



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de productos cárnicos frescos y condimentados.

Alumno: María Luz del Castillo Guirao.

Jaén, Septiembre, 2016.



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de productos cárnicos frescos y condimentados.

Alumno: María Luz del Castillo Guirao.

Jaén, Septiembre, 2016.

INDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Características nutricionales de la carne	5
1.2. La carne como medio de cultivo bacteriano	5
1.3. Clasificación industrial de la carne	7
1.4. Principales vías de contaminación	9
1.5 Grupos bacterianos alterantes en la carne	9
1.6 Grupos bacterianos del presente estudio.....	11
1.7. Métodos de conservación de la carne.....	15
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Alimentos empleados	17
3.2. Medios de cultivo	17
3.3. Materiales empleados	21
3.4. Procesado de las muestras.....	22
3.5. Sembrado de la muestra en placa	23
3.6. Identificación bacteriana mediante tinción de Gram.....	24
3.7. Prueba de la catalasa en colonias de estafilococos	25
4. RESULTADOS	25
4.1. Identificación y recuento de colonias en la primera sesión	26
4.2. Identificación y recuento de colonias en la segunda sesión.....	34
5. DISCUSIÓN	41
6. CONCLUSIÓN	43
7. BIBLIOGRAFÍA	44

RESUMEN.

Para llevar a cabo el siguiente trabajo se han escogido 11 muestras de carne agrupadas en dos categorías: muestras de carne de cerdo, pollo y ternera, picado y sin picar; y muestras condimentadas, chorizo, morcilla, hamburguesa de pollo, longaniza de pollo y filete de pavo. Con estas muestras se hace un recuento de las Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g) mediante su aislamiento en medios de cultivo selectivos sólidos. Posteriormente a las diferentes colonias obtenidas en dichos medios se le realiza la tinción de Gram y pruebas bioquímicas confirmativas. Realizando dichas pruebas se quiere observar si las muestras de carne picada obtienen un mayor recuento en UFC/g debido a su contaminación por la picadora. Por otro lado, con las muestras condimentadas, se quiere ver si la condimentación afecta al recuento de UFC/g, comparando dichas muestras con la muestra de cerdo y pollo. De manera generalizada en todos los medios sólidos se aprecia un aumento en las UFC/g en las muestras de carne picada con respecto a las muestras de carne sin picar. Por otro lado se observa que la condimentación no ha afectado al recuento de UFC/g con respecto al recuento en las muestras de pollo y cerdo.

Palabras clave: carne picada, unidades formadoras de colonias por gramo.

ABSTRACT.

To bring about this work we have chosen 11 piece of meat, we have done two groups. In the first one are pork meat, chicken and beef, and we have the same piece but this ones have been chopped. In the second one are spicy meat, in this group are sausage, blood sausage, chicken hamburger and sausage and the last one is turkey steak. We have cultivated the solution containing bacteria in different culture media, after that with all samples we have done a count with Colony Forming Unit per gram (CFU/g). In the different culture media we have isolate different bacteria and which one we have done a Gram staining and biochemical test. With these studies we want to compare the meat without chopped with meat samples which have been chopped in the machine. We want to see if the second one has got more CFU/g than the first one since the machine maybe was contaminated.

We have done the same with spicy meat, we want to compare if spicy meat had less CFU/g than chicken and pork meat samples. In general, in all culture media we have

seen that in mince is more CFU/g than the same samples without chopped. With spicy meat we have seen that CFU/g was the same comparing with pork and chicken meat therefore the condiments didn't do anything with bacterial colonies.

Key words: mince, colony forming unit per gram.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Características nutricionales de la carne

La principal característica nutricional del consumo de carne es su alto contenido en proteínas de alto interés biológico. La carne es fuente de minerales y vitaminas, son ricas en hierro, potasio y fósforo. Con respecto al aporte de vitaminas, su consumo, aporta vitaminas del grupo B y fundamentalmente del grupo B12, prácticamente inexistente en los vegetales (Vázquez et al., 2005). Las proteínas que contiene la carne son ricas en aminoácidos indispensables, casi todos los aminoácidos que contiene son absorbidos por el organismo debido a su excelente digestibilidad.

La presencia de lípidos de la carne, formados por ácidos grasos de alto interés nutricional. En el caso de los lípidos presentan mayor variación tanto en cantidad como calidad, su nivel depende de la relación entre grasa y agua, aunque su principal factor de variación se debe a la especie animal que se consuma.

La carne de vacuno se caracteriza por un elevado contenido en ácidos grasos saturados, por otra parte la carne de cordero es uno de los animales que mayor cantidad de grasa saturada presenta, también influye si la pieza que se consume proviene de un animal joven, que su grasa se puede eliminar con mayor facilidad ya que se encuentra bajo la piel, mientras que los de mayor edad presenta una difícil eliminación debido a que se encuentra dentro de las fibras musculares. En el caso del cerdo, su contenido en grasa de las piezas magras son menores que las piezas de pollo sin piel. La ventaja que presentan las aves es que la presencia de grasa se encuentra en su mayor parte en la piel por lo que puede ser eliminada con facilidad. Se puede concluir que la carne es capaz de cubrir las necesidades diarias de ácidos grasos esenciales (Gil, 2010).

1.2. La carne como medio de cultivo bacteriano.

La carne es un medio rico en diversos nutrientes como son, los hidratos de carbono, nitrógeno, vitaminas entre otros. Todos ellos son requeridos para el crecimiento bacteriano. Además presenta una serie de factores propios de la carne que ayudan a la proliferación bacteriana como, la temperatura que presenta la carne, el agua disponible, la presión osmótica, el potencial de oxidación-reducción (reacciones REDOX), pH y la composición atmosférica.

- El **agua** que contiene la carne, su situación en la pieza y la disponibilidad de uso por las bacterias, son de los factores más importantes que influyen en el crecimiento bacteriano. De hecho las bacterias, en general, requieren de medio acuoso en el que desarrollarse. La necesidad de agua de los microorganismos se expresa como el A_w , que se define como la relación existente entre la presión del vapor de agua de una solución y la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura. El crecimiento bacteriano se produce entre valores de A_w que oscilan entre 0,75 y 1,0. Observando estos valores se puede comprender que se produzca crecimiento en la carne fresca ya que su valor, normalmente, está cercano a 0,99.

- Cada microorganismo presenta su propio **pH** para su crecimiento. La mayoría de ellas crecen mejor a pH cercano al neutro, siendo su óptimo entre 7,2-7,6. Los valores de pH que presenta una pieza de carne se pueden ver alterados debido a la cantidad de ácido láctico producido, ya que si los animales han sido sometidos a estrés, ayunos prolongados o se encuentra fatigados antes de su sacrificio, la cantidad producida de ácido láctico será baja por lo que el pH será bajo, siendo propicio para el crecimiento bacteriano. El pH de la carne de ternera varía entre 5,1-6,2; la de cerdo entre 5,3-6,9. Cuando se produce una variación en el pH de la carne, por pequeña que sea, es determinante en la velocidad de crecimiento ya que esta la ralentiza (Amerling, 2001).

- Debido a la cantidad de **nutrientes** de la carne, antes mencionados, debido al contenido de proteínas e hidratos de carbono de la carne hace que sea un medio propicio para su crecimiento ya que estas requieren alimentos que contengan gran contenido de ambas.

- Las bacterias que son alterantes de la carne generalmente son del tipo **aerobio**, o crecen más lentamente si existe menor tensión de oxígeno. Debido a esto la proliferación bacteriana será mayor en carnes picadas que en piezas que se encuentran en las medias canales y los cuartos del animal.

- La **temperatura** es una componente decisivo en el crecimiento bacteriano ya que conservadas a temperaturas bajas su fase latencia es más larga, por lo que la velocidad de crecimiento y proliferación será menor (Arguedas, 1998).

1.3 Clasificación industrial de la carne

1.3.1 Productos cárnicos frescos: Parte muscular de animales de abasto, comestible. Se incluye la grasa, huesos, piel, cartílagos, tendones, nervios, vasos linfáticos y sanguíneos, que circundan el tejido muscular (Pascual, 1982). Son preparados sin ser tratados con temperatura. Pueden ser picados y embutidos, o sólo picados. Dentro de los que son picados, en los que no se le añade ninguna condimentación se encuentra la carne picada y hamburguesas. Este tipo de productos tienen el mismo comportamiento que la carne fresca en cuanto a su conservación (Rodríguez et al., 2008).

1.3.2 Carne curada: Originariamente la curación de la carne sólo consistía en adicionarle sal común. Más tarde se comenzó con la adición de nitratos y azúcares con el mismo objetivo pero buscando también añadirle sabor a la carne. En la actualidad se sabe que el responsable de la pigmentación termoestable de las carnes curadas se debe a la acción del nitrito, resultante de la reducción por parte de las bacterias reductoras de nitratos, a nitritos. Desde el punto de vista industrial se considera que los factores clave del curado, a parte de la conservación de su sabor, la textura, y su rendimiento para conseguir los mejores resultados en el curado, es importante tener en cuenta factores extrínsecos siendo:

- La naturaleza de las sustancias empleadas en la curación.
- La temperatura durante la realización del trabajo.
- El método seguido para la incorporación de los ingredientes del curado.
- El tamaño de la pieza.
- La cantidad de grasa de cobertura (Bedolla et al., 2004).

Dentro de las carnes curadas se encuentra, chorizo, lomo embuchado, chistorra, chorizo de Pamplona, salchichón, salami entre otros. En este apartado se va a explicar qué es el chorizo.

- Chorizo: se entiende por chorizo a la mezcla de carnes picadas o troceadas, tocino y vacuno, con o sin grasa de cerdo con sal, pimentón y otras especias, condimentos y aditivos. Estos ingredientes son amasados e introducidas en tripas

naturales, procedentes del intestino del cerdo, vaca o de oveja incluso algunas se han hecho también con cabra y caballo (De Oña et al., 2012), o artificiales. Una vez formado el embutido, sufre un proceso de maduración con desecación. Estos pueden estar ahumados o no (Pascual, 1982).

- **Fermentación de la carne**

Para la elaboración de determinados productos cárnicos como el chorizo necesitan un proceso de fermentado por microorganismos. Los organismos más empleados en la industria cárnica como cultivo iniciador son las bacterias lácticas, las micrococáceas, los mohos y las levaduras. Las bacterias lácticas son las más empleadas en esta industria para la fermentación de la carne, siendo dos géneros los más empleados *Lactobacillus* y *Pediococcus*.

Los mohos suele desarrollarse de forma espontánea en la superficie de la carne y elaborados cárnicos. Forman micelios en ella, tapices de células enganchadas que no se separan totalmente cuando se dividen denominándose flor del embutido. Generalmente se comercializan como liofilizados o concentrados líquidos, los cuales pueden ser pulverizados sobre la superficie de las tripas de los embutidos para la generación de mohos en dicha superficie. El género empleado para llevar a cabo dicha función es *Penicillium* (Morcillo et al., 2013)

Los hongos y levaduras poseen enzimas proteolíticas y lipolíticas que al actuar sobre las proteínas y las grasas respectivamente, generan compuestos que proporcionan aromas y el sabor característicos del embutido. La inoculación de los embutidos con hongos y levaduras tiene las siguientes ventajas con respecto a las bacterias.

- La velocidad de pérdida de agua es uniforme debido a la capa de micelio que se forma en la superficie del embutido.
- Algunos de ellos producen catalasa, una enzima que reduce la cantidad de peróxido de hidrógeno presente en el embutido previniendo la pérdida del color y el enranciamiento producido por el secado (Hernández, 2001).

1.3.3 Embutidos cocidos: dentro de este grupo se encuentra la morcilla (embutido de sangre). El embutido de sangre está elaborado con sangre desfibrinada y colada. A parte de la sangre también contiene carne y condimentos. Al ser un embutido cocido se ahúma al final en frío a 20 grados centígrados durante 30 a 120 minutos (Amerling, 2001).

1.4. Principales vías de contaminación

Los alimentos en general y la carne en particular, son un caldo muy adecuado para el crecimiento bacteriano, ya sea propio del producto o adquirido por una mala manipulación y mala conservación. La carne adquiere microorganismos desde el mismo momento en el que entra en el matadero. Algunos de ellos pueden causar enfermedades en el propio consumidor pero en la mayoría de los casos son los encargados de la alteración del producto. El principio fundamental, desde su llegada al matadero hasta que es vendida al consumidor, consiste en reducir la llegada de posibles microorganismos ajenos y evitar una mayor proliferación de los microorganismos preexistentes en la carne (Moreno, 2006)

Cuando los animales son sacrificados, ciertos microorganismos son capaces de atravesar la barrera intestinal, ya sea por la ausencia de ayuda, porque el animal se encuentra fatigado o se trata de animales enfermos, entre otros factores, antes de su sacrificio. Una vez pasa por esta barrera llega al músculo y de ahí pasa a vía sanguínea. Durante el desuello, evisceración y despiece, es muy fácil la contaminación del canal o pieza de carne por microorganismos provenientes del suelo, intestino, del ambiente o incluso de las personas que lo manipulan. Los instrumentos empleados para la obtención de las piezas de carne también pueden causar contaminación. Una vez extraídas las piezas se depositan para su conservación en el frigorífico, que suele guardarse con otras piezas de carne, las cuales también pueden provocar contaminación cruzada, al estar unas cerca con otras. Finalmente una nueva contaminación puede ocurrir, en el punto de venta durante su almacenamiento si las condiciones higiénicas no son favorables (Pascual et al., 2000).

1.5. Grupos bacterianos alterantes en la carne.

La piel de los animales es la principal fuente de contaminación de la carne. En la piel se encuentran los mismos microorganismos presentes en la canal del animal. Dependiendo de la procedencia de la carne presenta unos tipos bacterianos u otros, así en la carne de res suele contener *E. coli* y *Salmonella*, mientras que en la carne de pollo y aves en general aparecen *Salmonella*. En la superficie de la carne se han reportado *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium prefringes* (UJAT, 2007).

- *Listeria monocytogenes* se encuentra muy distribuido en la naturaleza, en estrecha relación con el suelo. Se encuentra en el suelo, heces de personas y animales, aguas residuales de explotación de animales, por lo que se explica que este tipo bacteriano se encuentre en la carne. La bacteria se puede encontrar sobre superficies húmedas en las plantas procesadoras de alimento ya que es capaz de aguantar bien las bajas temperaturas (Sánchez et al., 2009).

- Los integrantes del género *Campylobacter* se encuentra muy distribuido en la mayoría de animales de sangre caliente y animales salvajes, aunque su prevalencia se encuentra en alimentos de origen animal como es el pollo, bovino y en oveja. Esta bacteria se encuentra en el contenido intestinal en el ganado ovino, ovino y en aves de corral. La contaminación de su carne se produce cuando se pone en contacto con las heces en el proceso de sacrificio y en preparación de la canal.

- El género *Salmonella* es capaz de colonizar los ovarios de las gallinas ponedoras incluso llegando a infectar la yema del huevo (Pascual, 2005). La bacteria parece que no se encuentra en el intestino del animal sino que la infección se produce por el ambiente en el que viven las aves de corral, así como los piensos destinados en su alimentación y por la cría de este animal de forma intensiva.

- *Staphylococcus aureus* enterotóxico se encuentra en las aves de corral, la contaminación en la carne se produce cuando entran en el matadero ya que la bacteria la llevan adherida en las patas, plumas y vías respiratorias, entre otros (Pardo et al., 1998).

- *Clostridium perfringes* se encuentra en pequeña cantidad en la carne cruda. Cuando aparece en productos lácteos y sus derivados es debido a que se ha producido una contaminación de las ubres con heces. Su presencia en la carne cruda aumenta cuando las condiciones de conservación no son las adecuadas. Debido a su amplia distribución en el ambiente y su resistencia por esporas hace que se pueda aislar en numerosos alimentos (Anderson, 2005).

- *Yersinia enterocolitica* su aparición se relaciona con el consumo de carne de cerdo, ternera y oveja. La causa exacta de la contaminación se desconoce aunque se sabe que esta especie tiene alta permanencia en el suelo y aguas por lo que hace que sea posible las elevadas contaminaciones alimentarias (Hernández y Sastre, 1999).

- *E. coli* el origen de este microorganismo es principalmente en ternera, encontrándose también en aves, cerdos y ovejas. Estos animales son portadores sanos asintomáticos. Durante su sacrificio y carnización en el matadero, es cuando se produce la contaminación de la superficie de la canal procedente del intestino y de los restos de heces que se hallan en la piel. En los alimentos que más frecuentemente aparece es en la carne picada, hamburguesas que no se han preparado adecuadamente (Moreno, 2006).

1.6. Grupos bacterianos del presente estudio

En el desarrollo del siguiente proyecto se han empleado medios para identificación de distintos grupos bacterianos, los cuales se van a desarrollar en el siguiente apartado.

- Bacterias lácticas.

Este tipo de bacterias son capaces de producir ácido láctico mediante el proceso de fermentación. Durante la glucólisis, siendo el primer paso de la fermentación láctica, la oxidación de una molécula de glucosa produce la formación de dos moléculas de ácido pirúvico. En esta reacción se genera la energía necesaria para la formación de ATP. Después el ácido pirúvico es reducido a NADH para formar dos moléculas de ácido láctico. Debido a que no se produce una oxidación posterior la mayor parte de la energía que se produce queda almacenada en el ácido láctico, por ello es un proceso del que se obtiene muy poca energía (Tortora et al., 2007).

Existen dos importantes géneros de bacterias productoras de ácido láctico, siendo, *Streptococcus* y *Lactobacillus*.

- Características generales de *Streptococcus*.

Se tratan de anaerobios facultativos, sin embargo algunas cepas crecen mejor ante condiciones anaerobias aunque casi todas las cepas crecen al aire, su aumento se ve estimulado por la presencia de dióxido de carbono. Se trata de un tipo bacteriano homofermentador, ello quiere decir que el único producto que pueden producir de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico, sin producción de gas. Se trata de organismos catalasa negativos. La composición de la pared de los estreptococos es similar al resto de las bacterias grampositivas, compuestas principalmente de peptidoglucano, en el cual se encuentran inmersos hidratos de carbono, ácidos teicoicos, lipoproteínas y antígenos de superficie (Winn et al., 2008).

Antigénicamente, se han clasificado en 13 grupos, según la clasificación de Rebeca Lancefield, en base al carbohidrato C de la pared celular y son nombrados de la A a la O. Los grupos A, B y C son betahemolíticos. El resto son no hemolíticos o alfa hemolíticos, lisis parcial (Oliva, 2001). El sistema de Lancefield, desarrollado por la microbióloga Rebeca Craighill Lancefield, es un sistema de clasificación muy empleado hoy día para la identificación de los distintos grupos de estreptococos.

- Características generales de *Lactobacillus*.

Son acidógenos y acidúricos. Viven y se reproducen en entornos ácidos, presentan metabolismo oxidativo y fermentativo. Se denominan homofermentativas a aquellas bacterias de este género que solo pueden fermentar para dar ácido láctico a partir de glucosa. Dentro de este género también hay del tipo heterofermentativo, siendo, las que además de ácido láctico también elaboran otros productos como, ácido acético y dióxido de carbono (Negroni, 2009).

El género *Lactobacillus* se emplea para la producción de productos fermentados por inoculación natural. Pueden crecer a temperaturas bajas lo que lo hace apropiado para la elaboración de embutidos secos. La cepa más empleada es *Lactobacillus platarum*, lo que le permite su utilización cuando se requiere amplios intervalos de temperatura.

🚦 *L. platarum*: son bacterias Gram positivas cuyo crecimiento óptimo se encuentra entre los 25-30 grados centígrados, su crecimiento se ve inhibido cuando la temperatura se encuentra por debajo de los 7 y a temperaturas mayores de 40 grados centígrados. Esta cepa es tolerantes a medios con gran concentración de sal, creciendo a concentraciones mayores del 9%. Fermentan gran cantidad de compuestos azucarados como por ejemplo fructosa, glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, entre otros. Es anaerobio facultativo, no produce la reducción de nitratos (García et al., 2004).

- Características generales del género *Staphylococcus*.

El género *Staphylococcus* son cocos Gram positivos aerobios, anaerobios facultativos e inmóviles, no forman esporas y presentan un tamaño de 0,5 a 2 micrómetros. Se agrupan formando racimos, catalasa positivos y fermentan azúcares. Crecen bien en medios generales y son muy resistentes a agentes de origen externo, de ahí que estén ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son inusualmente resistentes a los cambios ambientales, tales como el calor, presión osmótica, la desecación, lo que le permite vivir en muchos alimentos que contiene

gran concentración de azúcares o de sal. Frecuentemente aparecen en la flora normal de las mucosas y la piel, en heridas y en general en distintos procesos patógenos.

Dentro de este género se distinguen las siguientes especies:

- *Staphylococcus aureus*: se trata de la especie más patógena humana, es agente etiológico de muchas infecciones. También se le conoce a esta especie como el bacilo dorado debido a su coloración inconfundible, es un coco Gram positivo, que suele presentarse en forma de racimo de uva, presenta un pigmento no difusible de color amarillo. Bioquímicamente produce coagulasa y además son fermentadoras de manitol. En su pared se han encontrado alrededor de 30 antígenos distintos, siendo los más importantes el polisacárido A que inducen a la formación de anticuerpos.

- *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*: se trata de estafilococos de tipo oportunista, sólo infecta en situaciones en las que el paciente se encuentra debilitado, casos de patogenicidad. Se encuentra en el medio ambiente, en la piel y mucosas. Este tipo bacteriano no fermenta el manitol, no produce coagulasa y no forma el pigmento amarillo como en el caso de *S. aureus* (Granados et al., 1997).

- Bacilos entéricos y coliformes.

Las *Enterobacteriaceae* están formadas por numerosas especies de bacilos Gram negativos, no esporulados. Desde el punto de vista nutricional no son exigentes y son capaces de crecer en medios con presencia de oxígeno como ante su ausencia. Tiene alta actividad metabólica, son fermentadores de glucosa. Que se encuentran en diversos hábitats naturales, con capacidad patogénica distinta. Están agrupados en la misma familia por su semejanza en el genoma, es decir, por sus similitudes estructurales y metabólicas. En la actualidad está formada por 30 géneros, 110 especies. Las enterobacterias presentan en la membrana externa de la pared un lipopolisacárido con capacidad antigénica (Ag O), actuando como endotoxina, responsable de la activación de diversos sistemas implicados en la respuesta inflamatoria. Algunas de ellas presentan una capsula de polisacárido que también tiene función antigénica (Ag K). Poseen flagelos peritricos compuesto por proteínas que igualmente presenta carácter antigénico (Ag H) (Ausina, 2005).

- Características del género *Echerichia*.

Este género está formado por dos especies, *E. coli* y *Echerichia hermanii*, este último pocas veces genera infección en los humanos.

E.coli es la bacteria que se encuentra más frecuentemente en las materias fecales del hombre y de diversas especies de animales. Se encuentra de manera natural en el intestino delgado y grueso, forma parte de la flora natural intestinal hallándose en calidad de saprobio sin causar daño alguno. Sin embargo muchas cepas de *E. coli* generan sustancias que tienen un probado efecto inhibitorio sobre otras cepas del mismo género que sí causan patogenicidad en el hospedador, por lo que presentan un efecto beneficioso en el organismo que se encuentra.

E. coli se trata de un bacilo Gram negativo, las colonias de este tipo bacteriano se aprecian en los medios de cultivo como una colonia verde con marcado brillo metálico, esta coloración se aprecia en el medio EMB, lo que con una sola cadena espiral de ADN, móvil, aerobio o aerobio facultativo presentando flagelos peritricos, no fabrican esporas. En las pruebas bioquímicas es positiva al indol, descarboxilasa de lisina, fermentación de manitol y gas a partir de la glucosa (Romero, 2007).

- Características generales del género *Salmonella*.

Estas bacterias son del tipo Gram negativas, presentan forma de bastón, de longitud variable según la especie de *Salmonella*. La mayoría de ellas son móviles por flagelos peritricos. Crecen con facilidad, tiene la capacidad de resistir a la acción de la bilis y permanecer en la vesícula biliar, casi ninguna son capaces de fermentar lactosa o sacarosa y normalmente suele producir ácido sulfhídrico. Son resistentes a algunos químicos que inhiben el crecimiento de otras bacterias intestinales. Para la identificación de las distintas especies del género se realiza mediante sus características bioquímicas, los grupos se identifican mediante pruebas antigénicas ya que las *Salmonellas* presentan antígeno Vi o capsular, antígeno H o flagelar, y antígeno O también denominado como somático, identificados mediante la reacción que se produce al poner en contacto al antígeno con un anticuerpo contra dichos antígenos. Dentro de este género se encuentran,

🚩 *Salmonella typhi*: es considerado como un parásito intracelular ya que es capaz de multiplicarse en el interior de los macrófagos (Castro, 2014). Especie con un sólo serotipo, crece en medio habituales, son capaces de fermentar la glucosa y son oxidasa negativo. Es aerobia o anaerobia facultativa, móvil, por flagelos dispuestos en su periferia. La pared celular es compleja. Presenta el lipopolisacárido que actúa como endotoxina (Leal, 2008).

- Características generales de *Shigella*

Bacilos no esporulados, Gram negativos e inmóviles. Pueden ser aerobios o anaerobios facultativos. El reservorio primordial de esta bacteria es el intestino humano de un enfermo o portador (García, 2003). Presenta 40 serotipos distintos, estos son clasificados de la siguiente manera:

✚ Grupo A: *Shigella dysenteriae*, causante de la disentería particularmente grave. Provoca una neurotoxina fatal en niños, no es capaz de fermentar la lactosa, el manitol y es negativa para la reacción de la ornitina-descarboxilasa.

✚ Grupo B: *Shigella flexneri* esta especie en ocasiones causa disentería grave, se conocen seis serotipos diferentes. Son fermentadoras de manitol pero no la fructosa, siendo negativa para la ornitina-descarboxilasa (Bennington, 2000).

✚ Grupo C: *Shigella boydii* comprende dieciocho serotipos distintos, *S. boydii*, se parece bioquímicamente pero no por antígeno a algunos *S. flexneri*. Los caso por disentería por esta especie son menos comunes (Chandra, 2009).

✚ Grupo D: *Shigella sonnei* positiva para la ornitina-descarboxilasa. Lactosa positivo, es capaz de fermentar la lactosa después de varios días de incubación (Engelkirk, 2008).

Algunas de sus cepas son capaces de sintetizar citotoxinas, como *S. dysenteriae*, que produce la citotoxina llamada shigatoxina. Otros serotipos de esta familia también generan una neurotóxica, si bien no están bien identificadas se conoce que son las responsable que los múltiples manifestaciones neurológicas producidas por la infección por shigelosis (López, 2002).

- Características generales del género *Proteus*.

Proteus es una bacteria Gram negativa que se encuentra dentro de la familia *Enterobacteraceae*. Capaz de hidrolizar la urea y formar amoníaco y dióxido de carbono. Juega un papel muy importante en la descomposición de la carne. Se encuentra de forma natural en el tracto intestinal tanto de humanos como de animales, de hecho se suele encontrar en las heces. Es un patógeno oportunista que infecta el tracto urinario. *Proteus mirabilis* se encuentra a menudo en perros, vacas, cerdos y aves, siendo más frecuente su aislamiento en cerdos que en perros (Liu, 2011).

1.7. Métodos de conservación de la carne

El motivo por el cual se conservan los alimentos no es sólo por evitar el crecimiento bacteriano en ellos, sino también para evitar posibles efectos físicos que se producen como la desecación del producto, pérdida por oxidación de las vitaminas. Efectos biológicos ya que se produce el ablandamiento de la carne en sus propios fermentos, siendo beneficioso para el producto si se lleva a cabo de manera controlada. Los principales procesos para la conservación de los alimentos y así aumentar la vida útil del producto son:

- *La refrigeración*: se trata de someter el producto a bajas temperaturas sin llegar a obtener la rigidez en el producto. Este es el método más empleado en conservación de los alimentos. Con la disminución de la temperatura se consigue que la proliferación bacteriana no sea tan rápida como en condiciones de temperatura ambiente. Para conservar los alimentos durante un largo periodo de tiempo no es método más apropiado. La refrigeración se lleva a cabo en alimentos crudos o cocinados para ser mantenido en un estado higiénico sanitario adecuado (Laza y Laza, 2006). La refrigeración actúa como bacteriostático, ya que a temperaturas de 0 y 7 grados centígrados la actividad metabólica de la mayoría de los microorganismos se encuentra muy reducida. Algunas bacterias las psicrófitas, capaces de vivir en condiciones de temperatura baja como ocurre en el caso de *Listeria*.

- *Congelación*: tanto la realizada en el ámbito doméstico como en el ámbito industrial, es el método más antiguo y dañino para las bacterias cuando se lleva a cabo lentamente. Cuando se congela se forman cristales de hielo en el interior de las células bacterianas ocasionando la lisis celular y molecular de dichos microorganismos (Negroni, 2009).

2. OJETIVOS.

- Análisis microbiológico para detección y cuantificación con medios selectivos de bacterias lácticas, bacilos entéricos, *Staphylococcus* y *Streptococcus* en muestras de carne.

- Ante la determinación de altos niveles de algún microorganismo contaminante, determinar su posible origen.

- Medición de la variación en el recuento de Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g) mediante medios selectivos sólidos entre las muestras de carne sin picar con respecto a las muestras picadas.

1. Conocer si las muestras de carne picada adquieren un mayor recuento de UFC/g debido a la picadora.

- Medición de la variación en el recuento de UFC/g entre las muestras de pollo y cerdo con respecto a las muestras condimentadas.

1. Conocer si afecta la condimentación en el crecimiento bacteriano.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Alimentos empleados.

Para la realización del proyecto se emplearon 11 muestras de productos cárnicos comprados en un pequeño comercio de la provincia de Jaén. Todos los productos que aparecen en este estudio han sido obtenidos en el mismo establecimiento en periodos de tiempo distintos, con un desfase de 7 días.

Las muestras empleadas se dividen en tres categorías; carne de pollo, ternera y cerdo picada y sin picar, y por último alimentos de elaboración casera por el propio establecimiento.

En la **primera sesión** se emplean las muestras 6 de carne picada y sin picar. Estas, provienen de la misma pieza de carne y están mantenidas sin ningún tipo de aditivo o conservante. Estas muestras se comparan entre sí para conocer la carga microbiológica que presentan ambos tipos, obteniendo una comparativa de antes y después de pasar por la picadora.

En la **segunda sesión** se emplearon 5 muestras caseras. Los alimentos son: chorizo, morcilla, hamburguesa y longaniza de pollo, y filete de pavo, todas, condimentadas. Todos ellos han sido elaborados por el mismo vendedor del establecimiento, siendo vendidas crudas.

3.2 Medios de cultivo

Para el análisis microbiológico se emplean diferentes medios de cultivo de las casas comerciales *Panreac*® y *Sharlau*®. Para su preparación se siguen las indicaciones presentes en el etiquetado de cada medio.

3.2.1 Medio de cultivo no selectivo: Triptona Soja Agar (TSA).

Se emplea como medio de uso general para todo tipo de microorganismos. Por su contenido de peptona de soja y peptona de caseína conlleva una aportación de nutrientes que permite el óptimo desarrollo de un gran número de microorganismos, tanto exigentes como no exigentes. Se puede emplear tal cual o como base para realizar medios especiales.

Composición (g/l):

Digerido de Papaínico de Soja	5,0
Digerido de pancreático de Caseína	15,0
Sodio cloruro	5,0
Agar	15,0

pH: 7,3±0,2.

Preparación: en el etiquetado de TSA explica que por cada litro de agua destilada se echa 40 gramos de medio. En nuestro caso se prepararon 800 ml de agua destilada por lo que se depositaron 32 gramos de medio en un matraz erlenmeyer de 1000 ml. A continuación el matraz se tapa con algodón hidrófobo y papel de aluminio, y se introduce en el autoclave a 121°C durante 20 minutos. Pasado este tiempo se atempera en el baño maría a 50°C, después de extienda en placa (Manual Básico de Microbiología, Cultimed, Panreac).

3.2.2 Medios de cultivo selectivos.

3.2.2.1 MRS, Agar (medio deshidratado), CULTIMED.

Este medio se utiliza para el cultivo y recuento de *Lactobacillus* y bacterias de ácido láctico. Se emplea tanto para productos alimentarios en general como lácteos. Debido a su presencia de peptona, glucosa y manganeso aporta los nutrientes y energía para el crecimiento de Lactobacilos. El di-Amonio Hidrógeno Citrato inhibe el desarrollo de la mayor parte de microorganismos que pueden contaminar la muestra. El di-potasio Hidrogeno Fosfato se utiliza para la estabilización del medio de cultivo. El Tween ® aporta ácidos grasos. Este medio es ideal para el crecimiento de todas las cepas de *Lactobacillus* incluidas aquellas de proliferación lenta y difícil.

Composición (g/l):

di-Amonio Hidrógeno Citrato	2,0
Extracto de Carne.....	8,0
Extracto de Levadura	4,0
D(+)-Glucosa	20,0

Magnesio Sulfato.....	0,2
Manganeso (II) Sulfato	0,05
Peptona Bacteriológica.....	10,0
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	2,0
Sodio Acetato	5,0
Tween 80.....	1,0
Agar	10,0
pH: 6,2±0,2.	

Preparación: en la etiqueta del bote de MRS explica que hay que echar 62 gramos de medio por cada litro de agua destilada. En este caso se prepararon dos matraces de 400 ml por lo que se van a emplear 24,8 gramos de medio. Después de tapa con algodón hidrófobo y papel de aluminio y se introduce en el autoclave a 115°C durante 20 minutos. Después se atempera en el baño maría a 50°C, a continuación se extiende en placa (Manual Básico de Microbiología, Cultimed, Panreac).

3.1.2.2 Eosina azul de metileno, Agar (medio deshidratado), CULTIMED.

Se utiliza para la detección y diferenciación de bacilos entéricos y coliformes. En este medio se puede identificar *Echerichia coli* y *Enterobacter*.

La eosina y el azul de metileno son factores que inhiben parcialmente el crecimiento de microorganismos Gram positivos. Permite la identificación los gérmenes lactosa-positivos de los lactosa-negativos, debido a la combinación de eosina y azul de metileno. Los coliformes dan colonias violeta oscuro, mientras que las lactosa-negativas dan colonias sin color.

Composición (g/l):

Eosina	0,4
Azul de metileno	0,065
Lactosa.....	10,0
Peptona de Gelatina.....	10,0
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	2,0
Agar	15,0
pH: 7,1±0,2.	

Preparación: en la etiqueta comenta que por cada litro de agua destilada se echa 36 gramos de medio. Se prepararon dos matraces de 400 ml y se echan 14,4 gramos de medio. A continuación se tapa con algodón hidrófobo y papel de aluminio

y se deposita en el autoclave a 121°C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se atempera al baño maría a 50°C y se extiende en placa (Manual Básico de Microbiología, Cultimed, Panreac).

3.2.2.3 Vogel Johnson, Agar (VJ AGAR).

Medio solido muy selectivo para la identificación y aislamiento de Estafilococos manitol-positivos. Debido a que el medio contiene cloruro de litio, glicina y telurito de potasio aportan a este medio una gran acción selectiva. Los estafilococos reducen el telurito a telurio metal donde se aprecian colonias negras sobre fondo de color rojizo, si estas no son fermentadoras de manitol. Los que sí son fermentadores del manitol, (considerados como patógenos), presentan colonias negras rodeadas de halo amarillo. El viraje en el color en este medio se emplea como indicador de cambio de pH que se producen por acumulación de productos de origen ácido, debida a la fermentación del manitol. La selectividad del medio solo dura 24 horas, una vez ha pasado este tiempo pueden crecer otros tipos de microorganismos que no son lo que se están buscando en este medio selectivo.

Composición (g/l):

Caseína peptona	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±0,2.

Preparación: en el etiquetado del frasco indica que hay que echar 60 gramos de medio por cada litro de agua. Se han preparado dos matraces erlenmeyer de 400 ml de agua destilada por lo que se preparan 24 gramos de medio. Una vez realizado este paso se tapa el matraz con algodón hidrófobo y papel de aluminio y se introduce en el autoclave para su esterilización a 121°C durante 20 minutos, después se atempera en el baño maría a 50°C y se extiende en placa (Manual Básico de Microbiología, Cultimed, Panreac).

3.2.2.4 Kanamicina esculina azida, Agar (KAA Agar)

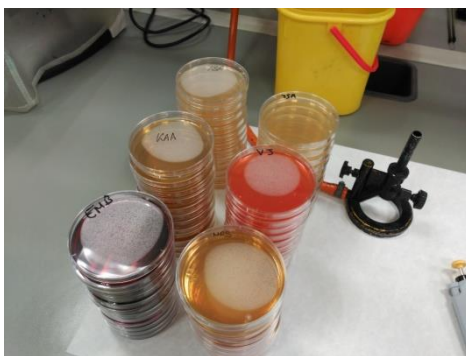
Medio para detección confirmativa de aislamiento de estreptococos del grupo D de Lancefield en muestras de alimentos. Debido a la presencia de esculina en el medio, las colonias bacterianas, se puede apreciar que son de color negro; este color es debido al proceso de hidrólisis de la esculina que realizan estas, hasta esculetina.

Composición (g/l):

Triptona	20,00
Extracto de levadura.....	5,00
Cloruro de sodio	5,00
Citrato disódico	1,00
Esculina	1,00
Azida de sodio	0,15
Sulfato de kanamicina	0,02
Agar	10,00

pH: $7,0 \pm 0,2$ a 25°C .

Preparación: en el etiquetado del frasco nos indica que por cada litro de agua se preparan 43 gramos. En dos matraces de 500 ml se preparan 400 ml de agua destilada y se preparan 17,2 gramos de medio de cultivo. Realizado este paso, se tapa con algodón hidrófobo y papel de aluminio, y se introduce en el autoclave a 121°C durante 20 minutos, después se atempera al baño maría a 50°C y se extiende en placa (Manual Básico de Microbiología, Cultimed, Panreac).



Placas de Petri con medios de cultivo.

3.3 Materiales empleados

1. Frasco de cloruro de sodio para suero salino (NaCl).

2. Agua destilada.
3. Matraces Erlenmeyer.
4. Gradilla.
5. Probetas.
6. Tubos eppendorf de volumen 1,5 ml.
7. Algodón hidrófobo.
8. Papel de aluminio.
9. Báscula.
10. Mechero Bunsen.
11. Autoclave.
12. Placas de Petri de 15 ml
13. Asa triangular de Digrafsky.
14. Asa de siembra.
15. Bolsas de plástico herméticas
16. Cúter.
17. Cajas de puntas estériles para pipeta de 100 μ l.
18. Triturador homogeneizador automático de paletas (Stomacher 80 Biomaster, Seward Ltd).
19. Pipetas de 100 μ l.
20. Tubo Falcon de 50 ml.
21. Estufa de cultivo reguladas, dos, a 30° y 37°C.
22. Baño maría a 50°C.
23. Medios de cultivo.
24. Materiales para tinción de Gram:
 1. Cristal violeta.
 2. Lugol.
 3. Alcohol de 96°
 4. Safranina.
 5. Frasco lavador.
 6. Cubeta.
 7. Frasco lavador.

3.4 Procesado de las muestras.

Una vez obtenidas las muestras y llevadas al laboratorio, las 11 muestras mencionadas con anterioridad, se pesan en una balanza, obteniendo 5 gramos de alimento e introducido en las bolsas herméticas independientes. Cada bolsa contiene 45 ml de una solución salina estéril al 0,9%. Esta solución ha sido preparada en días anteriores. Una vez obtenidas las bolsas con el suero y el alimento se lleva al Stomacher para una digestión mecánica durante 30 segundos a velocidad media. Realizado este paso, se realizan las diluciones decimales para ser, posteriormente, sembradas en las placas de Petri con los diferentes medios.

Las diluciones decimales se hacen en tubos eppendorf de 1,5 ml rotulados del 1 al 4; con un volumen de 0,9 ml con una solución salina estéril al 0,9%. Siendo el tubo número 1 la muestra más concentrada y la número 4 la más diluida. Estas diluciones decimales seriadas se realizan para, una vez sembradas en las placas, poder hacer un recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC/g). Para ello es necesario hacer un recuento del número de colonias obtenidas en las placas sin distinción de morfología; siendo óptima para su recuento la placa que contiene un número entre más de 30 y menos de 300 colonias.

Formula de **unidades formadoras de colonias**:

$$\frac{UFC}{g} = \text{número de colonias} \times FD \times 100.$$

Donde, FD representa el factor de dilución de la placa en la que se hace el recuento. Además de las diluciones se tienen placas que contienen muestra sin diluir, es decir, se obtiene directamente de la bolsa hermética.

3.5 Sembrado de la muestra en placa.

Una vez realizadas las diluciones se procede a extender 100 µl de disolución en los medios de cultivo. Estos se encuentran rotulados con la muestra que contiene y su dilución, salvo las placas que no se han diluido previamente.

En la placa de medio no selectivo, Triptona Agar Soja (TSA) se obtienen 5 placas: una sin diluir o placa 0, y 4 placas con su dilución decimal correspondiente.

En todos los medios de cultivo selectivos se obtienen 2 placas: una placa 0 y una placa 1.

Una vez añadido el volumen en cada placa, se comienza con el sembrado con asa de Digrafsky. Para ello antes de extender el contenido, el asa es pasada por la llama del mechero durante tiempo suficiente y se deja reposar cerca de la llama durante

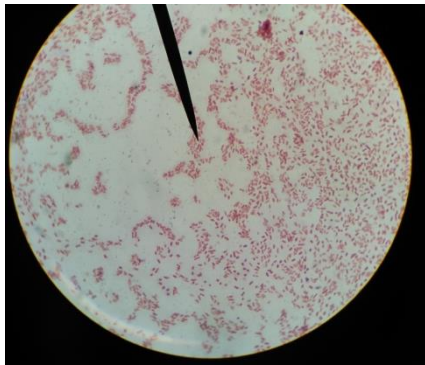
unos minutos para cuando se comience a extender, el asa este suficientemente fría como para no deteriorar la muestra o el medio de cultivo.

Una vez extendidas todas las placas, se meten en la estufa a 37°C durante 48 horas, Salvo las placas de MRS, Agar (medio deshidratado), CULTIMED; que se meten en una estufa a 30°C también durante 48 horas.

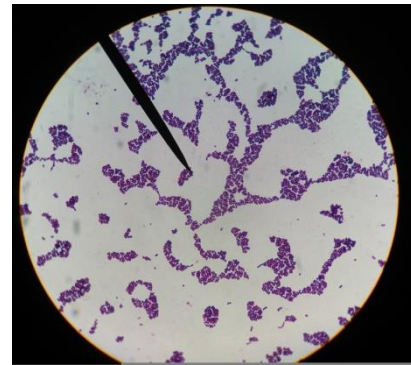
3.6 Identificación bacteriana mediante tinción de Gram.

Esta tinción nos permite, mediante la estructura y el grosor de la pared bacteriana, poder agrupar las bacterias en dos categorías, Gram positivas y Gram negativas. Las Gram positivas presentan una gruesa capa de peptidoglicano y no presentan membrana externa. Las bacterias Gram negativas, sin embargo, tienen una capa más delgada de peptidoglicano y sí poseen membrana externa (Rodríguez Cavallini, 2005). Los pasos a seguir para realizar la tinción son:

Sobre un portaobjetos limpio extendemos una pequeña gota de agua, sobre esta se coloca una pequeña muestra bacteriana y extendemos. A continuación secamos la gota con el mechero, una vez seco, fijamos con calor. Dejamos reposar el portaobjetos hasta que enfríe. Una vez frío procedemos a teñir. Primero echamos **cristal violeta** (colorante primario) en este paso todas las células se tiñen de morado. Lo dejamos actuar durante dos minutos aproximadamente; transcurrido este tiempo, dejamos escurrir el exceso de colorante sobre la cubeta y a continuación añadimos **lugol** (mordiente), este reacciona con el cristal violeta formando un complejo violeta-yoduro en las células Gram negativas. El mordiente se deja actuar durante dos minutos. Transcurrido este tiempo decoloramos con alcohol de 96° hasta que se haya ido el exceso de colorante. Durante este proceso de decoloración conseguimos que las bacterias Gram positivas queden de color morado, mientras, las Gram negativas quedan decoloradas. Una vez hecho esto, lavamos con agua. Por último, añadimos **safranina** (contratinción). Con este último colorante lo que conseguimos es que las bacterias que habían quedado sin teñir, Gram negativas, adquieran un color rosa. Este lo dejamos actuar durante tres minutos; pasado este tiempo, lavamos con agua. Finalmente secamos el portaobjetos con el mechero. Una vez seco y frío procedemos a la identificación en el microscopio óptico con objetivo de 100x y aceite de inmersión (Rodríguez Cavallini, 2005).



Bacterias Gram negativas.



Bacterias Gram positivas.

3.7. Prueba de la catalasa en colonias de estafilococos.

La catalasa es una enzima presente en algunos tipos bacterianos que es capaz de disociar el peróxido de oxígeno en oxígeno y agua (López García, et al., 2012)

Esta prueba se realiza sólo en aquellas colonias, que mediante tinción de Gram, identificamos como cocos Gram positivas. Sólo se llevaron a cabo en las placas con medio selectivo Vogel Jonhson, Agar (VJ AGAR). Para realizar la prueba de la catasa se siguen los siguientes pasos: en un portaobjetos de vidrio, depositamos una pequeña gota de **peróxido de oxígeno** (H_2O_2). Con el asa de siembra flameada y fría, recogemos una pequeña muestra de aquellas colonias que hemos identificado como coco Gram positivos, y extendemos. Si en el portaobjetos observamos burbujas (efervescencia) consideramos la prueba como catalasa positiva; en caso contrario, catalasa negativo, no se observan burbujas. Esta efervescencia es debida a la liberación de oxígeno por parte de la colonia bacteriana.

4. RESULTADOS.

Una vez pasadas las 48 horas desde la siembran de muestras en las placas, procedemos al recuento de todas las placas, seleccionando la placa que nos conviene, escogiendo la placa que contiene entre 30 y 300 colonias. Escogida la placa, se realiza el cálculo de las Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g). Esta fórmula nos permite conocer la carga microbiana que contiene cada alimento. En la placa escogida, comenzamos con la identificación a visu. Realizada su identificación macroscópica, pasamos a clasificarlas por su morfología y tipo de pared por tinción de Gram. En todas las placas de Vogel Johnson, Agar (VJ AGAR),

además de realizar todas las pruebas antes mencionadas, también se realizó la prueba de la catalasa. En el resto de medios no se llevó a cabo dicha prueba.

Durante la segunda sesión se han escogido muestras de carne de realización propia del establecimiento.

Las muestras de longaniza y hamburguesa de pollo, y el filete de pavo, todas están condimentadas con perejil. Se han escogido estas muestras para ver cómo varía la carga microbiológica al estar condimentada con respecto a las muestras de pollo de la sesión anterior. Las muestras de chorizo y morcilla se comparan con muestra de cerdo.

4.1 Identificación y recuento de colonias en la primera sesión.

En la **primera sesión** se escogieron 6 muestras de dos tipos de carne, siendo: pollo, cerdo y ternera, picados y sin picar. Se debe tener en cuenta que todas las carnes picadas fueron pasadas por la misma picadora por lo que, cuando se observaron las muestras en el laboratorio, todas las carnes picadas tenían trazas de la carne picada con anterioridad.

4.1.1 Resultado y comparación de las UFC/g en muestras de cerdo.

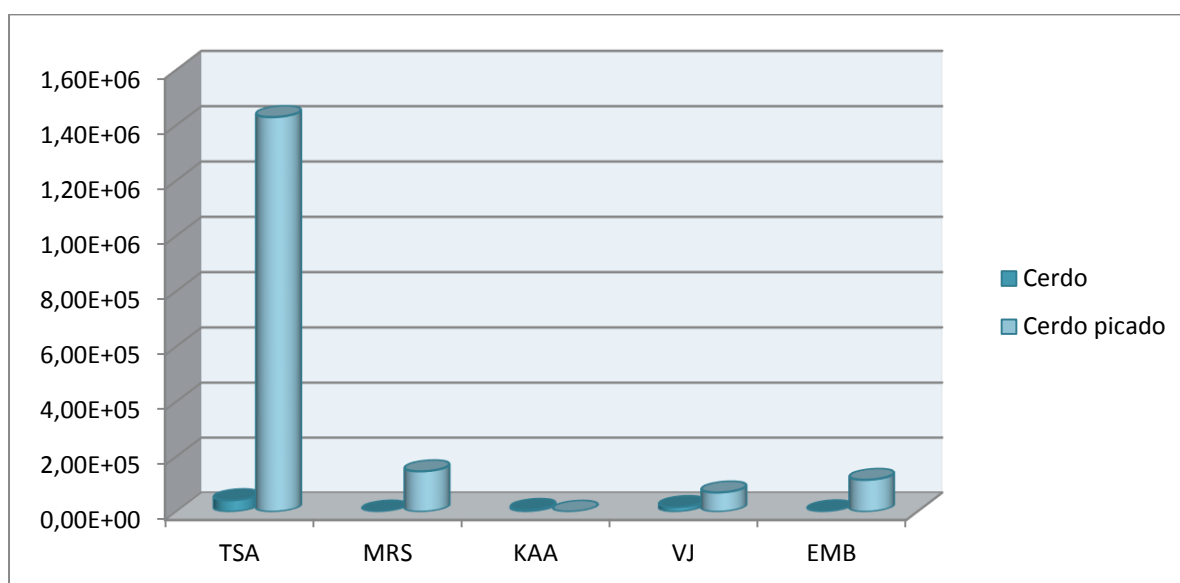


Gráfico 1: Gráfico comparativo de UFC/g en muestras de cerdo.

Cerdo	Cerdo picado
Unidades formadoras de colonias (UFC/g)	

TSA	4.2×10^4	TSA	1.43×10^6
MRS	5×10^2	MRS	1.47×10^5
KAA	6.6×10^3	KAA	0
VJ	1.7×10^4	VJ	7×10^4
EMB	1.4×10^3	EMB	1.16×10^5

Tabla 1: Recuento de las UFC/g de las muestras de carne.

Observando ambas tablas los resultados obtenidos en medio **no selectivo** Triptona Soja Agar (TSA): en el cerdo picado obtenemos 1.43×10^6 UFC/g frente a 4.2×10^4 UFC/g presentes en el cerdo. Se aprecia que en el cerdo picado tenemos un aumento en las unidades formadoras de colonias en dos unidades logarítmicas.

Con respecto a los **medios selectivos**:

1. Comenzando por el medio MRS, Agar, medio para aislamiento de bacterias lácticas. En la muestra de cerdo picado se obtiene un resultado de 1.47×10^6 UFC/g y en la muestra de cerdo 5×10^2 UFC/g.

2. Kanamicina esculina azida (KAA), siendo un medio de aislamiento de estreptococos, en la muestra de cerdo picado no se obtuvo resultado confirmativo de colonias bacterianas de estreptococos, sin embargo en la muestra de cerdo se obtiene un resultado de 6.6×10^3 UFC/g.

3. En Vogel Jonhon, Agar (VJ AGAR): en este medio de cultivo y aislamiento de estafilococos. En la muestra de cerdo picado se obtiene 7×10^4 UFC/g frente a la muestra de cerdo 1.7×10^4 UFC/g. Se observa que no hay un aumento significativo de una muestra a otra.

4. En Eosina azul de metileno, Agar (EMB): en este medio para identificación y aislamiento de bacilos entéricos y coliformes. En la muestra de cerdo picado se obtiene 1.16×10^5 UFC/g frente a la muestra de cerdo que se obtiene una carga menor siendo de 1.4×10^3 UFC/g.

4.1.2 Identificación a visu y al microscopio óptico en muestras de cerdo

Medio de cultivo	Cerdo	Cerdo picado
TSA	Colonias blancas: coco Gram (+)	Colonias blancas: coco Gram (+).
MRS	Colonias blancas grandes y blancas pequeñas: cocos Gram (+) y cocos Gram (+), en cadena.	Colonias blancas medianas: cocos Gram (+)

KAA	Colonias claras con halo negro: cocos Gram (+)	No se obtuvo resultado.
VJ	Colonias blancas: cocos Gram (+) y catalasa (+). Colonia amarillas: bacilos Gram (-). Manitol positivo.	Colonias blancas medianas: cocos Gram (+), Manitol positivo.
EMB	Colonias rosas con halos más claros: bacilos Gram (-)	Colonias grandes oscuras: bacilo Gram (-). Colonias verdes con brillo metálico. <i>E. coli</i> . cocobacilo Gram (-) Colonias rosas: cocos Gram (-)

Tabla 2: Identificación macro y microscópica de las colonias bacterianas de las muestras de cerdo en distintos medios de cultivo.

En las placas de medio **no selectivo**, Tripotona Soja Agar (TSA): en ambas muestras de cerdo obtenemos un resultado similar, siendo colonias blancas y cocos Gram positivos identificados mediante tinción.

En las placas de **medios selectivos**:

1. En las placas de MRS, Agar: en la muestra de carne de cerdo observamos a simple vista, tenemos dos tipos de bacterianos; colonias blancas grandes y colonias blancas de pequeño tamaño. Al realizarse la tinción se obtiene que ambas colonias son cocos Gram positivos que se encuentra en cadena. En la muestra de cerdo picado, solo se observa un tipo de colonia, colonias blancas de tamaño medio. Al realizar la tinción se observa que se trata de cocos Gram positivos sin agrupación en cadena.

2. En el medio Kanamicina esculina azida, Agar (KAA, Agar): en la muestra tomada de cerdo se observa que hay presencia de colonias de color claro con viraje en el medio a color marrón. Este viraje se debe a la esculina que hay presente en el medio que al hidrolizarlo vira hacia ese color. En la muestra de cerdo picado no se obtuvo presencia bacteriana.

3. En medio de Vogel Jonhson, Agar (VJ AGAR): en el cerdo se obtienen colonias de color blanco, siendo estos cocos Gram positivo y además catalasa positiva. También aparecen colonias amarillas, identificadas como bacilos Gram negativos. En el medio de cultivo se observa que las colonias antes mencionadas han provocado un viraje en el color del medio debido a que son fermentadoras de manitol (manitol positivo). En la muestra de cerdo picado se identifica a simple vista,

un sólo tipo de colonia de tamaño mediano, siendo coco Gram positivo, siendo fermentadoras de manitol (manitol positivo).

4. En Eosina azul de metileno, Agar (EMB, Agar): en la placa de cerdo se observa a simple vista un solo tipo de colonia de color rosado, con halo rosa más claro; siendo bacilo Gram negativo. En cambio en la placa que contiene la muestra de cerdo picado se observan tres tipos de colonias bacterianas; una colonia de color oscuro más grande que el tipo anterior, siendo también un bacilo Gram negativo. Otro tipo de colonia verde metalizado; por este tipo de brillo metálico podemos identificarla como *E. coli*, y por último, colonias rosas sin halo alguno que se identificó como coco Gram negativo.

4.1.3 Resultado y comparación de UFC/g de las muestras de pollo.

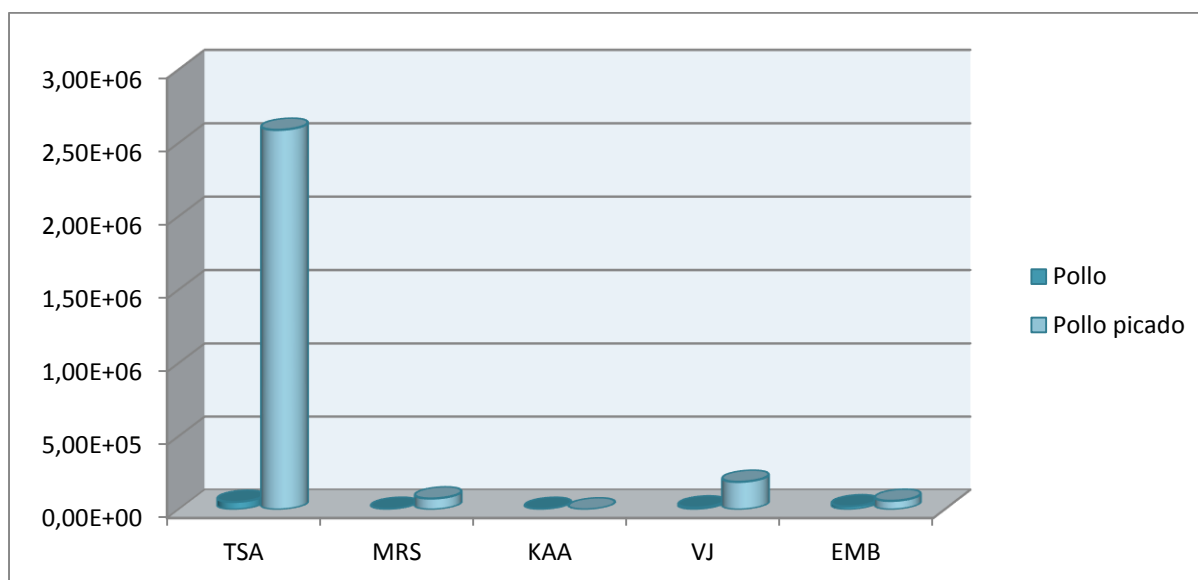


Gráfico 2: Gráfico comparativo de las UFC/g de las muestras de pollo.

Pollo		Pollo picado	
Unidades formadoras de colonias (UFC/g)			
TSA	5.2x10 ⁴	TSA	2.59x10 ⁶
MRS	4.1x10 ³	MRS	7.5x10 ⁴
KAA	3.7x10 ³	KAA	0
VJ	1.36x10 ⁴	VJ	1.89x10 ⁵
EMB	2.15x10 ⁴	EMB	5.9x10 ⁴

Tabla 3: Recuento de las UFC/g en muestras de pollo.

En el medio **no selectivo** Triptona Soja Agar (TSA): en la placa de pollo se obtiene menor número 5.2×10^4 UFC/g. En la placa de pollo picado obtenemos un aumento de 2 unidades logarítmicas, 2.59×10^6 , comparando con la muestra de pollo.

Comparando los **medios selectivos**, observamos los siguientes resultados:

1. En placas de MRS, Agar: en las placas de pollo y picado de pollo, se obtiene 4.1×10^3 y 7.5×10^4 respectivamente. En la de pollo picado se aprecia un aumento de una unidad logarítmica comparándolo con la muestra de pollo

2. En las placas de Kanamicina Esculina Azida, Agar (KAA, Agar): en la muestra de pollo picado no se obtuvo resultado confirmativo de la presencia de estreptococos, sin embargo en la muestra de pollo se obtuvo 3.7×10^3 UFC/g.

3. En las placas de Vogel Johnson, Agar (VJ Agar): en la muestra de pollo picado se obtiene 1.89×10^5 UFC/g y en la muestra de pollo 1.36×10^4 UFC/g, se aprecia un aumento de unidades formadoras de colonias en la muestra de pollo picado.

4. En las placas de Eosina azul de metileno, Agar (EMB, Agar): en la muestra de pollo picado se obtiene 5.9×10^4 UFC/g y en la muestra de pollo se obtiene 2.15×10^4 UFC/g. No se aprecian diferencias significativas de una muestra a otra.

4.1.4 Identificación a visu y al microscopio óptico en muestras de pollo.

Medio de cultivo	Pollo	Pollo picado
TSA	Colonias blancas: bacilo Gram (-). Colonias amarillas de color llamativo: cocos Gram (+) y en racimos	Colonias grandes blancas: bacilos Gram (-) Colonias color amarillo llamativo: cocos Gram (+) en racimos.
MRS	Colonias blancas pequeñas: cocos Gram (+), en cadena.	Colonias blancas pequeñas: cocos Gram (+), en cadena
KAA	Colonias blancas con halo marrón: cocos (+) y en parejas.	Colonias con halo marrón: Cocos Gram (+) y en parejas.
VJ	Colonias blancas: cocos Gram (+) y catalasa (+). Manitol positivo.	Colonias blancas: cocos Gram (+) y catalasa (+) Colonias amarillo: bacilos Gram (-).
EMB	Bacterias con colonias verdes de brillo metálico: <i>E.coli</i> , cocobacilo Gram (-) Bacterias rosas pequeñas: bacilos Gram (-)	Colonias verdes de brillo metálico: <i>E. coli</i> , cocobacilo Gram (-) Colonias rosas: bacilo Gram (-). Colonias grandes rosas con halo más claro: bacilo Gram (-).

Tabla 4: Identificación macro y microscópica de colonias bacterianas en muestras de pollo en distintos medios de cultivo.

En las placas de medio **no selectivo** Triptona Soja, Agar (TSA): se observa que por morfología y tinción tenemos el mismo tipo de bacterias en ambas muestras, no se observaron diferencias a visu ni por tinción entre ambas.

En placas de medio **selectivo**:

1. En placas de MRS, Agar: en este medio, comparando ambas tipos de muestra, se aprecia que ambas presentan colonias blancas de pequeño tamaño, siendo ambas cocos Gram positivos en racimo.

2. En las placas de Kanamicina Esculina Azida, Agar (KAA, Agar): en ambas muestras se observa el mismo tipo de colonia por su morfología. Ambas son capaces de hidrolizar la esculina, ya que presentan coloración negra. Mediante la tinción en ambas muestras se observa que las colonias son cocos Gram positivos en parejas.

3. En las placas de Vogel Jonhson, Agar (VJ AGAR): en la muestra de pollo se aprecian colonias blancas siendo cocos Gram positivos y catalasa positiva, son fermentadoras de manitol (manitol positivo). En la placa de pollo picado se aprecia la misma morfología de colonias blancas, siendo Gram positivos también y catalasa positiva; también se observaron colonias de color amarillo siendo estos, bacilos Gram negativas.

4. En el medio de Eosina azul de metileno, Agar (EMB Agar): en ambas muestras se observaron colonias con brillo metálico verde que sabemos que se trata de *E.coli*, cocobacilo Gram negativo. En la placa de pollo se observaron colonias de color rosa siendo cocos Gram negativos, mientras, en la placa de pollo picado tenemos colonias de color rosa también pero en este caso por tinción se observó que eran colonias de bacilos Gram negativos.

4.1.5. Resultado y comparación de las UFC/g en muestras de ternera.

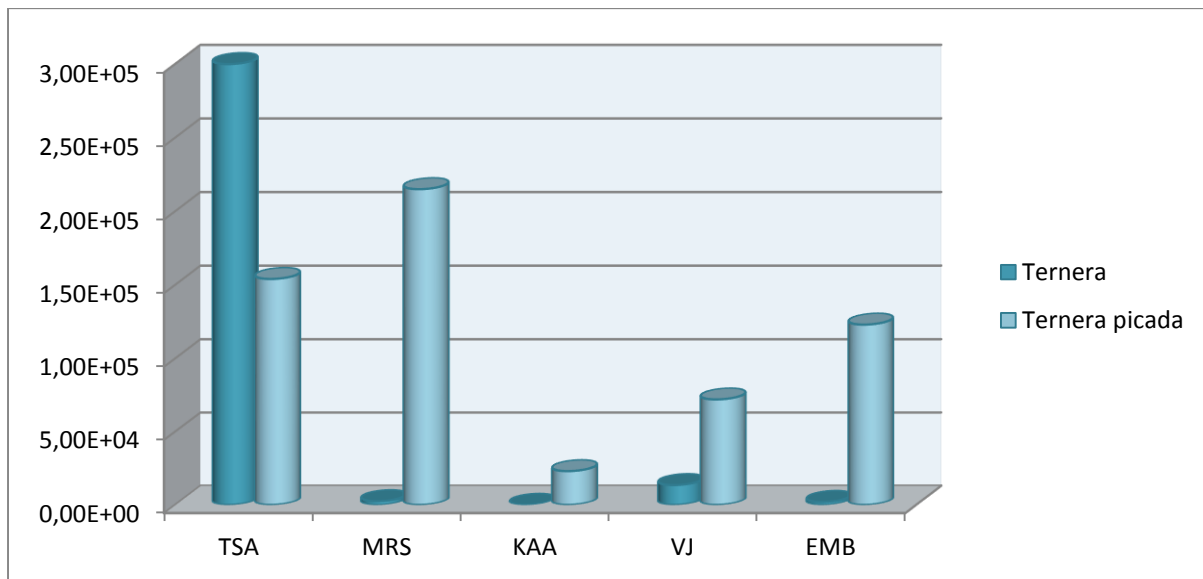


Gráfico 3: Gráfico comparativo de las UFC/g de las muestras de ternera.

Ternera		Ternera picada	
Unidades formadoras de colonias (UFC/g)			
TSA	3x10 ⁵	TSA	1.54x10 ⁵
MRS	2.5x10 ³	MRS	2.15x10 ⁵
KAA	0	KAA	2.3x10 ⁴
VJ	1.35x10 ⁴	VJ	7.2x10 ⁴
EMB	2x10 ³	EMB	1.23x10 ⁵

Tabla 5: Recuento de UFC/g en las muestras de ternera.

En el medio **no selectivo** Triptona Soja Agar (TSA): la muestra de ternera picada se recuentan 1.54x10⁵ UFC/g y en la de ternera tenemos 3x10⁵ UFC/g. no se aprecian diferencias significativas de una muestra a otra.

En placas de **medios selectivos**:

1. En placas de MRS, Agar: en la muestra de ternera picada se cuenta 2.15x10⁵ UFC/g, siendo esta superior en dos unidades logarítmicas con respecto a la muestra de ternera obteniendo 2.5x10³ UFC/g respectivamente.

2. En las placas de Kanamicina esculina azida, Agar (KAA, Agar): en la muestra de pollo picado se obtiene 2.3x10⁴ UFC/g, sin embargo en la muestra de ternera no se obtiene resultado confirmativo en el recuento bacteriano de estreptococos.

3. En placas de Vogel Johnson, Agar (VJ AGAR): en la muestra de ternera picada se obtiene 7.2×10^4 UFC/g frente a la muestra de ternera que se cuenta 1.35×10^4 UFC/g. no se aprecian diferencias significativas de una a otra.

4. En las placas de Eosina azul de metileno, Agar (EMB AGAR): en la muestra de ternera picada se obtiene un resultado más elevado en dos unidades logarítmicas con respecto a la muestra de ternera, siendo estas, 1.23×10^5 y 2×10^3 UFC/g respectivamente.

4.1.6. Identificación a visu y al microscopio óptico en muestras de ternera.

Medio de cultivo	Ternera	Ternera picado
TSA	Colonias blancas grandes: bacilos (-) Colonias blancas pequeñas: cocos (+)	Colonias blancas: bacilos (-). Colonia amarillo llamativo: cocos (+), en racimos.
MRS	Colonias blancas pequeñas: cocos (+), en cadena.	Colonias blancas pequeñas: cocos (+), en cadena.
KAA	No se obtuvo resultado.	Colonias con halo marrón: cocos (+), en parejas.
VJ	Colonias grandes blancas: cocos (+), catalasa (+) Colonias amarillas: cocos (+), en racimo. Catalasa (-)	Colonias naranjas: cocos (+) catalasa (-) Manitol positivo.
EMB	Colonias rosa claro: bacilos (-) Colonias rosa oscuro: bacilos (-), más largos.	Colonias con verde metálico: <i>E.coli</i> , cocobacilo Gram (-) Colonias grandes con el halo más claro: bacilos (-) Colonias rosas: bacilos(-)

Tabla 6: Identificación macro y microscópica de colonias bacterianas en muestras de ternera en distintos medios de cultivo.

En el medio **no selectivo**, Triptona Soja, Agar (TSA): en la placa de ternera se observan a visu dos tipos de colonias. Colonias blancas grandes que por tinción se identifican como bacilos Gram negativos. El otro tipo de colonia que se observa son colonias blancas de pequeño tamaño siendo estas últimas cocos Gram positivos. En la muestra de ternera picada se observan dos tipos de colonias, una de ella sí coincide por identificación macroscópica y por tinción, con la muestra de ternera; mientras el otro tipo bacteriano no coincide, siendo colonias de color amarillo muy llamativo identificadas por tinción como cocos Gram positivos en cadena.

En los **medios selectivos**:

1. En el medio MRS, Agar: en la muestra de ternera se obtienen colonias blancas de pequeño tamaño, siendo cocos Gram positivos, en cadena. En la placa de ternera picada se obtiene un tipo bacteriano similar a la muestra de ternera, colonia blanca pequeña, cocos Gram positivos, en cadena.

2. En el medio Kanamicina esculina azida, Agar (KAA): en la placa de ternera no se obtuvo resultado confirmativo. En la placa de ternera picada se obtienen colonias oscuras con halo negro, identificadas por tinción como cocos Gram positivos en parejas. Este cambio de color del medio se debe a que es capaz de hidrolizar la esculina a esculetina.

3. En medio de Vogel Johnson, Agar (VJ AGAR): en la placa de ternera se identifican tres tipos de colonias. Se observan colonias blancas de gran tamaño que se identifican por tinción como cocos Gram positiva y catalasa positiva. Las colonias amarillas se identifican como cocos Gram positivos, en racimo y catalasa negativo. En las placas de ternera picada, identifican dos tipos de colonias diferentes: colonias blancas, bacilos Gram positivos y colonias naranjas que por tinción se identifica como cocos Gram positivos y catalasa positiva. En ambas muestras se observa viraje en el medio de cultivo debido a que son fermentadoras de manitol.

4. En el medio de Eosina azul de metileno, Agar (EMB AGAR): en las placas de ternera se identifican dos tipos de colonias: colonias de color rosa claro, bacilos Gram negativos y colonias rosa oscuro, bacilos Gram negativos de mayor tamaños que los bacilos anteriores. En la placa de ternera picada se observan tres tipos de colonias: colonias de color verde metálico que se identifican como *E. coli*, cocobacilo Gram negativo. Colonias grandes de color oscuro con halo rosa claro, bacilos Gram negativos y colonias de color rosa, bacilos Gram negativos.

4.2. Identificación y recuento de colonias en la segunda sesión.

Durante la **segunda sesión** se trabajó con 5 muestras de alimento diferentes, en este caso son elaborados por el mismo establecimiento (caseros), siendo estos los siguientes: filete de pavo, longaniza y hamburguesa de pollo; condimentadas con perejil, chorizo y morcilla. En esta sesión, se obtuvo el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC/g) de cada alimento y en todos los medios. Para la selección de la placa en la que hace el estudio, se sigue con el criterio de las UFC/g; escogiendo aquellas placas que contengan más de 30 y menos de 300 colonias. Se

realiza una identificación macroscópica de las colonias en la placa seleccionada y también, se lleva a cabo la tinción de Gram sobre las distintas colonias identificadas.

4.2.1 Recuento de las Unidades formadoras de colonias (UFC/g) en las muestras de chorizo y morcilla

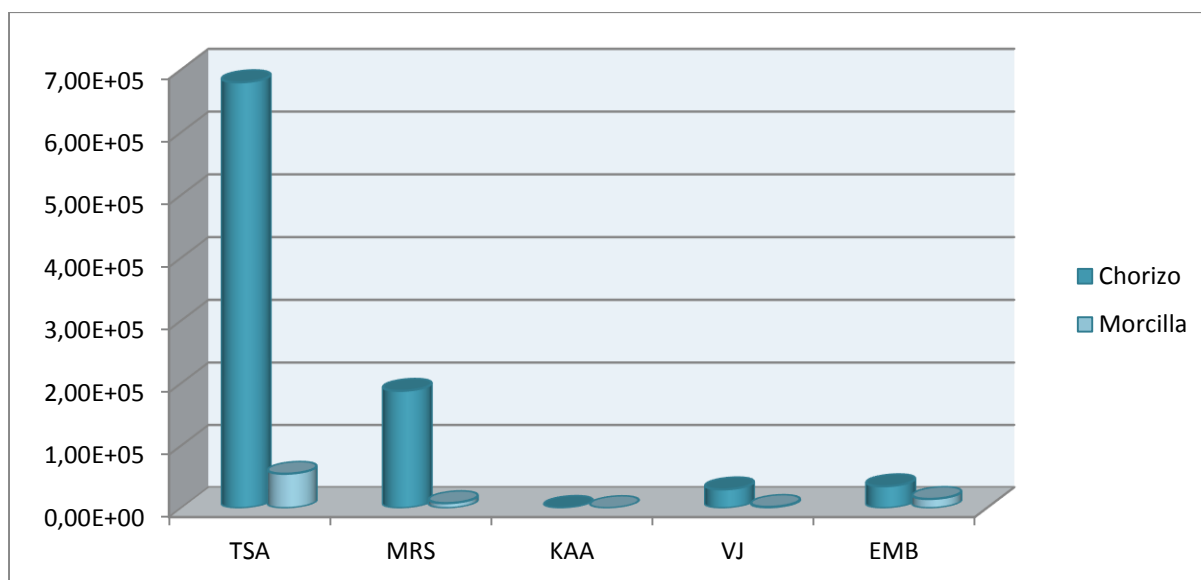


Gráfico 4: Gráfico comparativo de UFC/g en muestras de chorizo y morcilla.

Chorizo		Morcilla	
Unidades formadoras de colonias (UFC/g)			
TSA	6.8x10 ⁵	TSA	5.5x10 ⁴
MRS	1.88x10 ⁵	MRS	7.9x10 ³
KAA	3x10 ²	KAA	0
VJ	3x10 ⁴	VJ	1.8x10 ³
EMB	3.5x10 ⁴	EMB	1.46x10 ⁴

Tabla 7: Recuento de las UFC/g en muestra de chorizo y morcilla.

En el medio **no selectivo** Triptona Soja Agar (TSA): en este medio se observa que en la placa de chorizo hay 6.8x10⁵ UFC/g mientras que en la muestra de morcilla obtenemos una disminución de una unidad logarítmica, recontando 5.5x10⁴ UFC/g.

En los **medios selectivos**:

1. En placas de MRS, Agar: medio para aislamiento de bacterias lácticas. La muestra de chorizo presenta mayor carga de unidades formadoras de colonias que la muestra de morcilla, siendo, respectivamente: 1.88x10⁵ y 7.9x10³ UFC/g.

2. En placas de Kanamicina esculina azida, Agar (KAA, Agar): medio se aislamiento de estreptococos. En la muestra de chorizo se obtiene 3×10^2 UFC/g, mientras que en la muestra de morcilla no se obtiene resultado confirmativo.

3. En las placas de Vogel Jonhson, Agar (VJ Agar): medio de aislamiento de estafilococos. En la muestra de chorizo se obtiene 3×10^4 UFC/g siendo algo mayor su presencia en esta muestra que en la morcilla que se obtiene un valor de 1.8×10^3 UFC/g. en la placa de chorizo hay viaje en el medio

4. En las placas de Eosina azul de metileno, Agar (EMB): medio para aislamiento de bacilos entéricos y coliformes. En la muestra de chorizo se obtiene 3.5×10^4 UFC/g mientras que en la muestra de morcilla se obtiene 1.46×10^4 UFC/g.

4.2.2. Identificación a visu y al microscopio óptico en muestras de chorizo y morcilla.

Medio de cultivo	Chorizo	Morcilla
TSA	Contiene levaduras. Colonias blancas grandes: bacilos cortos Gram (+)	Contiene levaduras. Colonias amarillentas: cocos Gram (+)
MRS	Colonias blancas grandes: cocos Gram (+), en cadena. Colonias blancas pequeñas: cocos Gram (+), en parejas.	Colonias blancas pequeñas: cocobacilos Gram (+)
KAA	Colonias con halo marrón: cocobacilos Gram (+), en cadena. Hidroliza la esculina. Colonias sin halo, blancas: cocos Gram (+), en parejas.	No se obtuvo resultado
VJ	Colonias amarillas: bacilos Gram (+). Manitol positivo.	Contiene levaduras. Colonias blancas: cocos Gram (+). Catalasa (+)
EMB	Colonias rosa oscuro con halo rosa: bacilos Gram (-) Colonias rosas sin halo: cocos Gram (-) Colonias pequeñas rosa oscuro: cocos Gram (-), en parejas.	Colonias rosa oscuro: bacilos Gram (-) Colonias rosa claro: bacilos Gram (-)

Tabla 8: Identificación macro y microscópica de colonias bacterianas en muestras de chorizo y morcilla en distintos medios de cultivo.

En el medio **no selectivo** Triptona Soja Agar (TSA): en ambas muestras se ha observado la presencia de levaduras. En la muestra de chorizo se aprecia un solo tipo de bacteria de color blanco, colonias de gran tamaño. A la vista al microscopio se identifican como bacilos cortos Gram positivos. En la muestra de morcilla se

obtiene colonias amarillentas, identificándose por tinción como cocos Gram positivos.

En medios selectivos:

1. En placas de MRS: En este medio se identifican macroscópicamente dos tipos bacterianos ambos de mismo color, blanco, pero de diferente tamaño, siendo colonias grandes y pequeñas. Las colonias blancas grandes son cocos Gram positivos, en cadena, mientras que las colonias blancas de menor tamaño son cocos Gram positivos en pareja. En la muestra de morcilla solo se identifica un tipo bacteriano siendo colonias blancas de pequeño tamaño, cocobacilos Gram positivos.

2. En placas de Kamamicina Esculina Azida, Agar (KAA, AGAR): En la muestra de morcilla se obtiene colonias con halo marrón, este halo se debe a que hidrolizan la esculina, siendo cocobacilos Gram positivos, en cadena. También he obtienen colonias blancas sin halo, siendo cocos Gram positivos, en parejas; estas no presentan halo por no hidrolizan la esculina. En la muestra de morcilla no se obtiene presencia de estreptococos.

3. En placas de Vogel Johnson, Agar (VJ AGAR): en la muestra de chorizo se obtienen colonias de color amarillo, identificándose como bacilos Gram positivos. En el medio de VJ se aprecia un viraje en el color del medio, ha cambiado de color naranja a color rosa. Este viraje en el color se debe a que son fermentadoras de manitol (manitol positivo).

4. En placas de Eosina azul de metileno (EMB, AGAR): se aprecian tres tipos bacterianos a simple vista siendo: colonias de color rosa oscuro con halo más claro siendo estos bacilos Gram negativos. Otro tipo bacteriano, colonias de color rosa sin halo, siendo cocos Gram negativos; por último se aprecia colonias de color rosa oscuro de pequeño tamaño identificándose como cocos Gram negativos, en pareja. En la muestra de morcilla se identifican dos tipos: colonias rosa oscuro, bacilos Gram negativos y colonias rosa claro siendo bacilos Gram negativos.

4.2.3 Recuento de las Unidades formadoras de colonias (UFC/g) en las muestras de longaniza, hamburguesa y filete de pavo.

Los tres alimentos son de elaboración casera, las tres muestras se han condimentado con perejil.

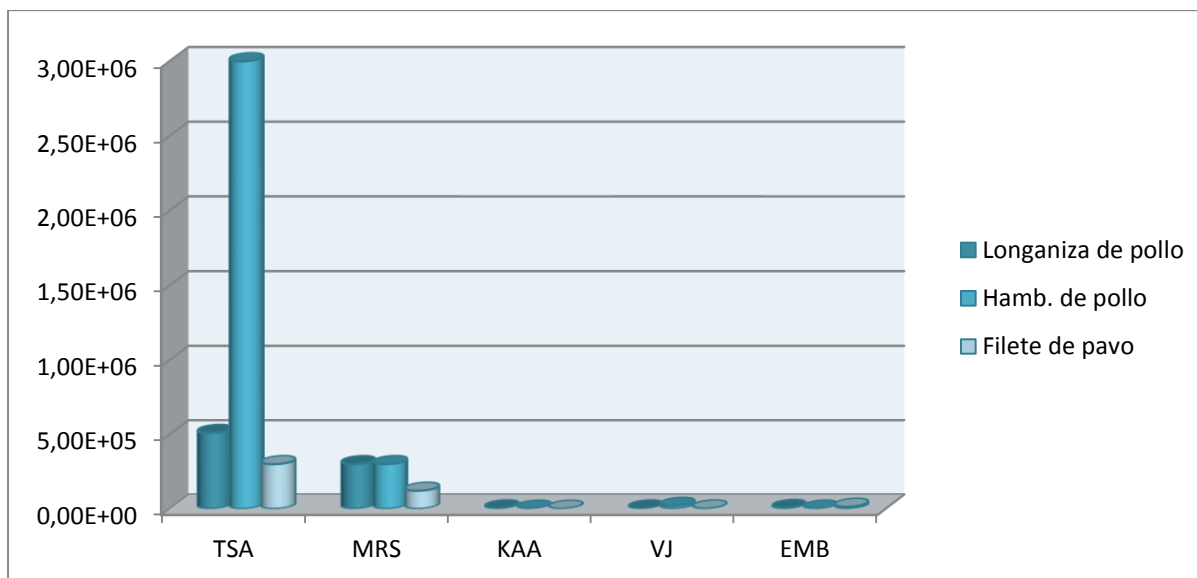


Gráfico 5: Gráfico comparativo de UFC/g en muestras de longaniza y hamburguesa de pollo y filete de pavo.

	Longaniza de pollo	Hamb. de pollo	Filete de pavo
Unidades formadoras de colonias (UFC/g)			
TSA	5.1x10 ⁵	3x10 ⁶	3x10 ⁵
MRS	3x10 ⁵	3x10 ⁵	1.21x10 ⁵
KAA	2.3x10 ³	2x10 ²	0
VJ	1.8x10 ³	1.9x10 ⁴	1.5x10 ³
EMB	4.8x10 ³	7x10 ²	1.3x10 ⁴

Tabla 9: Recuento de UFC/g en muestras de longaniza y hamburguesa de pollo y filete de pavo.

Medio **no selectivo** Triptona Soja agar (TSA): en la muestra de longaniza de pollo se recuenta 5.1x10⁵ UFC/g y en la muestra de hamburguesa de pollo se obtiene 3x10⁶ UFC/g. finalmente en la muestra de filete de pavo se recuentan 3x10⁵ UFC/g.

En medios **selectivos**:

1. En placas de MRS: medio para aislamiento de bacterias lácticas. En la muestra de longaniza se obtienen 3x10⁵ UFC/g, en la de hamburguesa se obtiene 3x10⁵ UFC/g y en el filete de pavo se cuenta con 1.21x10⁵ UFC/g.

2. En placas de Kanamicina esculina azida, Agar (KAA, AGAR): medio para aislamiento de estreptococos. En la muestra de longaniza se obtiene un recuento de

2.3×10^3 UFC/g, en la de hamburguesa se recuenta 3×10^5 UFC/g y finalmente en la muestra de pavo no se obtiene resultado confirmativo de presencia de estreptococos.

3. En placas de Vogel Jonhson, Agar (VJ, AGAR): medio para aislamiento de estafilococos. En la muestra de longaniza se obtiene 1.8×10^3 UFC/g mientras que en la de hamburguesa se obtiene 1.9×10^4 UFC/g y finalmente se obtiene en el pavo 1.5×10^3 UFC/g.

4. En placas de Eosina azul de metileno, Agar (EMB, AGAR): medio para aislamiento de bacilos entéricos y coliformes. En la muestra de longaniza se obtiene 4.8×10^3 UFC/g y en la de hamburguesa se obtiene 7×10^2 UFC/g y por último en el pavo se recuenta 1.3×10^4 UFC/g.

4.2.4. *Identificación a visu y al microscopio óptico en muestra de longaniza y hamburguesa de pollo.*

Medio de cultivo	Longaniza de pollo	Hamburguesa de pollo	Filete de pavo
TSA	Colonias amarillas: cocos Gram (+)	Colonias blancas pequeñas: bacilos Gram (+), cortos.	Colonias blancas pequeñas: bacilos Gram (+)
	Colonias blancas pequeñas: bacilos Gram (+), en cadena	Colonias blancas grandes: cocos Gram (+), en racimo.	
	Colonias blancas grandes: cocos Gram (+).	Colonias amarillas: bacilos Gram (+).	
		Colonias amarillo intenso: cocos Gram (+).	
MRS	Presencia de levaduras.	Colonias blancas pequeñas: cocos Gram (+), en parejas.	Colonias blancas pequeñas: cocos Gram positivos, alargados, en pareja.
	Colonias blancas: cocos Gram (+)		
	Colonias naranja: cocos Gram (+)		Colonias blancas grandes: cocos Gram (+), en parejas.
KAA	Colonias negras: cocos Gram (+), en	No hay resultado confirmativo.	No hay resultado confirmativo.

VJ	parejas. Hidroliza la esculina.		
	Colonias blancas: cocos Gram (+), catalasa (+).	Colonias blancas: cocos Gram (+), catalasa (+).	Colonias blancas: bacilos Gram (-), en parejas.
EMB	Colonias blanco tenue: cocos Gram (+).	Colonias amarillas: cocos Gram (+), catalasa (+).	Colonias naranja: bacilos Gram (-)
	Manitol positivo.		
	Colonias rosa oscuro: bacilos Gram (-)	Colonias moradas con halo rosa claro: bacilos Gram (-), cortos.	Colonias grandes rosáceas: bacilos Gram (-)
	Colonias rosa claro: bacilos Gram (-)	Colonias naranja: bacilos Gram (-)	Colonias verde metálico: <i>E.coli</i> , cocobacilo Gram (-)

Tabla 10: Identificación macro y microscópica de las colonias bacterianas en muestras de longaniza y hamburguesa de pollo y filete de pavo en distintos medios de cultivo.

En medio **no selectivo**, Tryptona Soja Agar (TSA): en la muestra de longaniza de pollo se aprecian colonias de color amarillo siendo estas cocos Gram positivo. Colonias de color blanco pequeño siendo bacilos Gram positivo, en cadena y finalmente hay colonias blancas grandes, cocos Gram positivo. En la hamburguesa de pollo: colonias blancas pequeñas, bacilos Gram positivo, cortos. Colonias blancas de mayor tamaño, cocos Gram positivo y en racimo. Colonias amarillas, bacilo Gram positivos y por ultimo colonias amarillo intenso, cocos Gram positivo. En el filete de pavo: colonias blancas de pequeño tamaño, bacilos Gram positivo.

En medios selectivos:

1. En placas de MRS, AGAR: en la longaniza de pollo se aprecian levaduras. Colonias de color blanco, bacilos Gram positivo y por último colonias de color naranja, cocos Gram positivo. En las placas de hamburguesa de pollo aparece un solo tipo bacteriano, cocos Gram positivo, en parejas. Por último en la placa de filete de pavo se observan dos tipos bacterianos: colonias blancas pequeñas, cocos Gram positivo, en parejas y colonias de color blanco pero de menor tamaño, siendo cocos Gram positivos en pareja

2. En placas de Kanamicina esculina azida, AGAR (KAA, AGAR): en la placa de longaniza de pollo se aprecian colonias con halo marrón siendo cocos Gram positivos, este halo marrón se debe a que hidrolizan la esculina a esculetina. En las

muestras de hamburguesa de pollo y de filete de pavo no se aprecia presencia de estreptococos.

3. En placas de Vogel Jonhson (VJ, AGAR): en la muestra de longaniza se aprecian dos tipos bacterianos. Colonias blancas: cocos Gram positivo, catalasa positivo. Colonias blanco tenue: cocos Gram positivo, fermentadoras de manitol ya que en el medio naranja ha cambiado de color al rosa y es debido a la fermentación del manitol. En la muestra de hamburguesa, se aprecian colonias de color blanco, cocos Gram positivo y catalasa positivo. En la última muestra, filete de pavo se aprecian dos tipos bacterianos: colonias blancas: bacilos Gram negativo, en pareja y para finalizar colonias de color naranja, bacilos Gram negativo.

4. En placas de Eosina azul de metileno (EMB, AGAR): en la longaniza se aprecian dos tipos bacterianos, colonias rosa oscuro y colonias de rosa claro, ambas son bacilos Gram negativo. En la muestra de hamburguesa se aprecian dos tipos bacterianos también, colonias de color morado con halo rosa claro y colonias de color naranja, ambos son bacilos Gram negativo. En la muestra de filete de pavo se aprecian dos tipos bacterianos: colonias grandes rosáceas, bacilos Gram negativo y colonias con brillo metálico verde, se identifica como *E. coli*, cocobacilo Gram negativo.

5. DISCUSIÓN.

En el medio de TSA, medio no selectivo, capaz de detectar una gran variedad de especies. Según estudios previos realizados, el recuento de bacterias mesófilas presentes en la carne, es de alrededor 10^2 a 10^3 Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g) (Mol et al., 1971; Blickstad et al., 1981; Blickstad and Molin, 1983b; Jackson et al., 1992), en comparación con los resultados obtenidos, en todas las muestras se aprecia que el recuento de bacterias mesófilas presentes en TSA es muy superior a dicha cifra, hallando el recuento más bajo en la muestra de ternera, con cinco unidades logarítmicas. Comparando las muestras de carne sin picar y picada, se aprecia que hay un aumento en el recuento de UFC/g en las muestras pasadas por la picadora, poniendo de manifiesto que este recuento lo ha adquirido tras pasar por la máquina. En las muestras condimentadas se aprecia que su recuento es mayor que en las muestras de pollo y cerdo.

Todas las muestras tratadas en el presente trabajo han sido mantenidas en refrigeración y no se hallan en atmósfera protectora en la que la concentración de

oxígeno es menor, buscando con este método de conservación una mayor vida útil del producto. En este caso la concentración de oxígeno presente es mayor ya que las muestras adquiridas son frescas, lo que ha permitido un gran crecimiento de bacterias lácticas hasta altas concentraciones (Ordóñez et al., 1991; Jackson et al., 1992). En el caso de las muestras de chorizo y de morcilla al ser carnes fermentadas el recuento de UFC/g se debe a su proceso de fermentación necesario para la obtención del producto.

En todas las muestras de carne al ser mantenidas en refrigeración se aprecia que la carga microbiana de bacterias lácticas y *Enterobacteriaceae* se encuentra en valores intermedios, sin ser estos predominantes en comparación con otro tipo bacteriano en cualquier tipo de carne (Broch et al., 1996). En las muestras estudiadas, las bacterias lácticas guardan esta relación. En cuanto a *Enterobacteriaceae*, las muestras de morcilla y cerdo picado, se obtiene unos valores de UFC/g muy superiores, pudiéndose agrupar dentro de las bacterias predominantes en dichas muestras. En el resto de muestras su predominancia es intermedia. La predominancia de *Enterobacteriaceae* en las muestras citadas anteriormente está asociada con procesos deterioro de la carne (Daint and Mackey, 1992).

En el medio de aislamiento de enterobacterias; en las muestras de cerdo picado, en ambas muestras de pollo, ternera picada y filete de pavo, se recuentan un número muy bajo de colonias de *E. coli*. Generalmente este tipo bacteriano no causa el deterioro de la carne pero sí se emplea para conocer si dicha carne es segura para ser consumida (Nychas et al., 2008). A la vista de los resultados se aprecia que en mas muestras de cerdo y ternera dichas colonias de *E.coli* no aparecen, sin embargo una vez han sido pasadas por la cortadora aparecen en el medio, por lo que su detección en el medio ha sido adquirida en la picadora de carne. En el caso del filete de pavo, su contaminación ha podido deberse a una mala manipulación de dicha carne o adquirida por su presencia en el tracto digestivo de dicho animal durante su sacrificio (Koutsoumains et al., 2004).

Con respecto a la aparición de *Streptococcus* su aparición en la carne, incluyendo la carne de ave es frecuente, no siendo esta la más frecuentemente aislada (Nychas et al., 2007); sin embargo no se han obtenido resultados confirmativos en las muestras de cerdo picado, pollo picado, morcilla y filete de pavo. Su no proliferación en dichos medios ha sido debida a que la concentración bacteriana de *Streptococcus* se encuentra por debajo de los límites de detección de dicho medio. De hecho se

puede saber que la pieza de carne contiene *Streptococcus* ya que en las muestras de cerdo y pollo si se obtiene resultado confirmativo, y podemos concluir esto ya que ambas muestras, picadas y sin picar, proceden de la misma pieza de carne.

Con *Staphylococcus* ocurre algo similar que con *Streptococcus*, ya que ambos tipos bacterianos aparecen en cualquier tipo de carne, aunque no es el tipo más frecuente (Nychas et al., 2007). En todas las muestras con las que se ha llevado a cabo el presente estudio, se obtiene resultado confirmativo de presencia de *Staphylococcus*. Haciendo una comparativa de los tipos de carne picada y sin picar. De forma generalizada se aprecia un aumento de UFC/g en las muestras que se han pasado por la picadora en comparación con las mismas muestras antes de dicho proceso. Con dicha información podemos concluir que dicho aumento en UFC/g ha sido adquirido al pasar los alimentos por la picadora. Con respecto a las muestras de hamburguesa, longaniza, filete de pavo, morcilla y chorizo aún estando las muestras condimentadas no se aprecia una disminución con respecto a las UFC/g comparándolas con la muestra de pollo y cerdo respectivamente.

6. CONCLUSIÓN.

1. El recuento de Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g) de bacterias mesófilas en las muestras de carne sin picar es inferior al mismo recuento realizado en las muestras de carne picada. Produciéndose un aumento en la carga microbiana una vez ha sido pasada por la picadora. Comparando las muestras de morcilla, chorizo, filete de pavo, hamburguesa y longaniza, aún estando condimentadas dichas muestras, el recuento de UFC/g no se aprecia una disminución en el recuento comparándose con las muestras de cerdo y pollo.

2. El recuento de UFC/g de Enterobacteriaceae en las muestras de morcilla y cerdo picado resulta predominante en comparación con el resto de géneros bacterianos. Su aparición en dichas muestras está relacionado con una mala manipulación del producto.

3. La presencia de *E. coli* de manera generalizada en las muestras de carnes que han sido picadas, sin haber sido detectadas en las muestras de carne sin picar, pone de manifiesto que la contaminación de dichas muestras se ha producido al entrar en contacto con la picadora, ya que previamente no se detectan.

4. No se obtienen resultados confirmativos de presencia de *Streptococcus* en la mayoría de las muestras de carne picada ni tampoco en la muestra de filete de pavo, este resultado negativo pone de manifiesto que su concentración se encuentra por debajo de los límites de detección ya que en las mismas muestras de carne sin picar si se obtiene resultado confirmativo. En el caso de las muestras condimentadas, en las muestras con resultado confirmativo se aprecia una disminución en el recuento de UFC/g.

5. La presencia de *Staphylococcus* es generalizada en todas las muestras. En las muestras de carne picada se aprecia un aumento en el recuento de UFC/g comparando con las mismas muestras sin picar, apreciándose que este aumento en el recuento se ha adquirido al pasar la muestra de carne por la picadora. Las muestras que se encuentran condimentadas con perejil, comparando el recuento de UFC/g con las muestras de pollo y cerdo no se aprecia una disminución significativa en la carga microbiana de *Staphylococcus*.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Amerling, C., 2001, Tecnología de la carne, Antología, Universidad estatal a distancia, UNED.

Argueda, P., 1998, Control de calidad para animales de granja, Editorial Universidad Estatal a Distancia.

Ausina Ruiz, V., Moreno Guillén, S., 2005 Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica, Editorial Médica Panamericana, S.A.

Bedolla Bernal, S., Dueñas Gallegos, C., Esquivel Ibarra, I., Favela Torres, T., Guerrero Huerta, R., Mendoza Madrid, Ernesto., Navarrete López, A., Olguín Martínez, L.E., Ortiz Gama, J., Pacheco Puc, O., Quiroz Bravo, M., Ramírez Schoettlin, A., Trujillo Castillo, M., 2004, Introducción a la tecnología de alimentos, Academia del Área de Plantas Piloto de Alimentos, 2º Edición, LIMUSA S.A., Grupo Noriega Editores.

Bennington, J.L, M.D., 2000, Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico, Editorial Médica Panamericana, S.A.

Blickstad, E., Enfors, S., Mollin, G., 1981, Effects of hyperbaric carbon dioxide pressure on the microbial flora of pork stored at 4 or 14°C, J, Appl, Bacteriol, 50, 493-504.

Blinkstad, E., Molin, G., 1983b, The microbial flora of smoked pork loin and frankfurter sausage stored in different atmospheres at 4°C, J, Appl, Bacteriol, 53, 45-56.

Brock, E., Kant-Muermans, M.L., Blixt, Y., 1996, Bacterial spoilage of meat and cured meat products, International Journal of Food Microbiology, 33, 103-120.

Castro, A., 2014, Bacteriología médica basada en problemas, 2ª Edición, Morales Saavedra, J.L., Manual Moderno S.A.

Chandra Parija, S., 2009, Textbook of Microbiology and Immunology, Elsevier.

Dainty, R.B., Mackey, B.M., 1992, The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes, J. Appl, Bacteriol, 73, 103S-114S.

De Oña Baquero, C.M., Serrano Pérez, D., Ortiz Laza, M.A., 2012, Elaboración de preparados cárnicos frescos, 1ª Edición, Ic editorial.

Engelkirk, P.G., Duben- Engelkirk, J., 2008, Laboratory Diagnosis Of Infectious Diseases, Essentials of Diagnostic Microbiology, Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business.

García Bermejo, M.J., Colom Valiente, M.F., Jaramillo Sánchez, J.A., 2003, Manual del auxiliar de laboratorio. Temario general, 2ª Edición, Editorial MAD, S.L.

García Garibay, M., Quintero Ramírez, R., López-Munguía Canales, A., 2004, Biotecnología Alimentaria, 5ª Edición, Limusa, S.A., de C.V. Grupo Noriega Editores.

Granados Pérez, R., Villaverde Peris, M.C., 1997, Microbiología, Tomo I, Bacteriología. Características y clasificación bacteriana. Virología. Características y técnicas bioquímicas, International Ediciones Paraninfo, S.A.

Gil, A., 2010, Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos. Tratado de Nutrición, Panamericana.

Hernández, A., Alfaro, I., Arrieta, R., 2001, Microbiología Industrial, Editorial Universidad Estatal a Distancia UNED.

Hernández Rodríguez, M., Sastre Gallego, A., 1999, Tratado de Nutrición, Díaz de Santos.

Ingraham, J.L., Ingraham, C.A., 1998, Introducción a la Microbiología. Vol II, Editorial Reverté S.A.

Jackson, T.C., Acuff, G.R., Vanderzant, C., Sharp, T.R., Savell, J.W., 1992, Identification and evaluation of volatile compounds of vacuum and modified atmosphere packaged beef strip loins, Meat Science, 31, 175-190.

Koutsoumains, K. P., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2004, A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and a_w when grown in suspension or on la solid surface, Food Microbiology, 21, 415-422.

Laza Muñoz, M., Laza Muñoz, J., 2006, Preelaboración y conservación de alimentos, 1º Edición, Ediciones Paraninfo, S.A.

Leal Quevedo, F.J., López López, P., 2008, Vacunas en Pediatría, 3º Edición, Editorial Médica Panamérica.

Liu, D., 2011, Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens, CRC Press, Taylor & Francis Group.

López, Dr. E.L., 2012, Infectología Pediátrica, Manual Práctico, 2º Edición, Kliczkowski, Arq. G., Kliczkowski.

López Rodríguez, M.J., Cárdenas Povedano, M., Osuna Molina. A., 2012, Manual de Laboratorio de Microbiología para el Diagnóstico de Infecciones Genitales, OmniaScience Scholar.

Manual Básico de Microbiología, Cultimed Panreac

Miranda López, J.M., 2007, Tratamiento antimicrobiano en medicina veterinaria: efectos sobre la microbiota intestinal de pollos y su repercusión en carnes de producción comercial y ecológica, Memoria para optar al grado de doctor, Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Veterinaria.

Mol, J.H.H., Hietbrink, E.A., Mollen, H.W.M., van Tinteren, J., 1971, Observation on the microflora of vacuum paked sliced cooked meat products, J. Appl. Bacteriol. 34,377,397.

Morcillo Ortega, G., Cortés Rubio, E., García López, J.L., 2013, Biotecnología y alimentación, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Cuadernos de la UNED Biotecnología y Alimentación.

Moreno García, B., 2006, Higiene e Inspección de Carnes I, Díaz de Santos.

Negroni, M., 2009, Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica, 2º Edición, Editorial Médica Panamericana.

Nychas, G.E., Marshall, D., Sofos, J., 2007, Meat poultry and sea food. In M.P.Doyle, L.R.Beuchat, T.J. Montville, Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, Chapter 6, ASM press.

Nychas, G.E., Skandamis, P.N., Tassou, C.C., Koutsoumanis, K.P., 2008, Meat spoilage during distribution, Meat Science, 78, 77-89.

Oliva, E., 2006, Manual de Prácticas de Microbiología I, II y Parasitología, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Renova González, M., UACJ.

Ordóñez, J.A., De Pablo, B., De Pablo, P.B., Asensio, M.A., Sanz, B., 1991, Selected chemical and microbiological changes in refrigerated pork stored in carbón dioxide and oxygen enriched atmospheres, J. Agric, Food Chem, 39, 668-672.

Pardo González, J.E., Pérez Sempere-Matarredona J.I., Parra López, V., Legorburo Serra, A., 1998, Industria Cárnica. El sistema de Análisis de Riesgo y control de Puntos Críticos, Ediciones de la Universidad de Castilla La Mancha.

Pascual Anderson, M.R., Calderón y Pascual, V., 2000, Microbiología Alimentaria, Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas, Díaz Santos, S.A. Díaz de Santos.

Pascual Anderson, M.R., 1982, Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas, Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto Nacional de Sanidad, Centro Nacional de Alimentación y Nutrición, Servicio de Microbiología.

Pascual Anderson, M.R., 2005, Enfermedades de origen alimentario. Su prevención, Díaz de Santos.

Rodríguez Cavallini, E., Gamboa Coronado, M., Hernández Chavarría, F., García Hidalgo, J.D., 2005, Microbiología General, Principios y Prácticas del Laboratorio, Universidad de Costa Rica.

Rodríguez Caballero, V., Simón Magro, E., 2008, Bases de la Alimentación Humana, Paz Otero, P., Netbiblo, S.L.

Romero Cabello, Raúl., 2007, Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3º Edición, Editorial Médica Panamericana.

Sánchez Rodríguez, J.A., Serrano Jiménez, S., Marfil Navarro, R., Jodral Villarejo, M. L., 2009, Patógenos emergentes en la línea de sacrificio porcino, Fundamentos de seguridad alimentaria, Díaz de Santos, S.A.

Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L., Painter, P.R., 1992, Microbiología, 2º Edición, Editorial Reverté S.A.

Tortora, G.J., Funken, B.R., Case, C.L., 2007, Introducción a la Microbiología, Editorial Médica Panamericana.

Vázquez, C., De Cos., A.I., López-Nomdedeu, C., 2005, Alimentación y nutrición, Díaz de Santos.

Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, E.W., Procop, G.W., 2008, Koneman, Diagnóstico Microbiológico, Editorial Médica Panamericana.

