



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de alimentos cárnicos

Eva López Corral

Junio, 2017



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Facultad de Ciencias Experimentales



Facultad de
Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de alimentos cárnicos

Eva López Corral

Junio, 2017

1. RESUMEN.....	5
1.1. Abstract.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	6
2.1. Vías de contaminación.....	7
2.2. Métodos de conservación.....	8
2.3. Principales grupos bacterianos contaminantes de carne.....	9
2.4. Principales grupos bacterianos investigados en el presente estudio.....	10
3. OBJETIVOS.....	12
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
4.1. Medios de cultivo.....	13
<i>4.1.1. Composición medios de cultivo.....</i>	<i>14</i>
<i>4.1.2. Resultados esperados de crecimiento.....</i>	<i>18</i>
4.2. Solución salina.....	18
4.3. Procesado de alimentos.....	18
4.4. Recuentos bacterianos.....	19
4.5. Tinción de Gram.....	20
4.6. Prueba de la catalasa.....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1. Crecimiento bacteriano en medios de cultivo e identificación macroscópica.....	23
5.2. Cálculo de UFC/ml.....	28
<i>5.2.1. UFC/ml Carne picada pechuga de pollo.....</i>	<i>28</i>
<i>5.2.2. UFC/ml Espinazo de cerdo.....</i>	<i>28</i>
<i>5.2.3. UFC/ml Mollejas de pollo.....</i>	<i>29</i>
<i>5.2.4. UFC/ml Hígado de ternera.....</i>	<i>29</i>
<i>5.2.5. UFC/ml Conejo.....</i>	<i>29</i>

5.2.6. UFC/ml Panceta de cerdo.....	29
5.2.7. UFC/ml Lomo adobado de cerdo.....	30
5.2.8. UFC/ml Corazón de cordero.....	30
5.2.9. UFC/ml Lengua de conejo.....	30
5.2.10. UFC/ml Pavo.....	30
5.3. Tinción de Gram e identificación microscópica.....	31
5.4. Prueba de la catalasa.....	36
5.4.1. Carne picada de pechuga de pollo.....	36
5.4.2. Espinazo de cerdo.....	36
5.4.3. Mollejas de pollo.....	37
5.4.4. Hígado de ternera.....	37
5.4.5. Conejo.....	37
5.4.6. Panceta de cerdo.....	37
5.4.7. Lomo adobado de cerdo.....	38
5.4.8. Corazón de cordero.....	38
5.4.9. Lengua de conejo.....	38
5.4.10. Pavo.....	38
5.5. Análisis estadístico.....	39
6. DISCUSIÓN.....	40
7. CONCLUSIONES.....	41
8. BIBLIOGRAFÍA.....	42

1. RESUMEN

El objetivo de la inspección de la carne es garantizar la salud animal y pública mediante la prevención, detección y control de los peligros derivados de los animales. La calidad y seguridad de los productos cárnicos se puede estimar mediante la evaluación de su contaminación por microorganismos indicadores de higiene y algunos patógenos transmitidos por los alimentos. En este trabajo se estimó la incidencia de contaminación microbiana en 10 muestras de carne fresca, sin tratamiento de conservación alguno, analizando la presencia y realizando un estudio de las distintas especies bacterianas presentes. Para ello se ha realizado la estimación de la carga microbiana en medios selectivos y no selectivos y una identificación preliminar de los microorganismos aislados mediante tinción de Gram y posterior observación al microscopio, así como la realización de la prueba catalasa. Por último se realizó un estudio comparativo de los resultados obtenidos en lotes procedentes de distintas especies animales

Palabras clave: Calidad, seguridad alimentaria, productos cárnicos.

1.1 Abstract:

The objective of meat inspection is to ensure animal and public health through the prevention, detection, and control of animal-derived hazards. The quality and safety of meat products can be estimated by assessing their contamination by hygienic indicator microorganisms and some foodborne pathogens. In this work, the incidence of microbial contamination was estimated in 10 samples of fresh meat, with no conservation treatment, by analyzing the microbial contamination and carrying out a study of the different bacterial species detected. For this purpose, the microbial load on selective and non-selective media has been estimated, as well as a subsequent preliminary identification of the microorganisms isolated by Gram staining, microscopic observation and the biochemical test called catalase. Finally, a comparative study of the results obtained in batches from different animal species was carried out.

Key words: Quality, food safety, meat products.

2. INTRODUCCIÓN

La carne es la parte comestible del músculo estriado esquelético (incluido el tejido conectivo) de animales sacrificados en condiciones higiénicas y humanitarias, proveniente de bovinos, ovinos, porcinos, caprinos y équidos, y se aplica también a animales de corral, de caza, de pelo y plumas, y algunos mamíferos marinos declarados aptos para el consumo humano.

Los productos cárnicos frescos se definen como la 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).

La masa interna de la carne no contiene microorganismos o éstos son escasos, aun cuando eventualmente se han encontrado gérmenes en los nódulos linfáticos, médula ósea e incluso en el mismo músculo. En los linfonodos de los animales de carnes rojas se han aislado estafilococos, estreptococos, *Clostridium* y *Salmonella*. Sin embargo, la contaminación más importante es de origen externo y se produce durante el desangrado, desuello y cuarteado, los microorganismos proceden principalmente de las partes externas del animal (piel, pezuña y pelo) y del tracto intestinal.

Cabe destacar que la carne es un producto rico en diversos nutrientes como hidratos de carbono, nitrógeno, proteínas y vitaminas lo que unido a una serie de factores propios, tales como la temperatura, pH, potencial REDOX, agua disponible, etc., contribuyen a la proliferación bacteriana.

Los métodos humanitarios de sacrificio aprobados, ya sean mecánico, químicos o eléctricos, dan lugar a una contaminación que debe controlarse mediante buenas prácticas, habilidad y rapidez durante esta fase del proceso. Cuando un animal se sacrifica por el método clásico con el cuchillo, las bacterias que contaminan éste, pueden diseminarse con gran rapidez en las carnes de las diversas partes de la canal, vehiculadas por la sangre y la linfa. En la superficie externa del animal, además de su flora natural existe un gran número de especies de microorganismos provenientes del suelo, agua, piensos y estiércol, mientras que el intestino contiene

los microorganismos propios de esta parte del aparato digestivo. Los cuchillos, paños, aire, manos y ropa del personal pueden actuar como vehículos de contaminación. Durante la manipulación posterior de la carne puede también haber contaminación, a partir de las carretillas de transporte, cajas u otros recipientes, así como de otras carnes contaminadas. Durante el procesamiento de productos elaborados con carne, ciertas máquinas como picadoras, embutidoras y otras, pueden igualmente aportar microorganismos perjudiciales en cantidades importantes.

2.1. Vías de contaminación

La carne adquiere microorganismos desde momento de su entrada en el matadero. Algunos de estos pueden causar enfermedades en el propio consumidor pero, en la mayoría de los casos, provocan la alteración del producto. Desde su llegada al matadero hasta que la carne es vendida al consumidor el principio fundamental consiste en reducir la entrada de posibles microorganismos ajenos y evitar una mayor proliferación de los microorganismos preexistentes en la carne (Moreno, 2006).

Los microorganismos que alteran la carne, llegan a ella por infección del animal vivo (contaminación endógena) o por invasión post mortem (contaminación exógena). Aunque ambas son de gran importancia, la alteración de la carne a consecuencia de la contaminación exógena es la más frecuente. 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. Igualmente, también puede producirse contaminación cruzada cuando la pieza de carne es refrigerada en las cámaras frigoríficas junto a otras piezas de carne.

Debido a la gran variedad de fuentes de contaminación, los tipos de microorganismos que suelen encontrarse en las carnes son muchos y muy variados. La contaminación de canales de bovino y porcino después del sacrificio y enfriamiento, es variable y puede oscilar entre 10^1 - 10^5 mesófilos aeróbicos por cm^2 . Inicialmente la contaminación superficial por sicrotróficos es menor que 10^2 y la contaminación con enterobacterias es menor que 10^1 - 10^2 por cm^2 .

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).

2.2. Métodos de conservación

Cuando conservamos los alimentos, sea cual sea el método de conservación, nuestro objetivo no es sólo evitar o reducir el crecimiento bacteriano sino que también intentamos evitar que se alteren sus propiedades tanto físico-químicas o nutricionales.

En la carne y debido a sus propiedades nutricionales, la conservación se hace más necesaria si cabe, ya que la descomposición y pérdida de propiedades es mucho más rápida que en otros productos alimenticios porque, como hemos explicado anteriormente, la carne es una fuente ideal de nutrientes que favorece la proliferación bacteriana.

Existen numerosos procesos de conservación de la carne que van desde procesos de conservación por frío, como la refrigeración y congelación, procesos físicos como la pasteurización y esterilización, hasta procesos químicos como la salazón, ahumado, desecación y adobo, entre otros muchos.

Los principales procesos para aumentar la vida útil de los productos cárnicos así como los más utilizados son:

- Refrigeración: En el que sometemos el producto a bajas temperaturas, en torno a 2 y 8 °C sin llegar a congelar. Con la disminución de la temperatura se consigue que la proliferación bacteriana no sea tan rápida como a temperatura ambiente. Sin embargo no es el método más apropiado si necesitamos conservar los alimentos durante un largo periodo de tiempo. Este proceso se lleva a cabo en alimentos crudos o cocinados para ser mantenidos en un estado higiénico sanitario adecuado (Laza y Laza, 2006). La refrigeración actúa como agente 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 psicrófilas, son capaces de vivir en condiciones de baja temperatura como ocurre en el caso del género *Listeria*. (Amerling, 2001).

- Congelación: En el que sometemos al producto a temperaturas bajo cero. 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 (Vicente, 2017).
- Deseccación: La carne contiene una cantidad de humedad suficiente para permitir la actividad de sus propias enzimas y la de los microorganismos, de forma que para conservarla por desecación es necesario que su humedad sea eliminada o fijada. La humedad de todos los alimentos se puede eliminar mediante varios procedimientos, que van desde la desecación mediante la acción de los rayos solares hasta otros procedimientos más complejos que se emplean en la actualidad.

El secado es uno de los métodos más antiguos, utilizados por el hombre para la conservación de alimentos.

El agua presente en la carne, no se encuentra en estado puro, si no que puede estar en forma de solución de sólidos, de gel, en emulsión o ligada de diversos modos a los constituyentes sólidos (Desrosier, 1991).

- Salazón: Se trata de un método tradicional de conservación consistente en el agregado de sal junto a otros ingredientes y que acompaña a algunos tratamientos (secado, cocción, etc.). La sal puede ser agregada antes de la preparación (salazón seca), o se inyecta salmuera (salazón húmeda). Principalmente, su función es bacteriostática ya que a una concentración del 10% de cloruro sódico se inhibe el crecimiento de los microorganismos y al 5% afecta a anaerobios y favorece el desarrollo de bacterias lácticas. (Casp, 2003).
- Adobo: Este método se basa en adicionar al elemento mezcla de vinagre y especias con actividad antibacteriana. Se emplea fundamentalmente vinagre que impide el desarrollo de algunos microorganismos de forma directa al modificar el pH y por tanto inhibiendo el crecimiento microbiano o bien indirectamente, pues al bajar el pH disminuye también la termoresistencia de los microorganismos con lo que se favorece la acción de tratamientos térmicos (Casp, 2003).

2.3. Principales grupos bacterianos contaminantes de carne

La piel de los animales es la principal fuente de contaminación de la carne. Dependiendo de la procedencia de la carne pueden aparecer unos tipos bacterianos

u otros, mientras que la carne de res suele contener *E. coli* y *Salmonella*, en la carne de pollo y aves en general aparece *Salmonella*.

Los contaminantes comunes de las canales son bacilos Gram negativos y micrococcos, incluidos *Pseudomonas* spp., *Moraxella* spp., *Flavobacterium* spp., entre otras (Nortje et al, 1990). Adicionalmente pueden existir bacterias productoras de ácido láctico, hongos, levaduras y virus entéricos en bajas concentraciones. La contaminación es variable y pueden incluirse algunos microorganismos patógenos como *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolítica/pseudotuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* y *C. botulinum*, que provienen o bien de la microbiota intestinal o del medio ambiente. Alguno de estos patógenos están más asociados a la carne de unas especies que de otras, como por ejemplo, *Yersinia enterocolítica* en la carne de cerdo (Fukushima, 1991).

El procesamiento de las canales y el subsecuente manejo de la carne, determinan el destino de los microorganismos originalmente presentes en ella. En general, psicrófilos como *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* y *Lactobacillus*, predominan en carne refrigerada, en cantidades que dependen del pH inicial y de la atmósfera gaseosa. Los microorganismos mesófilos adquieren importancia cuando la temperatura de almacenamiento se eleva a 15°C (Sofos, 2008).

2.4. Principales grupos bacterianos investigados en el presente estudio

Durante el desarrollo del estudio, nos centraremos en la investigación de distintos grupos bacterianos, los cuales son, principalmente:

- **Bacterias lácticas:** Existen dos importantes géneros de bacterias productoras de ácido láctico, *Streptococcus* y *Lactobacillus*.

Son bacterias anaerobias facultativas y homofermentadoras, ya 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 Gram positivas, compuestas principalmente de peptidoglicano, en el cual se encuentran 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 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 beta hemolíticos. El resto son no hemolíticos o alfa hemolíticos (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.

- **Estafilococos:** El género *Staphylococcus* son cocos Gram positivos aerobios o anaerobios facultativos e inmóviles que no forman esporas. Se agrupan formando racimos, son catalasa positivos y producen fermentación de 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 microbiota normal de las mucosas y la piel, en heridas y en general en distintos procesos patógenos.

Dentro de este grupo encontramos *Staphylococcus aureus* (agente etiológico de muchas infecciones). *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* son oportunistas, es decir, sólo producen patogénesis en pacientes debilitados o inmunodeprimidos.

- **Enterobacterias:** Grupo formado por numerosas especies de bacilos Gram negativos no esporulados. Son fermentadores de la glucosa con una alta actividad metabólica. Están agrupadas en la misma familia por sus similitudes estructurales y metabólicas. En la actualidad está formada por 30 géneros y 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 compuestos por proteínas que igualmente presentan carácter antigénico (Ag H) (Ausina, 2005).

En este grupo nos centraremos sobre todo en *Echerichia coli* que se encuentra de manera natural en la microbiota del intestino delgado y grueso sin causar daño alguno. Aparece, por tanto, en las materias fecales del hombre y en diversas especies animales de sangre caliente. Se trata de un bacilo Gram negativo que puede presentar formas móviles con flagelos o inmóviles. Las colonias de este tipo bacteriano se aprecian en el medio de cultivo EMB (con eosina y azul de metileno) como colonias verdes con marcado brillo metálico. En las pruebas bioquímicas es positiva al indol, descarboxilasa de lisina, fermentación de manitol y gas a partir de la glucosa (Romero, 2007).

- **Enterococos:** Son cocos Gram positivos, no formadores de endosporas. Se presentan en forma de pares o de cadenas cortas y no tienen movilidad. Son anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, con metabolismo fermentativo. Fermentan un amplio rango de carbohidratos con producción principalmente de ácido láctico, pero no de gas. Presentan requerimientos nutricionales complejos. Son catalasa negativos o, más comúnmente, débilmente positivos. (Pascual, 2002).

3. OBJETIVOS

- Evaluar la carga microbiana en alimentos cárnicos de diferentes orígenes animales.
- Realizar una identificación preliminar de los microorganismos aislados.
- Realizar un estudio comparativo de los resultados obtenidos en lotes procedentes de distintas especies animales.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se va a llevar a cabo el análisis de 10 muestras de productos cárnicos adquiridas de diferentes carnicerías a pequeña (comercios locales) y gran escala (grandes superficies). Las 10 muestras sujetas a estudio son:

- Espinazo de cerdo
- Mollejas de pollo
- Carne picada de pollo
- Hígado de ternera
- Pulmones de conejo
- Panceta de cerdo
- Pavo
- Corazón de cordero
- Lomo adobado de cerdo
- Lengua de conejo

Cabe destacar que las muestras para estudio fueron adquiridas y conservadas bajo refrigeración. Igualmente las muestras fueron manipuladas de la manera más aséptica posible, para evitar una contaminación añadida y fueron analizadas a temperatura ambiente.

4.1. Medios de cultivo

Un medio de cultivo general, utilizaremos TSA, utilizado para propósitos generales, favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, y anaerobios facultativos y estrictos.

4 medios selectivos. Los utilizados son:

- ❖ **MRS**, desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas.
- ❖ **EMB**, utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*, inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram positivas.
- ❖ **KAA**, para la detección presuntiva de estreptococos del grupo D de Lancefield (enterococos) en muestras de alimentos de acuerdo con Mossel et al.
- ❖ **Voguel-Johnson (VJ)**: utilizado para el aislamiento de *Staphylococcus aureus* coagulasa y manitol positivo.

Todos los medios de cultivo utilizados son de la casa comercial Scharlab (Barcelona) y son preparados según las instrucciones del fabricante. Tras el correspondiente pesado y posterior disolución en agua destilada, los medios se esterilizan por autoclavado, se atemperan a 50°C en el baño (en este momento, y si fuese necesario, se adicionan los complementos a los diferentes medios) y se vierten en placas de Petri a razón de 15 ml por placa.

En el medio general TSA sembraremos 4 diluciones x 3 alimentos x 2 (se harán por duplicado)= 24 placas.

Igualmente, de los medios selectivos necesitaremos:

- **MRSA:** 2 diluciones (0 o solución inicial y -1) x 3 alimentos x 2 (se harán por duplicado)= 12 placas.
- **EMB:** 2 diluciones (0 o solución inicial y -1) x 3 alimentos x 2 (se harán por duplicado)= 12 placas.
- **KAA:** 2 diluciones (0 o solución inicial y -1) x 3 alimentos x 2 (se harán por duplicado)= 12 placas.
- **VJ:** 2 diluciones (0 o solución inicial y -1) x 3 alimentos x 2 (se harán por duplicado)= 12 placas.

Por lo que finalmente, se prepararán:

- **MRSA:** Un matraz con 800 ml que contienen 49,6 g del medio deshidratado.
- **EMB:** Un matraz con 800 ml que contienen 28,8 g del medio deshidratado.
- **KAA:** Un matraz con 800 ml que contienen 34,4 g del medio deshidratado.
- **VJ:** Un matraz con 800 ml que contienen 48 g del medio deshidratado.

4.1.1 Composición de los medios de cultivo.

TSA (g/L):

- Tripteína 15.0
- Peptona de soja 5.0
- Cloruro de sodio 5.0
- Agar 15.0

pH final: 7,3±0,2

Fundamento: La tripteína y la peptona de soja aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. La peptona de soja aporta también carbohidratos que estimulan el crecimiento de muchos microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

MRS (g/L):

- Peptona 10,0
- Polvo 'Lab-Lemco' 8.0
- Extracto de levadura 4.0
- Glucosa 20,0
- Mono- oleato de sorbitán 1 ml
- Hidrogenofosfato dipotásico 2,0
- Acetato de sodio 3H₂O 5.0
- Citrato de triamonio 2,0
- Sulfato magnésico 7H₂O 0,2
- Sulfato de manganeso 4H₂O 0,05
- Agar 10,0

pH final: 7,4±0,2

Fundamento: Este medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monooleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibidor del crecimiento de bacterias Gram negativas.

EMB (g/L):

- Eosina amarillenta 0.4
- Azul de metileno 0.065
- Lactosa 5.0
- Peptona bacteriológica 10.0
- Di-potasio hidrógeno fosfato 2.0
- Sacarosa 5.0
- Agar 13.5

pH final 7.2±0.2

Fundamento: Este medio de cultivo combina las fórmulas de Holt-Harris y Teague con la de Levine, para obtener un mejor rendimiento en el aislamiento selectivo de enterobacterias y otras especies de bacilos Gram negativos.

Es nutritivo por la presencia de peptona que favorece el desarrollo microbiano. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre una amplia variedad de bacterias Gram positivas. El agar es el agente solidificante.

Muchas cepas de *Escherichia coli* y *Citrobacter* spp. presentan un característico brillo metálico (**Fotografía 7**). Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras.

También, pueden crecer especies de *Candida* y se observan como colonias rosadas y puntiformes; la siembra en profundidad permite el desarrollo de clamidosporas en *C. albicans*. *Enterococcus* spp. crece en este medio como colonias puntiformes y transparentes, mientras que *Acinetobacter* spp. y otras bacterias oxidativas se observan como colonias de color azul lavanda; esto puede ocurrir aunque las cepas no sean capaces de acidificar a partir de lactosa al 0.5% y ello se debe a la incorporación de azul de metileno a sus membranas. En este medio se obtiene además, un buen desarrollo de especies de *Salmonella* y *Shigella*.

KAA (g/L):

- Triptona 20.0
- Extracto de levadura 5.0
- Cloruro de sodio 5.0
- Citrato de sodio 1.0
- Esculina 1.0
- Citrato de hierro amónico 0,50
- Azida sódica 0.15
- Sulfato de kanamicina 0.020
- Agar bacteriológico 15.0

pH final 7.0±0.2

Fundamento: Se trata de un medio selectivo para el aislamiento y confirmación de presencia de enterococos intestinales en los alimentos. La kanamicina, la azida sódica y el citrato sódico tienen un gran efecto inhibitorio sobre la microbiota

bacteriana acompañante. Inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas, y el medio es altamente selectivo para enterococos que hidrolizan la esculina. Las bacterias que hidrolizan la esculina para dar glucosa y esculetina presentan zonas negras alrededor de las colonias a partir de la reacción de la esculetina resultante con los iones de hierro (**Fotografía 5**). La triptona proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El extracto de levadura es una fuente de vitaminas, particularmente del grupo B esencial para el crecimiento bacteriano. El cloruro de sodio suministra electrolitos esenciales para el transporte y el equilibrio osmótico bacteriológico. El agar es el agente solidificante.

Voguel-Johnson (g/L):

- Tripteína 10.0
- Extracto de levadura 5.0
- Manitol 10.0
- Fosfato dipotásico 5.0
- Cloruro de litio 5.0
- Glicina 10.0
- Agar 16.0
- Rojo fenol 0.025

pH final: 7.2 ±0.2

Fundamento: Consiste en una modificación realizada por Voguel y Johnson, quienes agregaron el indicador de pH e incrementaron el contenido de manitol al Agar Telurito Glicina desarrollado por Zebovitz, Evans y Niven.

En el medio de cultivo, la tripteína y el extracto de levadura aportan los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano.

El manitol es el hidrato de carbono fermentable. El telurito de potasio, el cloruro de litio y la alta concentración de glicina inhiben el desarrollo de la microbiota habitual del tracto respiratorio superior y de algunas especies de microorganismos Gram positivos y negativos, permitiendo el crecimiento selectivo de estafilococos. El rojo fenol es el indicador de pH y el agar es el agente solidificante.

Es diferencial por la fermentación de manitol y reducción de telurito a telurio.

Los estafilococos coagulasa positivo, fermentan el manitol, produciendo la acidificación del medio y el viraje del indicador de pH al color amarillo (**Fotografía 6**), y también reducen el telurito a telurio observándose como colonias de color negro.

4.1.2 Resultados esperados de crecimiento:

- * TSA: Todos tipo de bacterias. *Staphylococcus* identificables bajo hemólisis.
- * VJ: *Staphylococcus aureus* con colonias negras, rodeada de una zona amarilla y *Staphylococcus epidermidis* colonias negras, pequeñas, sin zona amarilla alrededor.
- * KAA: *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* colonias de color negro
- * MRS: Crecimiento satisfactorio de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus gasseri*.
- * EMB: *Escherichia coli* colonias verdosas con brillo metálico; *Klebsiella pneumoniae* colonias mucosas, rosa púrpura, confluentes; *Proteus mirabilis* colonias incoloras; *Enterococcus faecalis* colonias incoloras, pequeñas, puntiformes; *Shigella flexneri* colonias incoloras y *Salmonella typhimurium* colonias incoloras

4.2. Solución salina

Prepararemos matraces con 45 ml de solución salina al 0,9%, para cada alimento, luego tendríamos que preparar 135 ml.

Además, también necesitaremos tubos eppendorf con 900 µl de solución salina al 0,9%, y se realizarán cuatro diluciones por alimento, -1, -2, -3 y -4, por lo que necesitaríamos 12 tubos, pero prepararemos una gradilla completa de 20 tubos eppendorf.

Finalmente, prepararemos un matraz con 200 ml de solución salina al 0,9% que contienen un total de 1,8 gramos de ClNa.

4.3. Procesado de alimentos

De cada alimento se pesan 5 gramos iniciales que se añaden a 45 ml de solución salina estéril al 0,9%, para ser posteriormente procesado en un homogeneizador (Stomacher 80 Biomaster, Seward Ltd.) (**Fotografía 1**).

Posteriormente se preparan diluciones seriadas añadiendo 100 μ l de esta suspensión madre sobre 0,9 ml de solución salina estéril y así sucesivamente.



Fotografía 1. Stomacher

4.4. Recuentos bacterianos

Se siembran 100 μ l de cada dilución, de la -1 hasta la -4, (**Figura 1**) en placas de los medios generales, en este caso, TSA y 100 μ l de las dos primeras diluciones, 0 o solución madre y -1, (**Figura 2**) en las placas de los medios selectivos anteriormente descritos (**Fotografía 2**).

Los recuentos se realizan tras 24 y 48 horas de incubación a 37°C exceptuando las placas de MRSA que se incuban a 30°C, sumando las colonias obtenidas en ambos tiempos para obtener resultados finales.

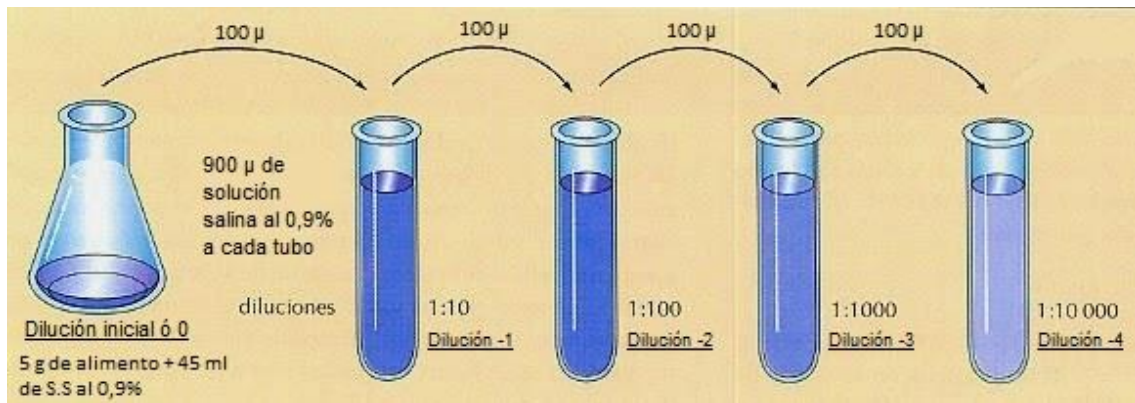


Figura 1. Diluciones seriadas para siembra en medio no selectivo TSA

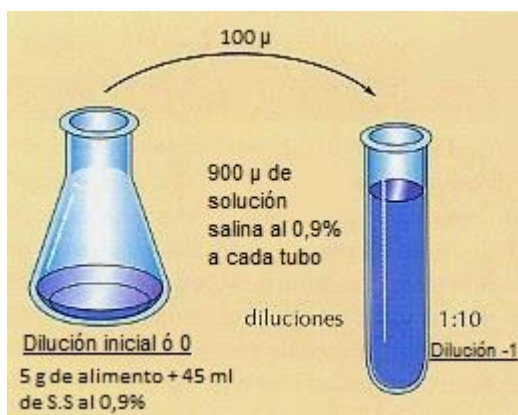
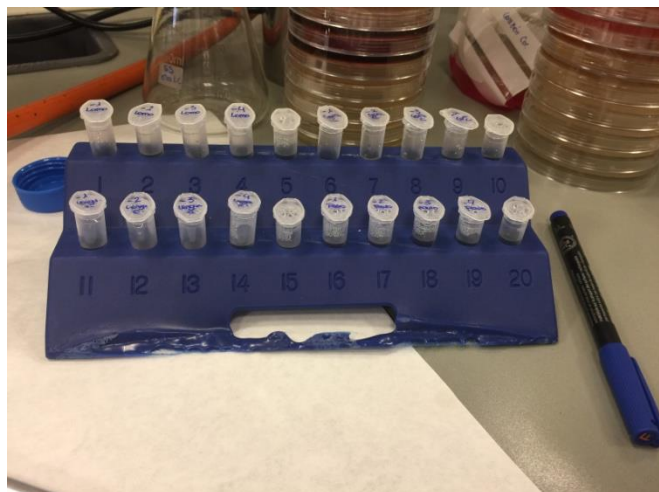


Figura 2. Dilución para siembra en medios selectivos



Fotografía 2. Diluciones seriadas

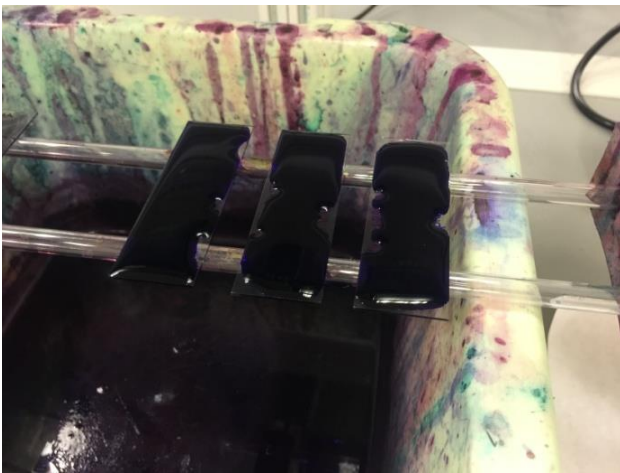
4.5. Tinción de Gram

La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleada en bacteriología para la visualización de bacterias. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram (1853-1938), que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para distinguir la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a

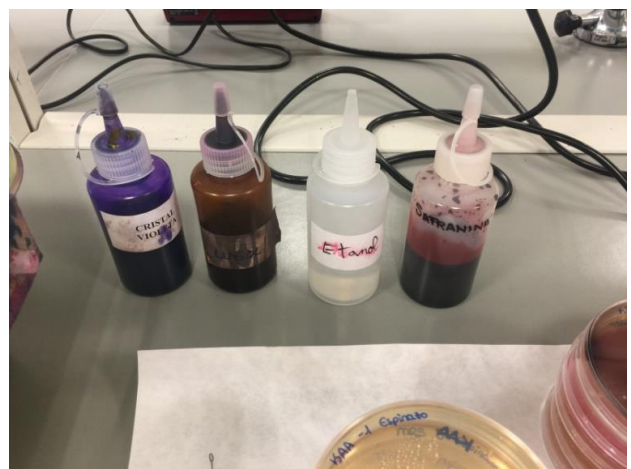
la diferenciación bacteriana, considerándose bacterias Gram positivas a las que se visualizan de color morado, y bacterias Gram negativas a las que se visualizan de color rosa o rojo.

Los pasos a seguir para la realización de esta tinción son los siguientes:

1. Seleccionar una colonia.
2. Poner sobre el porta una pequeña gota de agua destilada y depositar con el asa de siembra la colonia.
3. Extender.
4. Dejar secar.
5. Fijar la extensión.
6. Añadir cristal violeta y dejar actuar 2 minutos (**Fotografía 3**).
7. Escurrir el cristal violeta y añadir lugol. Dejar actuar otros 2 minutos.
8. Decolorar con alcohol durante 10 segundos.
9. Lavar abundantemente la preparación.
10. Añadir safranina y dejar actuar 3 minutos.
11. Lavar y observar al microscopio con el objetivo 100x aplicando previamente sobre la muestra una pequeña gota de aceite de inmersión.



Fotografía 3. Proceso de tinción



Fotografía 4. Colorantes utilizados

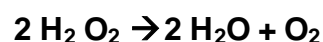
Las bacterias Gram positivas y Gram negativas se tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. La pared de la célula bacteriana sirve para dar su tamaño y forma al organismo así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula Gram positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano así como algo de ácido teicoico. Generalmente, el 80%-90% de la pared de la célula Gram positiva es peptidoglicano. La pared de la célula Gram negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula Gram negativa es peptidoglicano.

La diferencia esencial entre esos dos tipos de células está por tanto en su resistencia a la decoloración; esta resistencia se debe probablemente al hecho de que en el caso de bacterias Gram negativas, la mezcla de alcohol/acetona es un solvente lipídico y disuelve la membrana exterior de la pared de la célula (y también puede dañar la membrana citoplásmica a la que se une peptidoglicano). La delgada capa de peptidoglicano es incapaz de retener el complejo cristal violeta-yodo y la célula se decolora. Las células Gram positivas, a causa de sus paredes celulares más gruesas (tienen más peptidoglicano y menos lípido), no son permeables al disolvente, provocando que el complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular. Después de la decoloración las células Gram positivas son todavía azules o moradas, pero las Gram negativas son incoloras.

Para poner de manifiesto las células Gram negativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica (**Fotografía 4**).

4.6. Prueba de la catalasa

La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva.



El reactivo utilizado en la prueba es el peróxido de hidrogeno al 30%, Hay diferentes técnicas para realizar la prueba, la más común y la utilizada en este caso, es poner una gota de peróxido en el portaobjetos y posteriormente con el asa de siembra tomar un poco de bacteria a partir de una colonia aislada, si se observa el burbujeo, generalmente intenso, significa que hay producción de oxígeno por lo tanto se entiende que hay presencia de la enzima catalasa. Hay bacterias que dan una reacción positiva débil, aunque son las menos (Rodríguez Cavallini, 2005).

La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas. El principal objetivo de esta prueba es separar *Micrococacceae* (positiva) de *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp. (negativa).

5. RESULTADOS

5.1. Crecimiento bacteriano en medios de cultivo e identificación macroscópica

Para el recuento, se seleccionan las placas de Petri donde el crecimiento de colonias esté comprendido entre 30 y 300 para una mayor fidelidad de resultados y una mayor precisión en el cálculo de UFC/ml.

Con los tres primeros alimentos sujetos al estudio (espinazo de cerdo, mollejas de pollo y carne picada de pechuga de pollo) observamos crecimiento bacteriano en todas las placas y diluciones (**Tabla 1**) y las placas con diluciones seleccionadas para el cálculo se muestran el **tabla 2**.

.

Con los tres siguientes alimentos cárnicos sujetos a estudio (pulmones de conejo, hígado de ternera y panceta de cerdo) observamos crecimiento en todas las placas y diluciones (**Tabla 3**) y las placas con diluciones seleccionadas para el cálculo se muestran el **tabla 4**.

Los cuatro últimos alimentos cárnicos sujetos a estudio fueron pavo, cordero, lomo adobado de cerdo y lengua de conejo. Los resultados se muestran en la **tabla 5** y las placas con diluciones seleccionadas para el cálculo se muestran el **tabla 6**.

Una vez contadas las colonias y habiendo realizado los cálculos necesarios para hallar el valor de unidades formadoras de colonias por ml, pasaremos a realizar de cada una de las placas seleccionadas y, dentro de cada una de ellas de las colonias con diferentes morfologías, una tinción de Gram y posteriormente, la prueba de la catalasa.

	Medio de cultivo	Crecimiento	Identificación macroscópica de
			las colonias
Carne picada de pechuga de pollo	TSA	+	Amarillas y blancas
	VJ	+	Naranjas y blancas
	KAA	+	Negras (Fotografía 5) y blancas
	MRS	+	Blancas
	EMB	+	Negras y rosas
Espinazo de cerdo	TSA	+	Blancas
	VJ	+	Amarillas y blancas
	KAA	+	Blancas
	MRS	+	Blancas
	EMB	+	Rosas, negras y verdes con brillo metálico
Mollejas de pollo	TSA	+	Blancas
	VJ	+	Blancas
	KAA	+	Blancas y negras
	MRS	+	Blancas
	EMB	+	Rosas y negras

Tabla 1. Crecimiento bacteriano en las 3 primeras muestras

	TSA	VJ	KAA	MRS	EMB
Carne picada	-3	-1	0	-1	0
Espinazo	-3	-1	0	-1	-1
Mollejas	-4	-1	0	0	-1

Tabla 2. Selección de placas sembradas con diluciones para el cálculo de UFC/ml de las 3 primeras muestras



Fotografía 5. Zonas negras por la hidrólisis de esculina

	Medio de cultivo	Crecimiento	Identificación macroscópica de las colonias
Hígado de ternera	TSA	+	Amarillentas grandes y pequeñas
	VJ	+	Transparentes y amarillentas (medio virado a amarillo) (Fotografía 6)
	KAA	+	Colonias pequeñas
	MRS	+	Blancas pequeñas
	EMB	+	Negras, rosas y verdes brillantes
Conejo	TSA	+	Blancas y amarillas
	VJ	+	Amarillas y blancas
	KAA	+	Blancas
	MRS	+	Blancas
	EMB	+	Rosas, negras y verdes con brillo metálico
Panceta de cerdo	TSA	+	Transparentes y blancas
	VJ	+	Amarillas, blancas y transparentes
	KAA	+	Blancas y negras
	MRS	+	Blancas
	EMB	+	Verdes brillantes (Fotografía 7) y negras

Tabla 3. Crecimiento bacteriano en los 3 siguientes alimentos

	TSA	VJ	KAA	MRS	EMB
Híg. Ternera	-3	-1	-1	-1	-1
Conejo	-3	-1	0	-1	-1
Panceta	-4	-1	-1	-1	-1

Tabla 4. Selección de placas sembradas con diluciones para el cálculo de UFC/ml de las 3 siguientes muestras



Fotografía 6. Acidificación del medio VJ y viraje a amarillo



Fotografía 7. Colonias verdes con brillo metálico características de *E. coli*

	Medio de cultivo	Crecimiento	Identificación macroscópica de
			las colonias
Pavo	TSA	+	Blancas y amarillas
	VJ	+	Blancas mucosas y opacas (medio rosado)
	KAA	+	Blancas y negras
	MRS	+	Blancas
	EMB	+	Rosas y negras
Lengua de conejo	TSA	+	Blancas
	VJ	+	Naranjas, blancas y amarillas (medio amarillento)
	KAA	+	Blancas
	MRS	+	Blancas
	EMB	+	Rosas y negras
Cordero	TSA	+	Blancas, amarillas y transparentes
	VJ	+	Amarillas
	KAA	-	Sin crecimiento
	MRS	+	Blancas
	EMB	+	Naranjas y negras
Lomo adobado cerdo	TSA	+	Blancas pequeñas, mucosas y con aspecto de hongo
	VJ	+	Blancas y naranjas
	KAA	+	Blancas y negras
	MRS	+	Blancas
	EMB	+	Rosas y negras

Tabla 5. Crecimiento bacteriano en los 4 últimas muestras

	TSA	VJ	KAA	MRS	EMB
Lomo adb.	-4	0	0	-1	0
Cordero	-1	0	No crec.	0	0
Lng. Conejo	-2	-1	0	-1	0
Pavo	-2	-1	0	-1	-1

Tabla 6. Selección de placas sembradas con diluciones para el cálculo de UFC/ml de las 4 últimas muestras

5.2. Cálculo de UFC/ml

Para el cálculo de unidades formadoras de colonias por ml necesitamos como hemos explicado anteriormente, seleccionar las placas con un crecimiento bacteriano de entre 30 y 300 colonias. La fórmula general es la siguiente:

$$\text{Unidades formadoras de colonias por ml} = \frac{n^{\circ} \text{ colonias} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volúmen}}$$

En el apartado factor de dilución es importante aclarar que en nuestro caso, partimos de una dilución inicial o solución madre que debemos considerar al calcular la dilución de la placa seleccionada, de manera que en el ejemplo concreto del TSA, la dilución seleccionada es la -3, luego el factor de dilución sería 10^3 pero como partimos de la solución madre que es una dilución de 5 gramos en 45 ml de solución salina, el número definitivo para aplicar en la fórmula sería 10^4 .

También es importante destacar que no en todas las placas seleccionadas hemos podido contabilizar entre 30 y 300 colonias, algunas de ellas se quedan por debajo del valor mínimo de 30 y otras superan con creces el valor máximo de 300.

Los resultados se expresan más abajo en forma de tablas (de la **tabla 7 a la 16**) en UFC/ml y recalculadas en LOG base 10 como normalización para posterior análisis estadístico (**Gráfica 1**).

5.2.1. Carne picada de pechuga de pollo:

	TSA	VJ	KAA	MRS	EMB
UFC/ml	$2,26 \times 10^7$	$>3,00 \times 10^5$	$2,52 \times 10^4$	$>3,00 \times 10^5$	$3,10 \times 10^3$
LOG base 10	6,35	5,48	4,40	5,48	3,49

Tabla 7. Resultados UFC/ml y Log base 10 para la muestra de carne picada de pechuga de pollo

5.2.2. Espinazo de cerdo:

	TSA	VJ	KAA	MRS	EMB
UFC/ml	$2,89 \times 10^7$	$>3,00 \times 10^5$	$2,03 \times 10^4$	$1,79 \times 10^5$	$1,58 \times 10^5$
LOG base 10	7,46	5,48	4,31	5,25	5,20

Tabla 8. Resultados UFC/ml y Log base 10 para la muestra de espinazo de cerdo

5.2.3. Mollejas de pollo:

	TSA	VJ	KAA	MRS	EMB
UFC/ml	$2,91 \times 10^8$	$>3,00 \times 10^5$	$6,00 \times 10^3$	$2,77 \times 10^4$	$3,00 \times 10^5$
LOG base 10	8,46	5,48	3,78	4,44	5,48

Tabla 9. Resultados UFC/ml y Log base 10 para la muestra mollejas de pollo

5.2.4. Hígado de ternera:

	TSA	VJ	KAA	MRS	EMB
UFC/ml	$>3,00 \times 10^7$	$>3,00 \times 10^5$	$1,53 \times 10^5$	$>3,00 \times 10^5$	$>3,00 \times 10^5$
LOG base 10	7,47	5,48	5,18	5,48	5,48

Tabla 10. Resultados UFC/ml y Log base 10 para la muestra de hígado de ternera

5.2.5. Conejo:

	TSA	VJ	KAA	MRS	EMB
UFC/ml	$1,74 \times 10^7$	$>3,00 \times 10^5$	$1,23 \times 10^4$	$>3,00 \times 10^5$	$>3,00 \times 10^5$
LOG base 10	7,24	5,48	5,18	4,09	5,48

Tabla 11. Resultados UFC/ml y Log base 10 para la muestra de pulmones de conejo

5.2.6. Panceta de cerdo:

	TSA	VJ	KAA	MRS	EMB
UFC/ml	$9,20 \times 10^7$	$>3,00 \times 10^5$	$5,60 \times 10^4$	$>3,00 \times 10^5$	$>3,00 \times 10^5$
LOG base 10	7,96	5,48	4,75	4,09	5,48

Tabla 12. Resultados UFC/ml y Log base 10 para la muestra de panceta de cerdo

5.2.7. Lengua conejo:

	TSA	VJ	CAA	MRS	EMB
UFC/ml	$2,77 \times 10^6$	$8,50 \times 10^4$	$2,00 \times 10^2$	$1,08 \times 10^5$	$1,44 \times 10^4$
LOG base 10	6,44	4,93	2,30	5,03	4,16

Tabla 13. Resultados UFC/ml y Log base 10 para la muestra de lengua de conejo

5.2.8. Pavo:

	TSA	VJ	CAA	MRS	EMB
UFC/ml	$1,64 \times 10^6$	$2,11 \times 10^5$	$1,30 \times 10^3$	$7,10 \times 10^4$	$1,97 \times 10^5$
LOG base 10	6,21	5,32	3,11	4,85	5,29

Tabla 14. Resultados UFC/ml y Log base 10 para la muestra de pavo

5.2.9. Lomo adobado de cerdo:

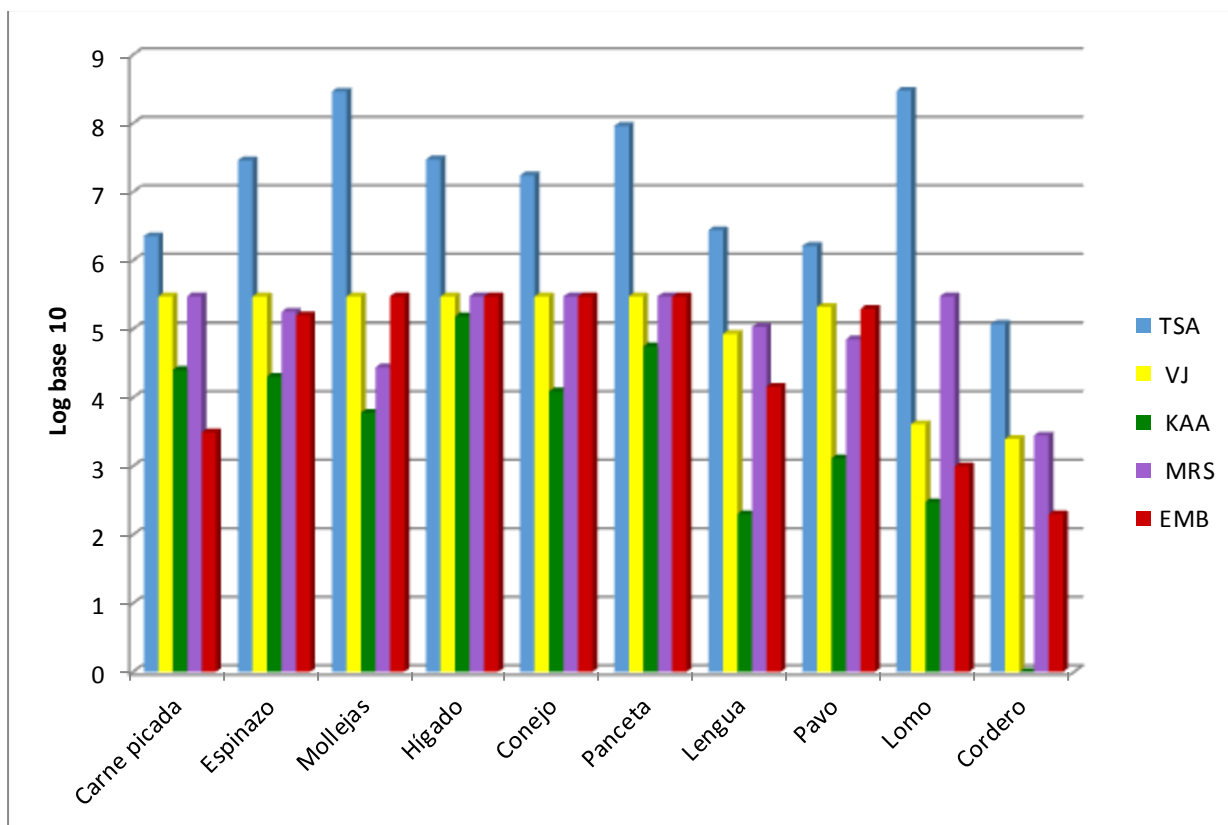
	TSA	VJ	CAA	MRS	EMB
UFC/ml	$>3,00 \times 10^8$	$4,10 \times 10^3$	$3,00 \times 10^2$	$>3,00 \times 10^5$	$1,00 \times 10^3$
LOG base 10	8,48	3,61	2,48	5,48	3

Tabla 15. Resultados UFC/ml y Log base 10 para la muestra de lomo adobado de cerdo

5.2.10. Cordero:

	TSA	VJ	CAA	MRS	EMB
UFC/ml	$1,19 \times 10^5$	$2,50 \times 10^3$	0	$2,80 \times 10^3$	$2,00 \times 10^2$
LOG base 10	5,08	3,40	0	3,45	2,30

Tabla 16. Resultados UFC/ml y Log base 10 para la muestra de cordero



Gráfica 1. . Crecimiento de las muestras en los medios de cultivo

5.3. Tinción de Gram e identificación microscópica

Obtuvimos los siguientes resultados tras la visualización en el microscopio óptico de las diferentes colonias de las distintas placas. (Tablas 17,18 y 19)

	Medio de cultivo	Identificación macroscópica de las Colonias	Identificación microscópica de las colonias
Carne picada de pechuga de pollo	TSA	Amarillas Blancas	Cocos Gram positivos Cocos Gram negativos
	VJ	Naranjas Blancas	Cocos Gram positivos Cocos Gram positivos
	KAA	Negras Blancas	Cocos Gram negativos Cocos Gram positivos
	MRS	Blancas	Cocos Gram positivos
	EMB	Negras Rosas	Bacilos Gram negativos y positivos Cocobacilos Gram negativos

Espinazo de cerdo	TSA	Blancas grandes Blancas pequeñas	Cocobacilos Gram negativos Cocos Gram positivos
	VJ	Amarillas Blancas	Bacilos Gram negativos Cocos Gram positivos
	KAA	Blancas	Cocos Gram positivos
	MRS	Blancas	Cocos Gram positivo
	EMB	Rosas Negras Verdes brillo metálico	Bacilos Gram negativos Bacilos Gram negativos Bacilos Gram negativos
Mollejas de pollo	TSA	Blancas	Bacilos Gram negativos
	VJ	Blancas	Cocos Gram positivos
	KAA	Blancas Negras	Cocos Gram positivos Cocos Gram positivos
	MRS	Blancas	Cocos Gram positivos
	EMB	Rosas Negras	Cocos Gram negativos Bacilos Gram negativos

Tabla 17. Resultados identificación macro y microscópica de las 3 primeras muestras

	Medio de cultivo	Identificación macroscópica de las colonias	Identificación microscópica de las colonias
Hígado de ternera	TSA	Blancas grandes Blancas pequeñas	Bacilos Gram positivos Bacilos Gram negativos
	VJ	Transparentes Amarillas	Cocos Gram positivos Cocos Gram positivos
	KAA	Blancas	Cocos Gram positivos
	MRS	Blancas	Cocos Gram positivos
	EMB	Negras Rosas Verde brillante	Bacilos Gram negativos Bacilos Gram negativos Bacilos Gram negativos
Conejo	TSA	Amarillas Blancas	Cocos Gram positivos Bacilos Gram negativos
	VJ	Amarillas Blancas	Cocos Gram positivos Cocos Gram negativos
	KAA	Blancas	Cocos Gram positivos
	MRS	Blancas	Cocos Gram positivos
	EMB	Rosas Negras Verdes brillo metálico	Bacilos Gram negativos Bacilos Gram negativos Bacilos Gram negativos

Panceta	TSA	Blancas Transparente	Cocos Gram negativos Bacilos Gram negativos
	VJ	Blancas Transparentes	Cocos Gram positivos Bacilos Gram negativos
	KAA	Blancas Negras	Cocos Gram positivos Cocos Gram positivos
	MRS	Blancas	Cocos Gram positivos
	EMB	Negras Verdes brillo metálico	Bacilos Gram negativos Bacilos Gram negativos

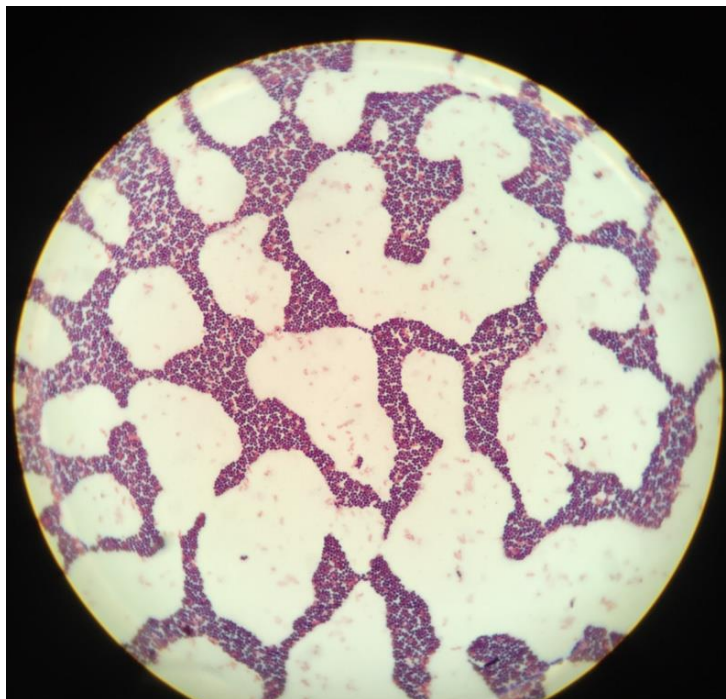
Tabla 18. Resultados identificación macro y microscópica de las 3 siguientes muestras

	Medio de cultivo	Identificación macroscópica de las colonias	Identificación microscópica de las colonias
Lomo adobado de cerdo	TSA	Blancas mucosas Blancas pequeñas Blancas filamentosas	Bacilos Gram negativos Cocos Gram positivos Bacilos Gram negativos
	VJ	Blanca Naranjas	Cocos Gram positivos Cocos Gram positivos
	KAA	Blancas Negras	Cocos Gram positivos Cocos Gram positivos
	MRS	Blancas	Cocos Gram positivos
	EMB	Negras Rosas	Bacilos Gram negativos Bacilos Gram negativos
Cordero	TSA	Amarillas Blancas	Cocos Gram positivos Bacilos Gram negativos
	VJ	Amarillas	Cocos Gram positivos
	KAA	Sin crecimiento	Sin crecimiento
	MRS	Blancas	Cocos Gram positivos
	EMB	Naranjas Negras	Bacilos Gram negativos Bacilos Gram negativos
Lengua de conejo	TSA	Blancas Transparente	Cocos Gram negativos Bacilos Gram negativos
	VJ	Blancas Amarillas Naranjas	Cocos Gram negativos Cocos Gram positivos Cocos Gram positivos
	KAA	Blancas	Cocos Gram positivos
	MRS	Blancas	Cocos Gram positivos
	EMB	Negras Rosas	Bacilos Gram negativos Bacilos Gram negativos

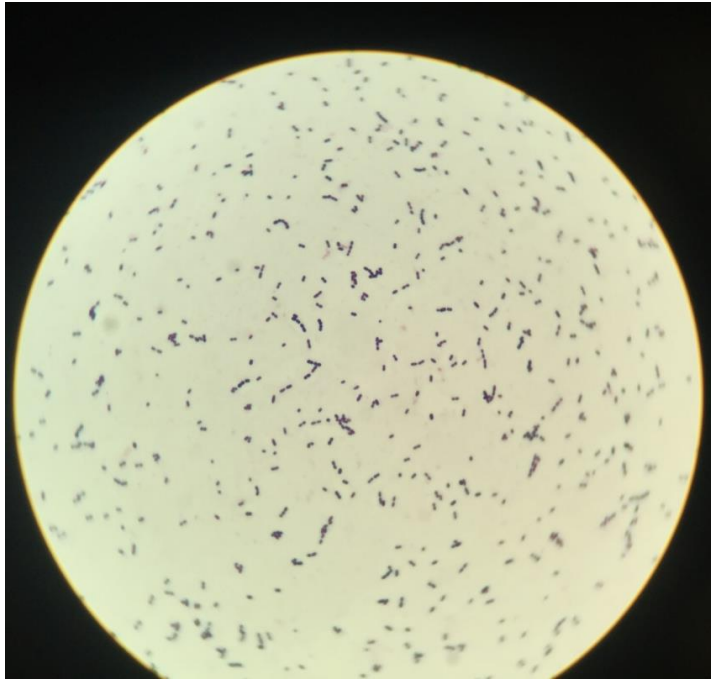
Pavo	TSA	Blancas Amarillas	Cocos Gram positivos Bacilos Gram negativos
	VJ	Blancas mucosas Blancas opacas	Cocos Gram negativos Cocos Gram negativos
	KAA	Blancas Negras	Cocos Gram positivos Cocos Gram positivos
	MRS	Blancas	Cocos Gram positivos
	EMB	Rosas Negras	Bacilos Gram negativos Bacilos Gram negativos

Tabla 19. Resultados identificación macro y microscópica de las 4 últimas muestras

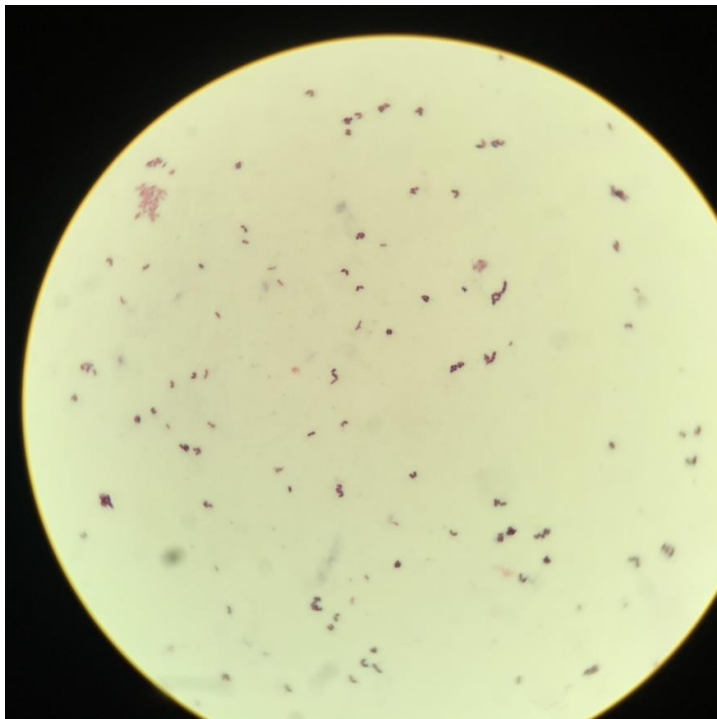
Con los medios de cultivo selectivos utilizados encontramos como formas que nos ayudan en la identificación y confirmación microscópica, en Vogel Johnson cocos Gram positivos en forma de racimo (**Fotografía 8**), en MRS cocos Gram positivos en parejas o racimos (**Fotografía 9**), en KAA cocos Gram positivos en parejas o cadenas (**Fotografía 10**) y en EMB bacilos Gram negativos (**Fotografía 11**).



Fotografía 8. Morfología típica de *Staphylococcus*. Observación en VJ de Mollejas de pollo



Fotografía 9. Morfología típica de bacterias lácticas. Observación en MRS de Hígado de ternera



Fotografía 10. Morfología típica de Enterococcus. Observación en KAA de panceta de cerdo

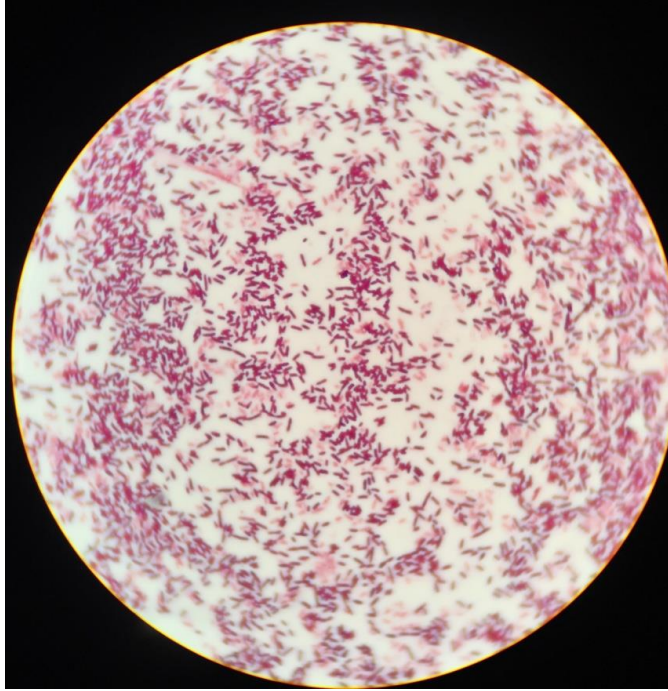


Ilustración 2. Morfología típica de Enterobacterias. Observación en EMB de Pavo

5.4. Resultados de la prueba catalasa:

Tras la realización de la prueba se obtuvieron los siguientes resultados (**Fotografía 5**).

5.4.1. Carne picada de pechuga de pollo:

En los diferentes medios y colonias los resultados fueron:

- TSA: Amarilla + y blanca +.
- VJ: Naranja + y blanca +.
- KAA: Negra – y blanca –.
- MRS: Blanca –.
- EMB: Negra – y rosa –.

5.4.2. Espinazo de cerdo:

En los diferentes medios y colonias los resultados fueron:

- TSA: Blanca grande + y blanca pequeña +.
- VJ: Blanca + y amarilla +.
- KAA: Blanca –.
- MRS: Blanca – (al tiempo hubo una reacción + débil).
- EMB: Verde -, Negra + y rosa +.

5.4.3. Mollejas de pollo:

En los diferentes medios y colonias los resultados fueron:

- TSA: Blanca –.
- VJ: Blanca +.
- KAA: Blanca – y negra - .
- MRS: Blanca –.
- EMB: Negra – y rosa –.

5.4.4. Hígado de ternera:

En los diferentes medios y colonias los resultados fueron:

- TSA: Blanca grande + y pequeña –.
- VJ: Transparente + y amarilla +.
- KAA: Blanca –.
- MRS: Blanca –.
- EMB: Verde -, negra – y rosa +.

5.4.5. Conejo:

En los diferentes medios y colonias los resultados fueron:

- TSA: Amarillas + y blancas -.
- VJ: Blanca + y amarilla +.
- KAA: Blanca –.
- MRS: Blanca –.
- EMB: Verde -, rosa + y negra +.

5.4.6. Panceta:

En los diferentes medios y colonias los resultados fueron:

- TSA: Blanca + y transparente +.
- VJ: Blanca + y transparente + (reacción menor).
- KAA: Blanca – y negra –.
- MRS: Blanca –.
- EMB: Verde – y negra –.

5.4.7. Lomo adobado de cerdo:

En los diferentes medios y colonias los resultados fueron:

- TSA: Blanca pequeña -, blanca mucosa + y con aspecto de hongo o filamentosas +.
- VJ: Naranja + y blanca +.
- KAA: Blanca – y negra –.
- MRS: Blanca –.
- EMB: Rosa + (reacción muy débil) y negra –.

5.4.8. Corazón de cordero:

En los diferentes medios y colonias los resultados fueron:

- TSA: Blanca – y amarilla +.
- VJ: Amarilla +.
- MRS: Blanca –.
- EMB: Naranja – y negra –.

5.4.9. Lengua de conejo:

En los diferentes medios y colonias los resultados fueron:

- TSA: Blanca + (reacción débil).
- VJ: Blanca +, naranja + (reacción débil) y amarilla + (reacción débil).
- KAA: Blanca –.
- MRS: Blanca –.
- EMB: Rosa + y negra –.

5.4.10. Pavo:

En los diferentes medios y colonias los resultados fueron:

- TSA: Blanca + y amarilla + (reacción débil).
- VJ: Blanca mucosa + y opaca +.
- KAA: Blanca – y negra –.
- MRS: Blanca –.
- EMB: Rosa – y negra –.



Fotografía 5. Prueba de la catalasa

5.5. Análisis estadístico

Los datos para las variables estudiadas fueron calculados como UFC/mL, y transformados en logaritmo para obtener una distribución normal y se utilizó la prueba de t de Student y tabla ANOVA. Se analizaron las relaciones entre los tipos de carne y los medios de cultivo utilizados. Los resultados se han considerado estadísticamente significativos a $p < 0,05$. Se ha utilizado el software Stagraphics centurion (STATPOINT TECHNOLOGIES, INC., Warrenton, Virginia, EE.UU.) para todos los análisis de datos.

En el análisis estadístico por medio de cultivo en los 5 medios analizados mediante t de Student concluimos que no existen diferencias significativas de crecimiento si comparamos las 10 muestras estudiadas.

Mediante tabla ANOVA y haciendo una relación medio de cultivo-tipo de carne (pollo en los que englobamos carne picada y mollejas; cerdo en los que englobamos espinazo, panceta y lomo adobado; conejo en el que englobamos carne de conejo y lengua de conejo y, por último, ternera, pavo y cordero) se llegó a la conclusión de que no hay diferencias significativas en los recuentos microbianos para los distintos

tipos de carne evaluados, en ninguno de los medios de cultivo empleados, tanto el general (TSA) como los selectivos para los distintos grupos de bacterias estudiadas.

6. DISCUSIÓN

El medio general TSA es capaz de detectar una gran variedad de especies bacterianas. 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 and Molin, 1983; 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 esta cifra.

La presencia de *Staphylococcus* es abundante y generalizada en todos los tipos de carne, observándose una salida del rango habitual de UFC/ml exceptuando las muestras de lomo adobado de cerdo y la muestra de cordero. Este nivel significativamente importante de crecimiento puede deberse a una incorrecta manipulación de las muestras por parte del responsable así como a una mala higiene de los utensilios utilizados para el corte y despiece de la muestra.

Estudios recientes ya apuntan a la necesidad de considerar los productos cárnicos como vehículos potenciales de transmisión de *S. aureus* a través de la cadena alimentaria y de establecer programas públicos de intervención sanitaria en las plantas de procesamiento de estos alimentos (Thapaliya et al., 2017).

El género *Enterococcus* se encuentra dentro del grupo de microorganismos indicadores de la inocuidad de los alimentos, pues por su amplia distribución pueden encontrarse en estos productos, especialmente en los de origen animal. Suelen considerarse buenos indicadores porque mueren más lentamente que los coliformes, debido a que son muy resistentes a condiciones adversas como congelación, desecación y consecuencia su tasa de supervivencia es mayor.

La presencia de *E. faecalis* y *E. faecium* es usada frecuentemente para indicar contaminación de origen fecal. *E. faecalis* ssp. *faecalis* es considerado como un indicador de contaminación fecal de origen humano, mientras que *E. faecium* y otras especies indican contaminación de otras fuentes (Corry, 2003).

Los productos de consumo pueden contener *Enterococcus* procedentes de una contaminación fecal directa o indirecta. Los productos mantenidos en el rango de temperatura entre 10-45 °C pueden contener cifras muy altas de estos microorganismos, por lo que podemos concluir que las muestras con titulaciones más altas de estas bacterias pueden haber sufrido una rotura en la cadena de frío. No obstante, la presencia de estos microorganismos no tiene necesariamente que suponer un riesgo para la salud, que depende en último caso de la presencia de factores de virulencia específicos en las cepas aisladas (Abouelnaga et al., 2016)

La prevalencia de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* en las muestras citadas anteriormente está asociada con procesos deterioro de la carne (Dainty and Mackey, 1992). En este caso, la aparición de colonias verdes con brillo metálico en EMB nos indica que se puede tratar con alta probabilidad de la especie *E.coli*. Esta creció en las muestras de espinazo de cerdo, carne de conejo, hígado de ternera y panceta de cerdo, siendo su presencia en la placa de menos a más, respectivamente. Generalmente este tipo bacteriano no causa el deterioro de la carne pero sí se emplea para conocer si dicha carne es segura para el consumo. Su presencia en alimentos representa mala calidad higiénica en el proceso, falta de higiene de los manipuladores o recontaminación después del proceso.

En el caso de las bacterias ácido lácticas y su crecimiento en MRS ha sido abundante y corrobora el hecho de una contaminación externa, ya que estas bacterias se utilizan mucho en procesos de fermentación que en la carne cruda que hemos analizado no se llevan a cabo en la industria alimentaria.

7. CONCLUSIONES

1. Los resultados de recuentos microbianos son en general superiores a los que se muestran en estudios previos. Cabe destacar, no obstante, que todas las muestras de carne analizadas deben cocinarse adecuadamente antes de su consumo, por lo que no suponen un riesgo importante para el consumidor.

2. Los mayores recuentos en medio no selectivo correspondieron a lomo adobado de cerdo, seguido de mollejas de pollo, panceta de cerdo e hígado de ternera. Los elevados recuentos encontrados probablemente se deban a una mala manipulación del producto o a una incorrecta higiene de los utensilios utilizados en el proceso de obtención y corte de las muestras seleccionadas.
3. Los menores recuentos correspondieron a la muestra de cordero, en la que no se obtuvo crecimiento en el medio selectivo KAA para enterococos.
4. No se han encontrado diferencias significativas en los recuentos microbianos obtenidos para los distintos tipos de carne y medios de cultivo empleados.
5. La identificación preliminar de los microorganismos aislados en las muestras cárnicas mediante tinción de Gram y prueba de la catalasa coincide con las características esperadas de acuerdo con los medios selectivos empleados (enterobacterias en medio EMB, bacterias lácticas en medio MRS, estafilococos en medio VJ y enterococos en KAA).

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abouelnaga, M., Lamas, A., Guarddon, M., Osman, M., Miranda, J.M., Cepeda, A., Franco, C.M. 2016. *Assessment of food safety using a new real-time PCR assay for detection and quantification of virulence factors of enterococci in food samples*. J Appl Microbiol.121 (6): 1745-1754.
2. Allaert, C., Escolà, M. 2002. *Procedimientos de análisis de alimentos. En: Métodos de análisis microbiológicos de los alimentos*. Díaz de Santos, Madrid, España.
3. Amerling, C. 2001. *Conservación y procesamiento de la carne. En: Tecnología de la carne, Antología*. Amerling, C. (Coord.). Universidad estatal a distancia, UNED. pp.36-38.

4. Ausina Ruiz, V., Moreno Guillén, S. 2005. Infecciones por *Enterococcus*, *Streptococcus bovis* y *Leuconostoc*. En: *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica* .Editorial Médica Panamericana, S.A., Madrid, España.pp.297-304.
5. Bedolla Bernal, S., Dueñas Gallegos, C., Esquivel Ibarra, I., Favela Torres, T., Guerrero Huerta, R., Mendoza Madrid, Ernesto., Navarrete López, A., Olgún Martínez, L.E., Ortiz Gama, J., Pacheco Puc, O., Quiroz Bravo, M., Ramírez Schoettlin, A., Trujillo Castillo, M. 2004. Parte III, Tecnología de productos cárnicos. En: *Introducción a la tecnología de alimentos, Academia del Área de Plantas Piloto de Alimentos*, 2º Edición. LIMUSA S.A., Grupo Noriega Editores, Madrid, España.pp.65-78.
6. Beuchat, L.R. 1996. *Pathogenic microorganisms associated with fresh produce*. J Food Prot 59, 204–216.
7. Blickstad E., Molin, G. 1983. *The microbial flora of smoked pork loin and frankfurter sausage stored in different atmospheres at 4°C*. J, Appl, Bacteriol, 54(1):45-56.
8. Borch, E., Kant-Muermans, M.L., Blixt, Y. 1996. *Bacterial spoilage of meat and cured meat products*, International Journal of Food Microbiology. 33 (1):103-20.
9. Casp, A., Abril, J. 2003. Capítulo XIV: Tecnologías emergentes en la conservación de alimentos. En: *Procesos de conservación de alimentos*. 2ª Edición. Mundi-prensa, Madrid, España.pp.466-473.
10. Corry JEL, Curtis GDW, Baird RM. 2003. Chapter 7. Culture media for Enterococci and group D-Streptococci. En: *Handbook of culture media for food microbiology*. Second edition, volume 37. Corry JEL, Curtis GDW, Baird RM. (eds.) Elsevier, Amsterdam, The Neatherland.pp.111-124.
11. 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, 1992;21:103S-14S.
12. de Freitas Costa, E., Corbellini, LG., da Silva, AP., Nauta, M. 2016. *A Stochastic Model to Assess the Effect of Meat Inspection Practices on the Contamination of the Pig Carcasses*. Risk Analysis. doi:10.1111/risa.12753.
13. Delazari, I. 1977. *Microbiología de carnes*. Boletín do Instituto de Tecnología de alimentos, Campinas, v. 51, p.25-60.

14. Desrosier, Norman W. 1991. Principios de la conservación de alimentos por secado. En: *Conservación de Alimentos*. Continental, Mexico.pp.236-282.
15. Fukushima H., Saito K., Tsubokura M., Otsuki K., Kawaoka Y. 1991. *Isolation of Yersinia spp. from Bovine Feces. Journal of clinical microbiology*. 18_(4):981-982.
16. Gil, A. 2010. Capítulo II. Carnes y derivados En: *Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos. Tomo 2: Tratado de Nutrición*. 2ª Edición. Gil, A. (Coord.). Panamericana, Madrid, España.pp.27-54.
17. Hernández Rodríguez, M., Sastre Gallego, A. 1999. Carnes, pescados y huevos. En: *Tratado de Nutrición*. Díaz de Santos, Madrid, España.pp.363-376.
18. I.C.M.S.F. 1998. *Potential application of risk assessment techniques to microbiological issues related to international trade in food and food products*. J. Food Protect. 61(8):1075-1086.
19. I.C.M.S.F. 2004. Evaluación de riesgos y establecimiento de objetivos de seguridad alimentaria. En: *Microorganismos de los alimentos. 7. Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria*. Acribia S.A., Zaragoza, España.
20. 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*. J Meat Science, 31 (2), 175-190.
21. Jay J. 2002. Carnes frescas. En: *Microbiología moderna de los alimentos*. 6ª edición. Acribia, S.A, Zaragoza, España.
22. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. 1994. *Virulence of Enterococci*. J Clin Microbiol; 7:462-78.
23. Laza Muñoz, M., Laza Muñoz, J. 2006. Métodos de conservación. En: *Preelaboración y conservación de alimentos*, 1º Edición. Laza Muñoz, M., Laza Muñoz, J. (eds.). Ediciones Paraninfo S.A. Madrid, España.pp.29-36.
24. Lelieveld, H.; Mostert, M. & Holah, J. 2016. Chapter 1. The Starting Point: What Is Food Hygiene? En: *Handbook of hygiene control in the food industry*. Second Edition. Elsevier. pp. 68-79.
25. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sthal, D.A. 2015. Capítulo 29. Conservación de los alimentos y enfermedades microbianas transmitidas por alimentos. En: *Brock: Biología de los Microorganismos*. 14ª Edición. Prentice Hall, Madrid, España.pp. 942-957.

26. 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.
27. Moreno García, B., Díaz de Santos I. 2006. El matadero. Métodos de aturdimiento y desangrado I y II. En: *Higiene e Inspección de Carnes*. Moreno García, B., Díaz de Santos I. (eds.). Díaz de Santos, Madrid, España.pp.162-186.
28. Moreno García, B., Díaz de Santos I. 2006. Transporte y cuidados ante mortem de los animales destinados al sacrificio I y II. En: *Higiene e Inspección de Carnes*. Moreno García, B., Díaz de Santos I. (eds.). Díaz de Santos, Madrid, España.pp.84-91.
29. Mossel D., Moreno B., Struijk, C. B. 2003. Recuento de microorganismos cuya presencia en número excesivo indica el peligro de una alteración incipiente. En: *Microbiología de los alimentos*. Mossel D., Moreno B., Struijk, C.B (eds.). Acribia S.A, Zaragoza, España.pp 685-701.
30. Mossel D., Moreno B., Struijk, C.B. 2003. Principales características taxonómicas y determinativas de los organismos de importancia en los alimentos. B. En: *Microbiología de los alimentos*. 2ª Edición. Mossel D., Moreno B., Struijk, C.B. (eds.). Acribia S.A, Zaragoza, España.pp 159-203.
31. Nortjé GL, Nel L, Jordaan E, Badenhorst K, Goedhart E, Holzapfel WH. 1990. *The aerobic psychotrophic populations on meat and meat contact surfaces in a meat production system and on meat stored at chill temperatures*. J Appl Bacteriol. 68: 335-44.
32. Oliva, E. 2006. Microbiología I. En: *Manual de Prácticas de Microbiología I, II y Parasitología. Programa de Medicina*. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez, Mexico.pp.13-36.
33. Panreac. 2003. *Manual básico de microbiología*. Cultimed.
34. Pardi, M.C., Santos, I. F., Souza, E. R., Pardi, H.S. 2006. Ciência e higiene da carne. En: *Ciência, higiene e tecnologia da carne: tecnologia da sua obtenção e transformação*, 2º Edición. Pardi, M.C., Santos, I. F., Souza, E. R., Pardi, H.S (eds.). UFG, Goiana, Bazil.pp.169-209

35. Pascual M, Calderón V. 2002. Capítulo 14. Investigación de estreptococos fecales. En: *Microbiología alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas*. 2º edición. Pascual M, Calderón V. (eds.). Díaz de Santos, Madrid, España.pp.121-126.
36. Pascual M, Calderón V. 2002. Capítulo 22. Carnes. En: *Microbiología alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas*. 2º edición. Pascual M, Calderón V. (eds.). Díaz de Santos, Madrid, España.pp.219-226.
37. Pascual M, Calderón V. 2002. Capítulo 23. Derivados Cárnicos. En: *Microbiología alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas*. 2º edición. Pascual M, Calderón V. (eds.). Díaz de Santos, Madrid, España.pp.227-231.
38. Pascual M, Calderón V. 2002. Capítulo 24. Aves y caza. En: *Microbiología alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas*. 2º edición. Pascual M, Calderón V. (eds.). Díaz de Santos, Madrid, España.pp.239-246.
39. Pascual M, Calderón V. 2002. Capítulo 3. Recuento de microorganismos aerobios mesófilos ($31\pm 1^{\circ}\text{C}$) revivificables. En: *Microbiología alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas*. 2º edición. Pascual M, Calderón V. (eds.). Díaz de Santos, Madrid, España.pp.13-15.
40. Rodríguez Cavallini, E., Gamboa Coronado, M., Hernández Chavarría, F., García Hidalgo, J.D. 2005. Prueba de la Catalasa. En: *Microbiología General, Principios y Prácticas del Laboratorio*. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.pp.217-219.
41. Rodríguez Rivera, V., Simón Magro, E. 2008. Carne y productos cárnicos. En: *Bases de la Alimentación Humana*. Rodríguez Rivera, V., Simón Magro, E. (Coord.). Netbiblo, S.L, La Coruña, España.pp.87-102.
42. Romero Cabello, R. 2007. Capítulo 67. Enterobacterias. En: *Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. 3º Edición. Romero Cabello, R. (ed.). Médica Panamericana, Madrid, España.pp.741-750.
43. Silva DA, Dias MR, Cossi MV, Castilho NP, Camargo AC, Nero LA. 2016. *Hygiene and Safety in the Meat Processing Environment from Butcher Shops: Microbiological Contamination and Listeria monocytogenes*. J Food Prot. 79: 628-34.

44. Sofos, J.N. 2008. *Challenges to meat safety in the 21st century*. J Meat Science. 8(1-2):3-13.
45. Thapaliya, D., Forshey, B.M., Kadariya, J., Quick, M.K., Farina, S., O' Brien, A., Nair, R., Nworie, A., Hanson, B., Kates, A., Wardyn, S., Smith, T.C. 2017. *Prevalence and molecular characterization of Staphylococcus aureus in commercially available meat over a one-year period in Iowa, USA*. Food Microbiol. 65:122-129.
46. Tortora, G.J., Funken, B.R., Case, C.L. 2007. Apéndice D: Exponentes, logaritmos exponenciales y tiempo de generación. En: *Introducción a la Microbiología*. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España.pp.917-925.
47. Vicente, M.A. 2017. Capítulo 8. La refrigeración y congelación de la carne y de los productos cárnicos. En: *La cadena de frío. Refrigeración y congelación de alimentos. Curso de formación profesional*. 1ª Edición. Vicente, M.A (ed.). AMV Ediciones, Madrid, España.pp.141-158.
48. Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, E.W., Procop, G.W. 2008. Capítulo 13. Cocos grampositivos: Parte II: Estreptococos, enterococos y bacterias "similares a Sstreptococcus". Koneman (ed.). En: *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.pp.215-246.
49. Zea Z, Ríos de Selgrad, M. *Evaluación de la calidad microbiológica de los productos cárnicos analizados en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" durante el período 1990-2000*. Rev. Inst. Nac. de Hig. "Rafael Rangel". 2004; 35(1):17-24.