positiva	16,3. 10 ⁴
Hamburguesa de Ternera	Rosaceas y amarillentas	Bacilos cortos gram -	Positiva	10,2. 10 ⁴
Lomo de Cerdo	Rosaceas y amarillentas	Cocos gram +	Positiva	1,89. 10 ⁴
Hígado de Pollo	Blancas y amarillentas	Bacilos gram +	Positiva	7,5. 10 ⁴
Conejo	Blancas y amarillentas	Bacilos cortos gram -	Positiva	15,9. 10 ⁴
VJ	Segundo recuento			
	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC
Pechuga de Pollo	Blancas	Bacilos cortos gram +	Positiva	2,14. 10 ⁴
Hamburguesa de Ternera	Blancas y amarillentas	Cocos gram +	Positiva	8,7. 10 ⁴
Lomo de Cerdo	Blancas y amarillentas	Cocos gram +	Positiva	1,08. 10 ⁴
Hígado de Pollo	Blancas	Bacilos gram +	Positiva	3,8. 10 ⁴
Conejo	Amarillentas	Cocobacilos gram +	Positiva	13,1. 10 ⁴

Tabla 7: Recuento, características macro y microscópicas y resultados de la prueba de la catalasa de cepas aisladas en medio VJ de alimentos no envasados.

La Tabla 7, muestra las características de las colonias aisladas en medio VJ. La prueba de la catalasa es positiva para todas las cepas aisladas, independientemente si es el primer o segundo recuento. En las características macroscópicas, las colonias blancas y amarillentas son comunes a ambos tiempos, pero en el primer recuento aparecen colonias rosáceas que no aparecen en el segundo recuento. La tinción es similar en todos los alimentos de los distintos tiempos excepto en la hamburguesa de ternera (que en el primer recuento es Gram negativa y en el segundo recuento es Gram positiva) y el conejo (en el primer recuento es Gram negativo y en el segundo es Gram positivo). De nuevo las mayores diferencias se observan en los recuentos, que son significativamente mayores en el primer recuento, especialmente en la pechuga de pollo e hígado de pollo.

KAA	Primer recuento		
	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa
Pechuga de Pollo	Negras con halo oscuro	Cocos gram +	Negativa
Hamburguesa de Ternera	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Lomo de Cerdo	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Hígado de Pollo	Blancas con halo oscuro	Cocos gram +	Negativa
Conejo	Negras con halo oscuro	Cocos gram +	Negativa
KAA	Segundo recuento		
	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa
Pechuga de Pollo	Pequeños puntos blancos	Bacilos cortos gram +	Negativa
Hamburguesa de Ternera	Blancas con halo oscuro	Cocos gram +	Negativa
Lomo de Cerdo	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Hígado de Pollo	Pequeños puntos blancos	Bacilos cortos gram +	Negativa
Conejo	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento

Tabla 8: Características macro y microscópicas y resultados de la prueba de la catalasa de cepas aisladas en medio MRS de alimentos no envasados.

Como ocurre en los alimentos envasados, la Tabla 8 que muestra el crecimiento microbiano en medio KAA no expresa las UFC ya que el número de colonias aisladas no es significativo o bien no se detectó crecimiento alguno. Las muestras de lomo de cerdo no presentaron crecimiento en ninguno de los dos tiempos. La hamburguesa de ternera muestra crecimiento sólo en el recuento segundo y el conejo muestra crecimiento sólo en el primero. Las muestras de pechuga de pollo y de hígado mostraron crecimiento microbiano aunque muy escaso, en ambos tiempos.

Evaluación de la influencia del envasado en la cantidad y diversidad de microorganismos aislados

De los distintos alimentos utilizados para la realización de los experimentos, dos de ellos estaban presentes tanto en alimentos envasados como no envasados, con el objeto de analizar si hay diferencias significativas entre ambos. Estos dos alimentos son la pechuga de pollo y la hamburguesa de ternera. Para la comparación de estos dos tipos de alimentos, se realiza una media de los dos recuentos realizados (primer recuento o tiempo 0 y segundo recuento o tiempo 1).

➤ Pechuga de pollo

McConkey	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC
Pechuga de Pollo Envasado	Rosáceas y blancas	Bacilos cortos gram -	Positiva	5,1. 10 ⁴
Pechuga de Pollo No Envasado	Rosáceas y amarillentas	Bacilos cortos gram -	Positiva	0,91. 10 ⁴
MRS	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC
Pechuga de Pollo Envasado	Blancas pequeñas	Bacilos gram +	Negativa	0,55. 10 ⁴
Pechuga de Pollo No Envasado	Blancas pequeñas	Bacilococos gram +	Positiva	2,9. 10 ⁴
VJ	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC
Pechuga de Pollo Envasado	Blancas	Cocos gram +	Positiva	8,8. 10 ⁴
Pechuga de Pollo No Envasado	Blancas	Bacilos cortos gram +	Positiva	16,1. 10 ⁴
KAA	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC
Pechuga de Pollo Envasado	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Pechuga de Pollo No Envasado	Pequeños puntos blancos	Bacilos cortos gram +	Negativa	1,0. 10 ²

Tabla 9: Diferencias en las características macro y microscópicas, prueba de la catalasa y recuento para pechuga de pollo envasada y pechuga de pollo no envasada.

Como se puede observar en la Tabla 9, en lo que se refiere a características cualitativas (Tinción de Gram, prueba de la catalasa o características macroscópicas), no se observan apenas diferencias entre la pechuga de pollo envasada y no envasada en todos los medios excepto en el medio MRS, en el cual se observan distintos tipos de microorganismos en cuanto a su morfología microscópica y prueba de la catalasa. Además en el medio KAA no se ha observado crecimiento alguno en el alimento envasado.

En cuanto a la carga microbiana de ambos tipos de alimento, se observan diferencias muy significativas en los recuentos obtenidos, siendo siempre mucho más numerosas las UFC/g calculadas en los alimentos no envasados,

excepto en las muestras procedentes de pechuga de pollo sembradas en medio MacConkey.

➤ Hamburguesa de Ternera

McConkey	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC
Hamburguesa Ternera Envasado	Blancas	Bacilos cortos gram -	Positiva	5,6. 10 ⁴
Hamburguesa Ternera No Envasado	Rosáceas y amarillentas	Bacilos cortos gram -	Positiva	1,3. 10 ⁴
MRS	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC
Hamburguesa Ternera Envasado	Blancas pequeñas	Bacilos gram +	Negativa	7,7. 10 ⁴
Hamburguesa Ternera No Envasado	Blancas pequeñas	Cocos gram +	Positiva	14,2. 10 ⁴
VJ	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC
Hamburguesa Ternera Envasado	Amarillentas	Cocos gram +	Positiva	5,3. 10 ⁴
Hamburguesa Ternera No Envasado	Blancas y amarillentas	Cocos gram +	Positiva	4,7. 10 ⁴
KAA	Caract. Macroscópicas	Tinción	Prueba Catalasa	UFC
Hamburguesa Ternera Envasado	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Hamburguesa Ternera No Envasado	Blancas con halo oscuro	Cocos gram +	Negativa	0,5. 10 ²

Tabla 10: Diferencias en las características macro y microscópicas, prueba de la catalasa y recuento para pechuga de pollo envasada y pechuga de pollo no envasada.

En la Tabla 10, se observan diferencias cualitativas muy similares a las detectadas en muestras de pechuga de pollo. En este caso se observan colonias similares en los medios VJ y MacConkey, mientras que en el medio MRS los resultados de la tinción de Gram y la prueba de la catalasa varían en el alimento envasado y no envasado.

En lo que se refiere a la carga microbiana detectada en ambos tipos de alimento, de nuevo las UFC/g son significativamente superiores en el alimento no envasado para los medios MRS y KAA, similares en medio VJ y superiores para el alimento envasado en medio MacConkey.

Variabilidad de los resultados obtenidos en lotes procedentes de distintos tiempos

La utilización de los alimentos para su estudio en dos tiempos distintos nos permite comprobar si hay diferencias a lo largo del tiempo en muestras obtenidas en el mismo establecimiento.

Como se ha observado anteriormente, las características morfológicas, la prueba de la catalasa y la tinción no mostraban diferencias reseñables, pero sí

se detectaron diferencias en el número de UFC entre los alimentos del primer recuento y del segundo recuento.

Nuevamente, el medio KAA no es representado ya que el número de colonias obtenidas en las placas fueron inferiores a las necesarias para que los datos se puedan considerar significativos.

Las gráficas representan en logaritmo de las UFC/g, que nos sirve para relacionar los distintos resultados obtenidos.

Alimentos envasados

- Pechuga de Pollo

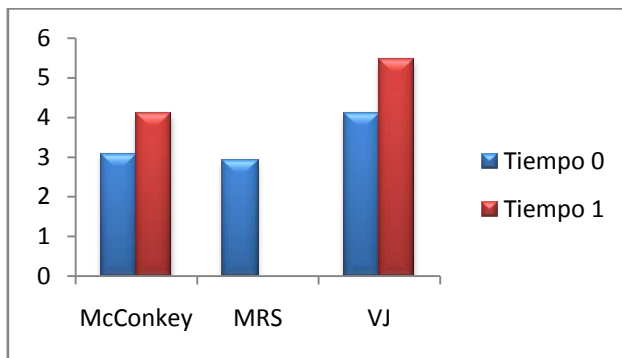


Gráfico 1: Diferencias en los tiempos 0 y 1 para pechuga de pollo envasada.

En el Gráfico 1 se puede observar, que a excepción del medio MRS, tanto en MacConkey como en VJ, el número de UFC obtenidas es mayor en el segundo tiempo.

- Hamburguesa de Ternera

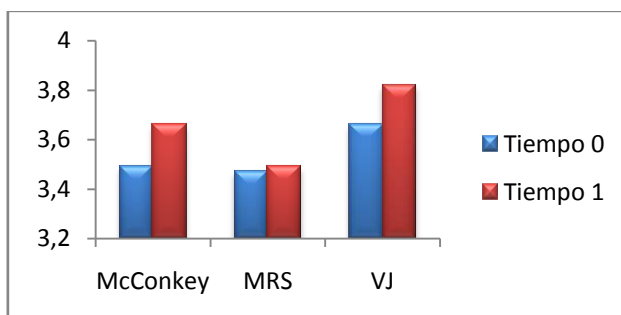


Gráfico 2: Diferencias en los tiempos 0 y 1 para hamburguesa de ternera envasada.

En el Gráfico 2, se observa que en todos los casos las UFC son más numerosas en el segundo tiempo, aunque las diferencias no son significativas.

- Hamburguesa de Pollo

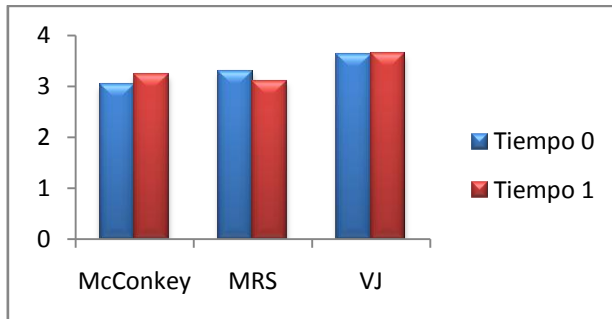


Gráfico 3: Diferencias en los tiempos 0 y 1 para hamburguesa de pollo envasada.

En esta Gráfica 3, las UFC formadas son muy similares en ambos tiempos. Para el medio VJ en ambos casos sobrepasaban $3 \cdot 10^5$, un número que se considera demasiado elevado para saber si es significativo, pero que se expone en la gráfica para mostrar que en ambos tiempos eran iguales.

- Longaniza de Pavo

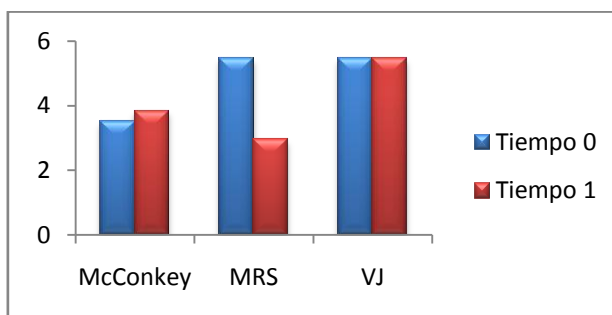


Gráfico 4: Diferencias en los tiempos 0 y 1 para longaniza de pavo envasada.

La Gráfica 4 muestra el recuento en medio MRS fue significativamente superior en el primer lote analizado. Para VJ y MacConkey los resultados se mantienen similares en ambos tiempos.

- Carne picada de Pollo

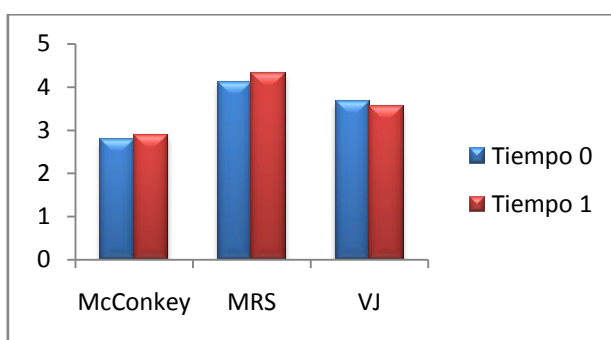


Gráfico 5: Diferencias en los tiempos 0 y 1 para carne picada de pollo envasada.

Esta Gráfica 5 muestra las UFC obtenidos tras la siembra de la muestra de la carne picada de pollo en los distintos medios. Nuevamente vuelven a ser similares en ambos tiempos, siendo mayor en el segundo recuento en MacConkey y MRS y mayor el primer recuento en VJ.

Alimentos no envasados

- Pechuga de Pollo

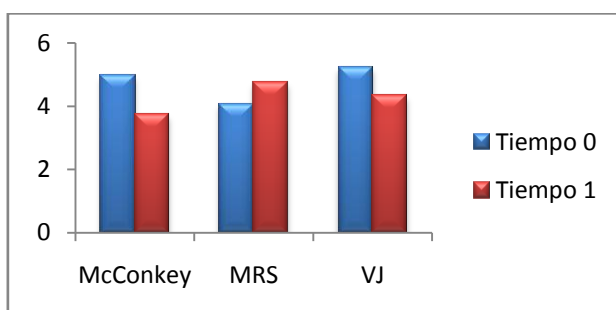


Gráfico 6: Diferencias en los tiempos 0 y 1 para pechuga de pollo no envasada.

La Gráfica 6 muestra, que salvo el medio MRS que presenta un mayor número de UFC en el tiempo 1, tanto MacConkey como VJ muestran un mayor número en el primer recuento.

En los alimentos no envasados se observa también, que el número de UFC formadas, son más elevadas en general que en alimentos envasados.

- Hamburguesa de Ternera

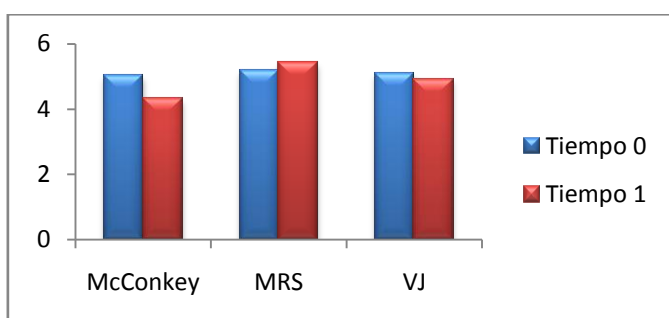


Gráfico 7: Diferencias en los tiempos 0 y 1 para hamburguesa de ternera no envasada.

En la Gráfica 7, se muestra que los valores de UFC son equivalentes en todos los medios en ambos tiempos, siendo ligeramente mayores en el tiempo 0 para los medios MacConkey y VJ y de forma contraria para MRS.

- Lomo de Cerdo

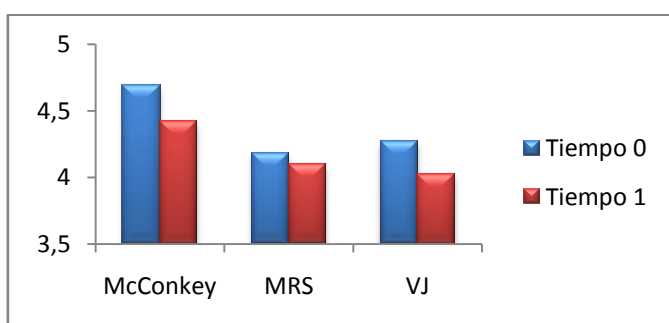


Gráfico 8: Diferencias en los tiempos 0 y 1 para lomo de cerdo no envasado.

En la Gráfica 8 se observa que en todos los medios, las UFC observadas en el primer recuento son más numerosas que las del segundo recuento, si bien las diferencias no son significativas.

- Hígado de Pollo

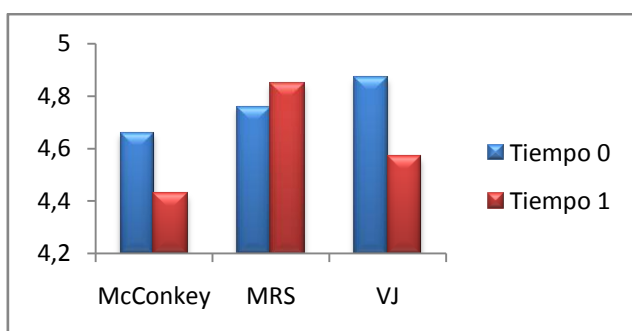


Gráfico 9: Diferencias en los tiempos 0 y 1 para hígado de pollo no envasado.

En esta Gráfica 9, se observan diferencias entre los tiempos 1 y 0 de los medios MacConkey y VJ, siendo más elevados para el primer recuento. Por el contrario, el medio MRS tiene una mayor cantidad de UFC para el segundo recuento, aunque la diferencia es menor.

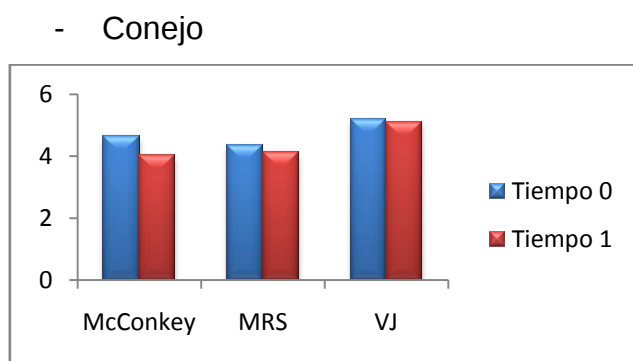


Gráfico 10: Diferencias en los tiempos 0 y 1 para conejo no envasado.

La Gráfica 10 muestra que las UFC observadas para las muestras de Conejo son similares a lo largo de los dos tiempos y en todos los medios, siendo ligeramente mayores para el primer recuento.

Como se observa en los resultados, las diferencias más significativas encontradas hacen referencia a la distinción entre los alimentos envasados y no envasados, sobre todo en el número de UFC/g. Por el contrario, las diferencias que hay entre los mismos alimentos en distintos tiempos son mucho menores, y en algunas ocasiones hay mayor número de microorganismos en el primer tiempo y en otras ocasiones se encuentra el efecto contrario.

Así, nuestros resultados indican que el envasado adecuado de productos cárnicos puede disminuir de forma eficaz la transmisión de infecciones microbianas a los consumidores, como ha sido puesto de manifiesto en estudios previos realizados con cepas de *Salmonella* (SoltanDallal *et al.*, 2014).

Nuestros resultados también corroboran el hecho de que los envases, son un impedimento eficaz para el crecimiento de microorganismos en general, ya que la suma de refrigeración y envasado en atmósferas modificadas, además de

impedir el crecimiento de determinados microorganismos, prolongan las fases de latencia y los tiempos de duplicación de la microbiota que puede desarrollarse en esas condiciones (Borges *et al.*, 1999).

Numerosos estudios recientes tienen como objetivo mejorar estas propiedades antimicrobianas de los envases de alimentos. La utilización de embalajes flexibles termoestables sin tratamiento térmico de los alimentos se presenta como una interesante alternativa al uso de materias tradicionales como latas o vidrios (Tribuzi *et al.*, 2014). Estos paquetes formados por plástico o metal flexible, ofrecen una buena resistencia mecánica y térmica, son una buena barrera de gases y tiene propiedades de termosellado (Holdsworth and Simpson, 2007).

La inhibición del crecimiento de microorganismos en alimentos envasados está también condicionada y es proporcional a la concentración de CO₂ inducida (Devlieghere and Debevere, 2000), ya que el CO₂ es un gas que tiene propiedades bacteriostáticas y es ampliamente utilizado en el envasado de los alimentos (Al-Nehlawi *et al.*, 2014).

La adición a los plásticos de envasado de sustancias antimicrobianas también ha demostrado ser una medida eficaz para evitar las contaminaciones alimentarias y, si se logra que estas propiedades antimicrobianas permanezcan estables bajo las condiciones de almacenamiento y manipulación habituales, pueden proporcionar aplicaciones de interés en los procesos de envasado llevados a cabo en la industria alimentaria (Li *et al.*, 2012), especialmente si se combina con el empleo de materiales biodegradables que permitan una mayor protección del medioambiente (Amna *et al.*, 2015).

7. CONCLUSIONES

1. Se han obtenido recuentos bacterianos significativos en las muestras de todos los alimentos cárnicos procesados analizados, tanto envasados como no envasados, excepto en el medio selectivo para enterococos KAA.
2. La identificación preliminar de los microorganismos aislados coincide en general con las características esperadas de acuerdo con los medios selectivos empleados (enterobacterias en medio MacConkey, bacterias lácticas en medio MRS y estafilococos en medio VJ).
3. Los alimentos envasados presentan en general una carga microbiana significativamente inferior a los alimentos no envasados, a excepción de las cepas aisladas en medio selectivo para enterobacterias, en que se obtuvieron recuentos superiores en las muestras procedentes de alimentos envasados.
4. No se encuentran diferencias significativas en cuanto a la diversidad de microorganismos aislados en alimentos envasados y no envasados.
5. Los recuentos obtenidos en lotes de alimentos comprados en el mismo establecimiento en distintos tiempos fueron similares en los dos grupos de alimentos cárnicos analizados.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Amna T., Yang J., Ryu K.S., Hwang I.H. (2015) Electrospun antimicrobial hybrid mats: Innovative packaging material for meat and meat-products. *Journal of Food Science and Technology* 52, pp. 4600-4606.
- Andersen, J.K., Sorensen, R. and Glensbjerg, M. (1991) Aspects of the epidemiology of *Yersinia enterocolitica*: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 13, pp. 231-238.
- Anderson G.E and Day P.R (1961) Two linkage groups in *Coprinus lagopus*, *Genet*, 45, pp. 414-423.
- Bailey J.S and Fletcher D.L and Cox N.A (1989) Recovery and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* from broiler chickens in the south Eastern. *J. Food Microbiology*, 23, pp. 227-230.
- Biemuller, G.W., Carpenter, J.A. and Reynolds, A.E. (1973) Reduction of bacteria on pork carcasses. *Journal of Food Science*, 38, pp. 261-263.
- Bothwell J., Simmons G.C and Frost A. (1975) A study of the number and phage patterns of *Staphylococcus aureus* in abattoir. *Aust. Vet. J.* 51, pp. 126-130.
- Childers A.B, Keahey E.E and Vicent P.G (1973). Sources of *salmonellae* contamination of meat following approved livestock slaughtering procedures. *II Journal of Milk and food Technology*. 36, pp. 635-638.
- Christensen, S.G. (1987) The *Yersinia enterocolitica* situation in Denmark. *Control of Microbiology and Immunology*, 9, pp. 93-97.
- Davies A.R, Board R.J and Board R.G (1998) Microbiology of Meat and Poultry.
- Esser K. and Kuenen R. (2012) Genetics of Fungi.
- 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, pp. 375-378.
- De la Rosa M. and Prieto J. (1997) Microbiología en ciencias de la Salud: Conceptos y aplicaciones, 8, pp. 75-88.
- 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. 71-80.
- Doyle, M.P. (1991) *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 12, pp. 289-302.
 - Gamazo C., López-Goñi I., Díaz R. (2005) Manual Práctico de Microbiología. En: Microbiología Ambiental de los alimentos, pp. 15-53; 133-163.
 - Gobat, P.F. and Jemmi, T. (1991) Epidemiological studies on *Listeria* spp. In slaughterhouses. *Fleischwirtschaft International*, (1), pp. 44-49.
 - 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, pp. 111-116.
 - 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, pp. 60-98.
 - International Commission on Microbiological Specifications for Foods Staff (2012) Micro-organisms in Food: Microbial Ecology of Food Commodities.
 - Kasprowiak R. and Hechelmann H. (1992) Weak points in the hygiene of slaughtering, cutting and processing firms. *Fleischwirtschaft International*. 2, pp. 32-40.
 - Kelly D.P and Wood A.P (1981) Mixotrophic growth of *Thiobacillus* A2 in chemostat culture on formate and glucose. *J Gen Microbiology*, 125, pp. 55-62.
 - Kelly P. and Neil A. (1990) Organic Sulfur Compounds in the environment Biogeochemistry, Microbiology and Ecological Aspects, 11, pp. 345-385.
 - Li W., Liu L., Jin T.Z. 2012. Antimicrobial activity of allyl isothiocyanate used to coat biodegradable composite films as affected by storage and handling conditions. *Journal of Food Protection* 75, pp. 2234-2237.
 - Lowry, P.D. and Tjong, 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.
- Mackey B.M and Roberts T.A (1993) Improving slaughter hygiene using HACCP and monitoring. *Fleischwirsch Int.* 2, pp. 115-124.
 - 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, pp. 642-645.
 - Meurant G. (1987) *Methods in Microbiology*.
 - 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, pp. 287-293.
 - Oosterom, J. and Notermans, S. (1983) Further research into the possibility of salmonella-free fattening and slaughter of pigs. *Journal of Hygiene (Cambridge)*, 91, pp. 59-69.
 - Panreac, Manual básico de microbiología Cultied (2003).
 - Patterson J.T (1968) Hygiene in meat processing plants. Methods of reducing carcasses contamination, 17, pp. 7-12.
 - Pascual, M^a R., Calderón, V. (2000) Microbiología alimentaria, metodología analítica para alimentos y bebidas.
 - Reynolds A.E and Carpenter J.A (1974) Bactericidal properties of acetic and propionic acids on pork carcasses. *Journal of Animal Science*, 98, pp. 515-519.
 - Rojo, M^a D., Periago P M^a and de Lorenzo C. (2013) Evaluación del empleo de miel artesanal en la conservación de carne picada de ternera.
 - Simonsen B., Bryan F.L., Christina J.H.B., Roberts T.A., Tompkin R.B and Siliker J.H (1987) Prevention and control of salmonellosis through application of HACCP. *International Journal of Food Microbiology*. 4, pp. 227-247.
 - Skelley G.C., Fandino G.E., Haigler J.H and Sherard R.C (1985) Bacteriology and weight loss of pork carcasses treated with a sodium hypochlorite solution. *Journal of Food Protection*. 48, pp. 578-581.

- Smith M.G and Davey K.R (1990) Destruction of *Escherichia coli* on sides of beef by a hot water decontamination process. *Food Australia*. 42, pp. 195-198.
- Smulders F.J.M (1987) Prospectives for microbial decontamination of meat and poultry by organic acids with special reference to lactic acid, in *Elimination of Pathogenic Organisms from Meat and Poultry*. Elsevier, pp. 319-344.
- Snijders J. (1988) Good manufacturing practices in slaughter lines. *Fleischwirtschaft*, 55, pp. 836-840.
- Soltan Dallal M.M., Sharifi Yazdi M.K., Mirzaei N., Kalantar E- 2014. Prevalence of *Salmonella* spp. In Packed and Unpacked Red Meat and Chicken in South of Tehran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 7(4):e9254.

PÁGINAS WEB UTILIZADAS:

- http://www.geocities.ws/urtis_micro/sesiones/Gram.htm
- www.scharlab.com
- <http://www.condalab.com>
- www.britanialab.com