

EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA CARNE DE RES DE PUERTO RICO BAJO DOS FORMAS DE EMPAQUE

por

Yadira Rodríguez Soto

Tesis sometida en cumplimiento parcial
de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2007

Aprobada por:

Edna Negrón, Ph.D.
Presidenta del Comité Graduado

Fecha

Aixa Rivera, M.S.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Ernesto O. Riquelme, Ph.D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Lynette E. Orellana, Ph.D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Fernando Pérez, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Edna Negrón, Ph.D.
Coordinadora del Programa CITA

Fecha

ABSTRACT

The microbiological profile of the muscle *Longissimus dorsi* from six bovine of local production was evaluated under two packaging conditions (vacuum packaging and commercial packaging). Samples were packed at refrigeration conditions (2°C) and bacterial growth of aerobe and anaerobes present at 0, 3, 7 and 14 days of storage was also evaluated. Results from statistical analysis showed that there is no significant difference in microbial growth due to type of packaging for it can't be infer that a packaging type is better than other from the microbiological point of view. Identification of several bacteria was conducted through a characterization of bacterial groups. Enteric bacteria growth under aerobic conditions at selective and differential culture media and enteric bacteria O157 growth in chromogenic media were identified. The pathogen *Escherichia coli* O157:H7 was not found at the samples analyzed. Biochemical tests demonstrated the presence of *Peptostreptococcus*, *Prevotella oralis* and *Staphylococcus saccharolyticus* in vacuum packed samples and the presence of *Porphyromonas assacharolytica* from commercially packed meat samples. Indistinctly the packaging type used the presence of *Pseudomonas spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacter spp.* and *Escherichia coli* were detected with chromogenic media even though their quantity varied depending on the packaging and the bacterial oxygen requirements. Even when it was expected a better microbiological quality of vacuum packed meat, the tests conducted showed that this samples contain anaerobe and facultative microorganisms which can affect eventually the organoleptic properties of meat and general acceptance by deterioration of the product.

RESUMEN

Se evaluó el perfil microbiológico del músculo *Longissimus dorsi* proveniente de seis bovinos de origen local, bajo dos condiciones de empaque (al vacío y comercial). Las muestras empacadas fueron almacenadas bajo condiciones de refrigeración (2°C) y se evaluó el crecimiento de bacterias aeróbicas y anaeróbicas presentes a 0, 3, 7 y 14 días de almacenaje. Los resultados obtenidos de un análisis estadístico mostraron que no había diferencia significativa en crecimiento microbiano atribuible al tipo de empaque por lo que no se puede inferir que un empaque sea mejor que el otro desde el punto de vista microbiológico. A través de una caracterización de grupos de bacterias se logró identificar diversas bacterias. Se identificaron bacterias entéricas crecidas bajo condiciones aeróbicas en medios selectivos y diferenciales y bacterias entéricas O157 crecidas en medios cromogénicos. En las muestras analizadas no se encontró el patógeno *E. coli* O157: H7. Pruebas bioquímicas demostraron la presencia de *Peptostreptococcus*, *Prevotella oralis* y *Staphylococcus saccharolyticus* en muestras empacadas al vacío y *Porphyromonas assacharolytica* en muestras empacadas comercialmente. Indistintamente el empaque, con los agares cromogénicos se detectó la presencia de *Pseudomonas spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacter spp.* y *Escherichia coli*, aunque la cantidad de éstas varió dependiendo del empaque debido a los requisitos de oxígeno de las bacterias. Aún cuando se esperaba obtener una carne de mejor calidad microbiológica en el empaque al vacío, las pruebas realizadas en las muestras de carne empacadas de esta manera revelaron la presencia de microorganismos anaeróbicos y facultativos que, eventualmente, pueden afectar las características organolépticas de la carne y su aceptación general por el deterioro del producto.

DERECHOS DE AUTOR RESERVADOS ©
YADIRA RODRIGUEZ SOTO
2007

DEDICACIÓN

Dedico esta tesis a Dios Todopoderoso y la Virgen de La Monserrate por haberme fortalecido en todo momento, a mi familia que siempre me ha apoyado en todas mis empresas, a mis amistades y a todas las personas que de una manera u otra me han ayudado a alcanzar este logro, a la microbiología.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradezco a Dios por toda la sabiduría que me ha transmitido a través del Espíritu Santo y sus arcángeles. También agradezco a mi familia que siempre ha estado a mi lado apoyándome incondicionalmente y dándome aliento para seguir adelante cuando pensaba que no podía lograrlo. A mi madre que con sus sabios consejos me mantuvo alerta y positiva para alcanzar este logro. A mi padre quien me enseñó que en la vida hay que luchar mucho para obtener las cosas y las cosas que más se luchan son las que mejor recompensa tienen. A mis hermanos que con su ejemplo de superación en la vida me han mantenido firme en mis metas y me han hecho saber que al igual que ellos en la química y la milicia, yo puedo hacerlo en la microbiología de alimentos. Agradezco a mi novio por todo su amor y porque me ha ayudado a desarrollar paciencia cuando las cosas no salen como una quiere. No puedo dejar de mencionar a mi primo favorito, Khalil, que hasta me acompañó algunas noches a contar bacterias y tomar fotos. A mi prima Yali y demás familiares que de una u otra manera son participes de este logro. Además quiero agradecer a mi familia de Sea Grant por todos los años de enseñanzas que formaron mi vida personal y profesional; muchísimas gracias a Ana, Migdalia, Cana, Delmis, Yulie y Lillian.

Quiero agradecer a la Dra. Madeline Velázquez por haber creído en mí, darme la oportunidad de trabajar este experimento y enseñarme las herramientas base para seguir adelante en la carrera. Agradezco al Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos, sus profesores y colaboradores Dr. Fernando, Bessie y Rupert quienes siempre se mostraron dispuestos a ayudarme en lo que necesité para mis estudios y para crecer como persona. También agradezco a la Dra. Negrón por haberme enseñado las buenas prácticas de manejo seguro de alimentos que tome en cuenta en este escrito y a la Dra. Lynette por su amabilidad y por ayudarme a hacer las correcciones de último momento.

Quiero agradecer a la Prof. Aixa Rivera por toda su ayuda y sus consejos que me dieron la fuerza para seguir adelante cuando pensé que todo estaba perdido. También por guiarme en la recta final y por enseñarme los conocimientos necesarios en el área de

carnes para realizar este proyecto. También agradezco a Lillian y al personal que consiguió las carnes que utilicé en este experimento.

Quiero agradecer también al Dr. Riquelme por ayudarme tan eficientemente en la realización del análisis estadístico, la interpretación del mar de datos que tenía y las correcciones del escrito. Gracias por su amabilidad y disposición para ayudarme en este proyecto.

Si me pidieran que mencione un día que nunca olvidaré, diría que fue el martes 8 de mayo de 2007, día en que presencié el cariño y aprecio de tantas personas; mis amigos, compañeros de estudio, compañeros de trabajo y mis familiares, todos orando por mí para que saliera bien en mi defensa. Su fe y su cariño me dieron la fortaleza para sobrevivir las 2 horas de preguntas intensas. Agradezco a todos los que me apoyaron con su presencia en la presentación (Lurdes, Minnie, Lizanel, Angélica, Damaris, Yelitza, Melba, Stephanie). Quiero agradecer especialmente a dos grandes amigas Lurdes y Lizanel, quienes siempre me han apoyado, me han aconsejado con amistad sincera. En el poco tiempo que me conocen han orado tanto por mí que ya tienen su pedazo de cielo gano.

Finalmente como no quiero que se me olvide nadie, agradezco a todas las personas que colaboraron de una u otra manera conmigo. Saben quienes son y deseo salud y mucho éxito en sus empresas.

A todos ustedes gracias mil y que Dios les bendiga.

TABLA DE CONTENIDO

Lista de Tablas	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Apéndices	xi
1. Introducción	1
2. Objetivos	4
3. Antecedentes Bibliográficos	5
4. Metodología	9
4.1 Muestras de carne y condiciones de almacenamiento	9
4.2 Cepas bacterianas	9
4.3 Medios de crecimiento y condiciones	10
4.4 Caracterización de aislados	12
4.5 Análisis Estadístico	13
5. Resultados y Discusión	14
6. Conclusiones	21
7. Recomendaciones	23
8. Bibliografía	24
9. Apéndices	27

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Grupos bacterianos identificados según medio de cultivo	10
Tabla 2. Valores de crecimiento iniciales según los medios de cultivo	14
Tabla 3. Valores de crecimiento según el medio de cultivo, tipo de empaque y tiempo de almacenamiento	16
Tabla 4. Valores de crecimientos por grupo de microorganismos presentes en el medio CHROMAgar Orientation	18
Tabla 5. Microorganismos aislados e identificados de carne empacada al vacío y comercialmente	20

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1.	Crecimiento de microorganismos en medio CHROMAgar Orientation	17
Figura 2.	Crecimiento de <i>E. coli</i> genérica en medio CHROMAgar O157	19
Figura 3.	Prueba de aglutinación	19

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice	Página
A. Diagrama de flujo de empaque de las carnes	28
B. Ejemplo de diagrama de flujo utilizado para los procedimientos de laboratorio	29
C. Gráficas	30
C.1 Gráfica de crecimiento microbiano observado en medio Reinforced Clostridial Agar por días y empaque	30
C.2 Gráfica de crecimiento microbiano observado en medio CHROMAgar O157 por días y empaque	30
C.3 Gráfica de crecimiento microbiano observado en medio Mac Conkey Sorbitol Agar por días y empaque	31
C.4 Gráfica de crecimiento microbiano observado en medio CHROMAgar Orientation por días y empaque	31

1. INTRODUCCIÓN

Los consumidores de carne de res en Puerto Rico aparentan preferir las carnes importadas sobre las carnes de origen local. Esta preferencia parece ser el resultado de la falta de conocimiento, por parte del consumidor, de las características nutricionales y de la calidad comestible de la carne producida localmente. Un estudio realizado por The Marketing Center, auspiciado por el Fondo Fomento de la Industria de Carne de Res de Puerto Rico, en diciembre de 1998, determinó que el consumidor local prefiere el consumo de carne de res fresca producida en Puerto Rico, pero la misma no está disponible en el mercado. Además los resultados de un estudio realizado por Acevedo (2004) demuestran que los consumidores puertorriqueños perciben que la carne de res importada de los Estados Unidos y de América Central posee mejores atributos de calidad, al menos en lo que a ternera se refiere, que la carne local.

La mayoría de los consumidores consideran la ternera como el atributo más importante al determinar la calidad de la carne (Kannan et al., 2002; Kuber et al., 2004). Al parecer, la combinación de las características organolépticas tales como la ternera y el color, ayudan al consumidor a decidir la adquisición de un determinado tipo de carne. En contraste, para la industria de la carne de res, la inocuidad del producto es una de sus principales preocupaciones y se han realizado diversas investigaciones relacionadas con el control de patógenos durante la matanza, en las canales y en las carnes procesadas (King et al., 2005).

De acuerdo al informe publicado por el Departamento de Agricultura, abarcando los años 1975 – 2004, la industria de la carne de res en Puerto Rico es un importante contribuidor al ingreso bruto agrícola y para esta industria la evaluación constante de las prácticas que contribuyen a mejorar las características organolépticas de la carne local es de suma importancia. Los productores están concientes de que el producto local necesita poseer y mantener características similares ó superiores a la de los productos de importación para poder ser competitivos en el mercado. También se ha identificado la necesidad de extender el largo de vida de la carne procesada y mantener la calidad del

producto por períodos de tiempo más prolongados. Por esto, varios investigadores han realizado estudios evaluativos de las distintas técnicas de empaque a fin de determinar cual es el más conveniente para las condiciones locales.

La microbiología de un alimento es muy importante en términos de su inocuidad alimentaria. Además de la posibilidad de que algunos microorganismos puedan ocasionar enfermedades, el contenido microbiológico en los alimentos incide directamente sobre el largo de vida y la aceptación general de los productos (Jay et al., 2005).

Durante la última década, varios informes epidemiológicos han descrito brotes de trastornos gastrointestinales en la población humana vinculados a la presencia de patógenos bacterianos en los alimentos. Se ha dado especial énfasis a la presencia de *Escherichia coli* serotipo O157:H7, que ha sido relacionada con enfermedades transmitidas a través de los alimentos, específicamente el consumo de carne contaminada en los Estados Unidos (Mustapha et al., 2002). Otros brotes atribuidos a este patógeno se han relacionado con la contaminación de vegetales y jugos y, tan recientemente como en septiembre 15 de 2006, se registró un brote que se originó en espinacas (Bridges, 2006). Aún así, según un artículo publicado por la revista Consumers Research Magazine en septiembre de 2006, la carne sigue siendo el principal vehículo de transporte relacionado a *Escherichia coli* serotipo O157:H7, seguido por la lechuga fresca pre-empacada. En estudios realizados en los mataderos de Puerto Rico, se determinó que las canales de res de origen local no aparentan albergar el patógeno *Escherichia coli* O157:H7 (Oquendo, 2006). A pesar de este hallazgo, se debe considerar que el patógeno en cuestión es parte de la flora gastrointestinal del ganado y que representa un peligro potencial a la salud del consumidor. Por esto, es importante controlar los procesos de matanza y de manejo posterior de la carne para evitar cualquier posibilidad de contaminación directa o cruzada. Esto siguiendo las recomendaciones de Servicio de Inspección y Seguridad de Alimentos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA-FSIS) a través del establecimiento de Procedimientos de Operación Estándar (sSOP) y el desarrollo de un plan de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP).

Basado en estos hallazgos, el presente estudio se realizó con el fin de establecer el perfil microbiológico de muestras de carne almacenada bajo dos tipos de empaque y determinar calidad e inocuidad a través del tiempo normal de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración.

2. OBJETIVOS

La presente investigación se realizó con el objetivo general de evaluar los cambios en el perfil microbiológico de muestras de carne, bajo dos condiciones de empaque, durante un período de catorce días de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración.

Además, se consideraren los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el crecimiento microbiano, incluyendo patógenos anaeróbicos y bacterias aeróbicas deteriorantes de la carne y determinar su impacto potencial sobre la calidad de la carne y su largo de vida
2. Determinar los cambios en el perfil microbiológico a los tres, siete y catorce días de almacenamiento
3. Aislar bacterias en diferentes medios de cultivo selectivos y diferenciales para su caracterización
4. Caracterizar los microorganismos aislados basándose en su tolerancia a oxígeno, morfología de las colonias, reacción en medio cromogénico, morfología celular, tinción Gram, ensayo de catalasa, pruebas bioquímicas (API20A y API20E) y pruebas de aglutinación serológica

3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En general, carne se define como todo tejido animal apto para el consumo humano, e incluye tejido muscular, conectivo y otras partes edibles. La carne se clasifica en dos categorías o tipos, carne roja y carne blanca. Las carnes rojas son aquellas que provienen de bovinos, ovinos, caprinos y porcinos, mientras que las carnes blancas se refieren principalmente a carne de aves domésticas. Cabe destacar que existen varias excepciones a esta clasificación general.

Aunque el tejido muscular es el principal componente de la carne, otros tejidos blandos (adiposo, epitelial, conectivo y nervioso) también están presentes (Hedrick et al., 1994). Los músculos presentes en cualquier corte de carne, así como la cantidad de tejido adiposo y conectivo asociado al músculo, dependen de su procedencia anatómica. Entre los músculos más apreciados, por sus características de terneza, textura y jugosidad se encuentra el *Longissimus dorsi*, que se localiza entre las apófisis espinales y transversas de la columna vertebral en la región dorsal de la canal. El *Longissimus dorsi* es un músculo muy importante debido a que sus características organolépticas le dan un mayor valor intrínseco. Además, cuando existe un sistema de clasificación de canales, el área de la sección transversal de este músculo, entre la 12ava y 13ava costillas, se utiliza para estimar la cantidad de carne que tiene la canal y la cantidad de grasa intramuscular (marmoleo) que se ha depositado (Casas et al., 2002). La mayoría de los estudios que se han realizado sobre este músculo han puesto énfasis en sus características organolépticas y en las técnicas de empaque para preservar sus características durante el almacenamiento. En estudios realizados recientemente un panel sensorial concluyó que la terneza del músculo *Longissimus dorsi* fue superior a la del músculo *Semimembranosus* (Acevedo, 2004), lo que fue corroborado posteriormente, a través de mediciones físico-mecánicas, por Santrich-Vacca (2006). Ambos estudios son relevantes para la industria de la carne local, ya que se reconoce que el valor nutricional así como la calidad organoléptica de la carne, dos factores que influyen significativamente cuando el consumidor está tomando la decisión de cuál producto adquirir. Es por esto que la industria de la carne de res está considerando estrategias de

mercadeo que realcen las características de la carne producida localmente sobre la carne importada (Casas et al., 2004; Casas et al., 2005).

La calidad de la carne incluye diversos factores: características nutricionales (contenido de nutrientes), componentes físicamente separables (relación músculo/grasa) y los atributos de aceptabilidad (apariencia, ternera, sabor, jugosidad) por parte del consumidor (Eichenberger et al., 2006). Sin embargo es importante mencionar que la calidad de la carne no es sinónimo de inocuidad, ya que inocuidad se refiere a que la carne está libre de factores nocivos y es apta para el consumo humano. Se reconoce que los músculos provenientes de animales sanos se encuentran libres de microorganismos y la carga microbiana que adquieren proviene de la contaminación con microorganismos presentes en el tracto respiratorio y gastrointestinal del animal (Chung et al., 2002).

Una carne se considera deteriorada, dañada o no apropiada para el consumo humano cuando exhibe sabores u olores indeseables o porque el deterioro fue causado por la acción de microorganismos que, en muchos casos, pueden ser potencialmente patógenos. Los microorganismos que la carne adquiere durante los procedimientos de matanza y trozado inicial de las canales, así como el manejo sanitario inadecuado de los cortes durante el procesamiento posterior, pueden ser causantes del deterioro rápido de la misma (Forrest, 2006). Se ha indicado (Bolling et al., 2002) que tanto los cortes de carne fresca o enterneada como la carne molida pueden contener patógenos provenientes de la contaminación fecal de la canal durante la matanza o debido a las prácticas higiénicas y de manejo inapropiadas de la carne durante el procesamiento.

Cuando las carnes se deterioran se pueden observar algunos cambios en la apariencia general (color, exudados) y olores desagradables (ácidos, nauseabundos y de putrefacción, cuando el estado de deterioro es avanzado) (Forrest, 2006). Algunas de las bacterias que intervienen en el deterioro de la carne almacenada son del tipo anaeróbicas o anaeróbicas facultativas que son capaces de crecer en productos empacados al vacío donde el oxígeno es excluido.

El empaque que permite la presencia de oxígeno favorecerá el crecimiento de bacterias aeróbicas o anaeróbicas facultativas, siendo *Pseudomonas spp.* una de las bacterias aeróbicas más comunes involucrada en el deterioro de la carne refrigerada. Durante su crecimiento ésta produce proteasas y lipasas que catalizan la degradación de proteínas y grasas, respectivamente (Djenane et al., 2006).

En la técnica de empaque al vacío, el recipiente usado (bolsa, bolsos o termo formadores) está diseñado para ofrecer una barrera efectiva contra el intercambio gaseoso con el ambiente. Por esto, la técnica controla el contenido microbiano de la carne empacada y efectivamente excluye a los microorganismos aeróbicos (Phil et al., 2000). En un estudio en el que se comparó el largo de vida de exhibición de segmentos del músculo *Longissimus dorsi* empacado al vacío o empacado en un recipiente permeable al oxígeno se observó que el músculo empacado al vacío tenía una vida de exhibición de tres días en contraste con el empacado en atmósfera permeable al oxígeno que tenía una vida de exhibición de dos días (Beggan et al., 2004). Debido a la corta duración del período de almacenamiento bajo refrigeración, las variables microbiológicas de la carne se consideraron satisfactorias para ambos tipos de empaque.

Hunt et al., (2004) realizaron un estudio para evaluar el efecto del monóxido de carbono sobre el color, largo de vida y microorganismos presentes en cortes de carne almacenados en empaques de atmósfera modificada. Los resultados indicaron que al utilizar el empaque de atmósfera modificada se disminuyó la estabilidad del color y, en el aspecto microbiológico, los filetes que tenían color aceptable presentaban pocos signos de deterioro. La ventaja de utilizar un empaque con atmósfera modificada, como lo es el empaque al vacío, es evitar o retardar la proliferación de bacterias aeróbicas responsables de la descomposición y rápido deterioro de la carne almacenada bajo refrigeración. Algunas de estas bacterias pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Moraxella* (Phil et al., 2000).

Junto con las bacterias que causan el deterioro de la carne, la presencia de microorganismos patógenos es de gran preocupación para la industria alimentaria. Aún

cuando se han realizado numerosas campañas de educación al consumidor sobre las prácticas apropiadas de manejo de la carne en los hogares y establecimientos públicos, las enfermedades transmitidas a través de alimentos siguen siendo un serio problema en los Estados Unidos reportándose numerosos brotes cada año. Entre los patógenos que más preocupan a las autoridades sanitarias se encuentra *Escherichia coli* O157:H7, que puede ocasionar colitis hemorrágica que se caracteriza por diarrea sanguinolenta y dolor abdominal severo. De estos individuos alrededor de un 3% pueden sufrir de trombocitopenia trombótica púrpura que se caracteriza por ocasionar un paro renal luego de tres a siete días de ingerir el alimento contaminado. Esta condición renal generalmente es fatal para el afectado.

Otra bacteria patógena para humanos es la bacteria anaeróbica *Clostridium botulinum*. Aunque su presencia es poco frecuente en carne fresca, el empaque al vacío puede promover su crecimiento, acelerando el deterioro del producto y representando un riesgo al consumidor (Broda et al., 1998).

De acuerdo con la literatura revisada, existe un estrecho nexo entre la calidad organoléptica de la carne y su inocuidad. Por consiguiente, la evaluación de la carga microbiana de las carnes así como la identificación o caracterización de los microorganismos presentes es de suma importancia para evaluar las prácticas existentes de manejo de la carne y para desarrollar sistemas de manejo alternativo que propicien la extensión de la vida de exhibición de los productos manteniendo tanto su calidad organoléptica como su inocuidad.

4. METODOLOGÍA

4.1 Muestras de carne y condiciones de almacenamiento

Se obtuvieron muestras de carne del músculo *Longissimus dorsi* provenientes de seis bovinos de aproximadamente dos años de edad (edad estimada por la cantidad de dientes permanentes presentes). Las muestras se obtuvieron inmediatamente después del sacrificio de los animales en una planta procesadora de carne local. Las muestras obtenidas se colocaron individualmente en contenedores plásticos y fueron trasladadas al laboratorio dentro de recipientes con hielo. Al llegar al laboratorio, las muestras fueron manejadas asépticamente e inmediatamente procesadas.

De cada muestra de carne se obtuvieron siete submuestras (25 g) que fueron empacadas al vacío utilizando la máquina de empaque al vacío FoodSaver Home Vacuum Packaging System, Signature Series V845 y empacadas comercialmente (PVC) utilizando papel de envoltura plástica Reynolds Foodservice Film 914 con bandeja de poliestireno.

Todas las muestras fueron almacenadas a temperaturas de refrigeración (2° C) y se evaluaron microbiológicamente a los 0, 3, 7 y 14 días de almacenamiento.

4.2 Cepas Bacterianas

Para la evaluación microbiológica se utilizaron medios de cultivo que permiten diferenciar los grupos bacterianos presentes. Se utilizó el medio “Reinforced Clostridial Agar” para la enumeración y aislamiento de bacterias anaeróbicas estrictas y facultativas; el medio “Mac Conkey Sorbitol Agar” para la detección de *Pseudomonas spp.*; el medio “CHROMagar O157” para la detección de la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 y *Escherichia coli* genérica; y el medio “CHROMagar Orientation” para la enumeración y diferenciación de bacterias entéricas aeróbicas y anaeróbicas facultativas. Los cuatro

medios de cultivo utilizados y los grupos bacterianos que identifican se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos bacterianos identificados según medio de cultivo

Medio de Cultivo	Grupo Bacteriano
“Mac Conkey Sorbitol Agar”	<i>Enterobacterias</i>
“Reinforced Clostridial Agar” (Anaeróbicas estrictas y bacterias facultativas)	<i>Clostridium spp.</i>
“CHROMagar O157”	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 <i>Escherichia coli</i> genérica
“CHROMagar Orientation” (Aeróbicas y anaeróbicas facultativas)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Klebsiella spp.</i> - <i>Enterobacter spp.</i> - <i>Serratia spp.</i> - <i>Proteus spp.</i> - <i>Morganella spp.</i> - <i>Providencia spp.</i> - <i>Enterococcus spp.</i> - <i>Staphylococcus</i>

4.3 Medios de crecimiento y condiciones

Se determinó la población de bacterias anaeróbicas luego de realizar diluciones en serie e inoculaciones en platos de “Reinforced Clostridial Agar”. La presencia de oxígeno en el medio fue reducida por la adición de un suplemento de reducción conocido como oxyrase (Oxyrase, Inc.® Masfield, Ohio). Este medio se ha utilizado en otras evaluaciones y se ha encontrado que es un sistema de reducción efectivo para crear la atmósfera anaeróbica deseada (Wiggs et al., 1999) Para este experimento, algunas de las muestras también fueron incubadas bajo condiciones anaeróbicas a 35° C ± 2° C por aproximadamente 24 horas. Las condiciones anaeróbicas se alcanzaron mediante la combinación del uso de jarras anaeróbicas en el sistema de generación anaeróbica gas

pack (GasPaks Inc.) junto a la adición de oxyrase en platos en medio “Reinforced Clostridial Agar”. En este medio, las colonias típicas de *Clostridium spp.* lucen de color negro con halo blanco.

La posible presencia de *Escherichia coli* O157:H7 fue determinada luego de hacer diluciones en serie e inoculaciones en platos de “BBL CHROMAgar O157”, siguiendo el protocolo de aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 establecido en el “Bacteriological Analytical Manual” (BAM, por sus siglas en inglés). El medio “CHROMAgar O157” es selectivo-diferencial y ha sido aprobado por la “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC por sus siglas en inglés). Debido a los sustratos cromogénicos del medio, las colonias de *Escherichia coli* O157:H7 se manifiestan de un color rosa-liláceo. Estos platos fueron incubados en la oscuridad a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 24 horas según las instrucciones del fabricante.

Las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, que incluyen *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Enterococcus* y *Staphylococcus*, fueron estimados mediante diluciones seriadas y utilizando “BBL CHROMAgar Orientation”. Estos platos fueron incubados a 37°C por 24 horas según las instrucciones del fabricante. Este medio es uno no-selectivo diferencial que también ha sido aprobado por la AOAC y es capaz de aislar, diferenciar y enumerar *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Proteus spp.*, entre otros. Las colonias de *Escherichia coli* se manifiestan de un color rosa crema, las de *Enterococcus spp.* de color turquesa y las de *Proteus* de color crema con halo marrón.

Para la detección de *Pseudomonas spp.* las muestras fueron diluidas en serie e inoculadas en platos de “Mac Conkey Sorbitol Agar”. Los platos fueron incubados a 37°C por 24 horas. Las colonias típicas de *Pseudomonas spp.* en este medio lucen de color rosa pálido.

4.4 Caracterización de aislados

Aislados de medios selectivos fueron purificados y cultivados para su caracterización. Pruebas confirmativas se realizaron en colonias típicas seleccionadas de “Reinforced Clostridial Agar” y se les condujo el ensayo bioquímico API 20A, (Biomérieux, Missouri). El API20A es un sistema de identificación rápida y consiste de 20 microcápsulas que contienen diferentes pruebas bioquímicas. Las pruebas incluidas en el sistema tienen diferentes reacciones, tales como la formación de indol, reacción de ureasa, acidificación de glucosa, manitol, lactosa, sacarosa, maltosa, xilosa y arabinosa, hidrólisis de gelatina por la enzima proteasa, hidrólisis de esculina por beta-glucosidasa y acidificación de glicerol, celobiosa, manosa, melezitosa, rafinosa, sorbitol, ramnosa y trehalosa. Este ensayo bioquímico fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante. Otras pruebas realizadas para la confirmación completa de la presencia del microorganismo fueron la reacción de catalasa, la tinción de Gram y la tinción de esporas que identifica bacilos esporulantes.

La confirmación de colonias típicas de *Escherichia coli* O157:H7 del medio “CHROMAgar O157” fue realizada utilizando la prueba de aglutinación de látex (Prolab Diagnostics, Richmond Hill EN, Canadá) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta es una prueba confirmativa de la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 luego de su identificación presuntiva en el medio “CHROMAgar O157”. Las bases de esta prueba son que las partículas de látex se cubren con antisuero O157 de manera que cuando se mezclen con cultivo fresco de bacteria *E. coli* O157:H7 se unan al antisuero causando una aglutinación visible de partículas de látex.

Asilados obtenidos del medio “CHROMAgar Orientation” fueron identificados utilizando las siguientes pruebas: tinción Gram, morfología celular y de colonia y ensayo bioquímico API 20E (Biomérieux, Missouri). El sistema API20E es una tirilla de pruebas utilizada para la identificación de bacilos entéricos Gram negativos y consiste de 20 microcápsulas donde ocurren diferentes reacciones. Estas reacciones o enzimas son: beta-galactosidasa, arginina dihidrolasa, lisina decarboxilasa, ornitina decarboxilasa,

utilización de citrato, producción de H₂S, ureasa, triptófano deaminasa, producción de indol, producción de acetoina, gelatinasa, fermentación/oxidación de glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amigdalina, arabinosa y otras pruebas suplementarias. También se llevó a cabo el ensayo bioquímico API20E a colonias encontradas en el medio “Mac Conkey Sorbitol Agar”.

Todos los aislados fueron mantenidos bajo congelación con una sustancia criogénica de 10 % glicerol y almacenados a -80° C para futuros estudios y para la creación de una base de información de microorganismos aislados de carne.

4.5 Análisis estadístico

Los conteos microbianos obtenidos se evaluaron mediante análisis de varianza de acuerdo a un diseño completamente aleatorizado con arreglo de parcelas divididas, siendo el método de empaque la parcela principal y los días de almacenamiento la subparcela. Las medias fueron comparadas entre sí mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Los análisis estadísticos y las comparaciones de medias se realizaron utilizando el programa estadístico SAS, versión 9.1 (2005). El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + E_i + P_j + (SP)_{ij} + h_{k,i} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

- Y_{ijk} : Variable de respuesta
- μ : Media general
- E_i : Efecto del iésimo empaque
- P_j : Efecto del jésimo día de almacenamiento
- (SP)_{ij} : Efecto de la interacción del iésimo método de empaque con el jésimo día de almacenamiento
- h_{k,i} : Efecto aleatorio del késimo animal del que se obtuvo la muestra de carne dentro del iésimo método de empaque
- ε_{ijk} : Error experimental aleatorio con media = 0 y varianza = σ²

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por medio del análisis estadístico de parcelas subdivididas se pudo determinar que no existe diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en crecimiento microbiano atribuible a tipo de empaque, por lo que no se puede inferir que un empaque sea mejor que el otro desde el punto de vista microbiológico. Se puede concluir que el factor determinante de la carga microbiana inicial contenida en las muestras es el manejo de éstas en la cadena de proceso y no el empaque por sí solo. Debido a que hasta el momento no se ha determinado un criterio microbiológico para la carne de res, los valores encontrados, a modo general, son considerados en base a la cantidad de unidades formadoras de colonia (CFU) como indicadores de deterioro. Se ha indicado (Jay et al., 2005) que la carne de res puede presentar conteos iniciales aceptables de 10^3 CFU/g y su deterioro comienza a notarse cuando los conteos alcanzan entre 10^6 y 10^7 CFU/g. Estos valores iniciales reportados por Jay et al., 2005 concuerdan con los valores iniciales encontrados en este estudio (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de crecimiento iniciales según los medios de cultivo

Medio de Cultivo	CFU/g
“Mac Conkey Sorbitol Agar”	6.18×10^2
“Reinforced Clostridial Agar”	5.22×10^3
“CHROMAgar Orientation”	9.11×10^2
“CHROMAgar O157”	3.4×10^1

Al considerar los valores de crecimiento iniciales en los distintos medios de cultivo se observó que en el medio “CHROMAGAR O157” fue el de menor crecimiento mientras que el de mayor crecimiento lo fue el medio “Reinforced Clostridial Agar”. Los valores de crecimiento reportados para el medio “CHROMAgar O157” corresponden a *Escherichia coli* genérica ya que no se encontró el patógeno *Escherichia coli* O157:H7.

En estudios realizados con canales de res en mataderos de producción local tampoco se encontró *E. coli* O157:H7 (Oquendo, 2006).

El medio “Reinforced Clostridial Agar” mostró el mayor contenido inicial de microorganismos. Este medio de cultivo es uno no selectivo y por lo tanto permite dar una idea total de la carga inicial microbiana presente en la muestra. Por otro lado, el medio “CHROMAgar O157” es un medio selectivo y diferencial que solo permite el recuento de una parte de esa carga inicial total debido a los ingredientes presentes en el mismo. Cabe señalar que los músculos cárnicos no son tejidos estériles; durante la matanza están expuestos a una gran cantidad de factores ambientales y de procesamiento que promueven el aumento de la carga bacteriana. También durante el análisis se considera la muestra completamente por lo que en la superficie e interior esta puede contener microorganismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos.

Los valores de crecimiento de microorganismos entéricos fueron muy parecidos a los valores de crecimiento de microorganismos aeróbicos. Esta información da una idea del recuento inicial de bacterias causantes de deterioro y de las condiciones de manejo en la cadena de proceso previo al empaque. Se ha indicado que la presencia de coliformes en carne cruda y otros alimentos no es necesariamente indicativa de contaminación fecal (INAL et al., 2004). Además, los coliformes representan cinco géneros de la Familia *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* y *Raoutella* de los cuales únicamente *Escherichia* puede ser indicador presuntivo de contaminación fecal. Se sabe que los microorganismos entéricos y otros microorganismos pueden encontrarse en la carne debido al contacto con varias fuentes de introducción microbiana como lo son los utensilios para el corte y manejo de la canal, el contacto con partículas provenientes del tracto gastrointestinal del animal, las manos de los empleados del matadero y los envases no estériles donde colocan los cortes de carne previo al empaque. En estudios presentados (Jay et al., 2005) se han identificado los envases no estériles donde se colocan los cortes de carne previo al empaque como la principal fuente de contaminación por microorganismos.

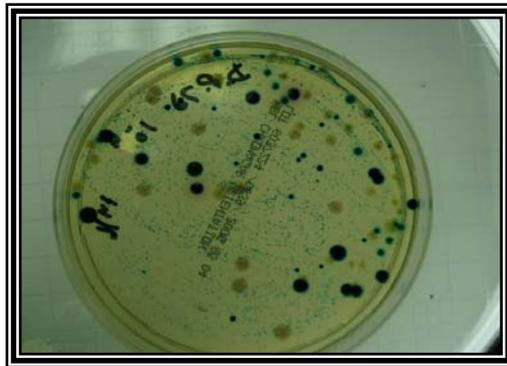
Según reportado en la Tabla 3 se puede notar que el crecimiento microbiano va en aumento según avanza el tiempo de almacenamiento de la carne en refrigeración. Luego de 14 días de almacenamiento en refrigeración, se observó que el crecimiento general de bacterias entéricas en el empaque al vacío fue menor en comparación con el crecimiento de bacterias entéricas en el empaque comercial. Aunque no se ha encontrado literatura que compare estos empaques considerando este grupo de microorganismos, es posible que exista algún efecto inhibitorio del empaque sobre los microorganismos que debe estudiarse más a fondo. Por ejemplo, luego de 14 días de almacenamiento el conteo de entéricos del empaque comercial, fue de 10^8 , sugiriendo que la carne se encuentra en un estado de deterioro donde se puede presentar olores objetables según Jay et al., (2005) mientras que el empaque al vacío no necesariamente muestra señales evidentes de deterioro por su valores de sobre 10^5 . De igual manera, el deterioro por parte de microorganismos anaeróbicos y facultativos comienza a ser notable en ambos empaques entre los 7 y 14 días de almacenamiento. Estudios conducido por Bernhard et al., (2006) determinaron que algunos microorganismos aeróbicos pueden sobrevivir en empaques al vacío aunque el empaque no favorece el crecimiento logarítmico durante el almacenamiento.

Tabla 3. Valores de crecimiento según el medio de cultivo, tipo de empaque y tiempo de almacenamiento

Tipo de Empaque	Medio de Cultivo	Día 3 Crecimiento (CFU/g)	Día 7 Crecimiento (CFU/g)	Día 14 Crecimiento (CFU/g)
Vacío	Mac Conkey Sorbitol Agar	9.2×10^1	1.76×10^2	2.05×10^5
	Reinforced Clostridial Agar	1.33×10^5	2.36×10^7	2.9×10^7
	CHROMAgar O157	1.41×10^2	1.25×10^2	1.13×10^4
	CHROMAgar Orientation	1.5×10^4	2.45×10^5	1.03×10^6
Comercial (PVC)	Mac Conkey Sorbitol Agar	5.35×10^4	1.18×10^6	2.25×10^8
	Reinforced Clostridial Agar	1.77×10^5	2.83×10^7	3.7×10^7
	CHROMAgar O157	2.1×10^2	3.39×10^4	3.95×10^6
	CHROMAgar Orientation	3.09×10^4	3.30×10^6	7.76×10^6

Como parte de la identificación de microorganismos, se lograron identificar bacterias entéricas crecidas bajo condiciones aeróbicas y *Escherichia coli* genérica crecidas en medios selectivos y diferenciales: “CHROMAgar Orientation” y “CHROMAgar O157”, respectivamente. En el medio “CHROMAgar Orientation” se logró determinar la presencia de diferentes grupos de bacterias como *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (KES), *Pseudomonas spp.* y *Staphylococcus spp.* El crecimiento de algunos de estos grupos se puede observar en la Figura 1.

Figura 1. Crecimiento de microorganismos en CHROMAgar Orientation



El crecimiento de los diferentes grupos identificados en el medio “CHROMAgar Orientation” varió dependiendo del tipo de empaque y del tiempo de almacenamiento como se muestra en la Tabla 4. En general todos los grupos y géneros mostraron mayor crecimiento en el empaque comercial que en el vacío. Se ha indicado que la competencia por la utilización de nutrientes y la baja en pH que ocasiona la interacción por parte de microorganismos como *Pseudomonas spp.* y otros psicotróficos Gram negativos como *Serratia spp.* reducen el crecimiento de *Acinetobacter spp.* (Gill y Newton, 1977). Esto parece suceder con el crecimiento del grupo *Acinetobacter / Hafnia alvei* cuya reducción en crecimiento se observó en el empaque al vacío luego de 3 días de almacenamiento.

En el empaque al vacío *Pseudomonas* parece suprimirse luego de los siete días de almacenamiento, y en el empaque comercial *E. coli* parece suprimirse por la presencia de otros grupos de microorganismos presentes en la carne luego de siete días de empaque.

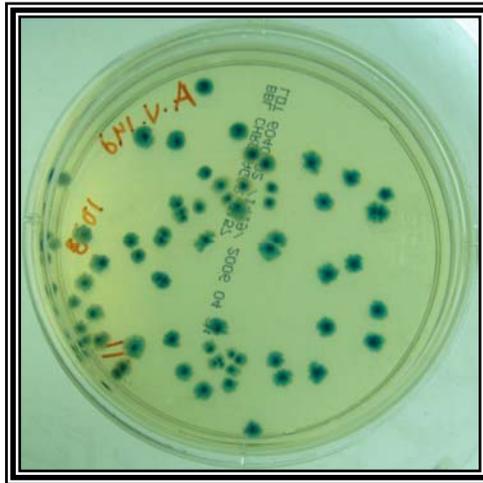
Se ha indicado en un estudio realizado en Grecia que el crecimiento de *Pseudomonas spp.* en muestras de carne de res predominó en almacenamiento aeróbico bajo condiciones de refrigeración y sus valores de crecimiento luego de 6 días de empaque fueron de 10^4 (Tsigarida et al., 2000). Los valores de crecimiento encontrados para muestras de carne de origen local empacadas comercialmente fueron de sobre 10^5 a los 7 días.

Tabla 4. Valores de crecimientos por grupo de microorganismos presentes en el medio CHROMAgar Orientation

Microorganismo	Empaque al Vacío				Empaque Comercial		
	Día 0	Día 3	Día 7	Día 14	Día 3	Día 7	Día 14
<i>E. coli</i>	1.25×10^2	5×10^2	6.67×10^3	1.08×10^5	3.3×10^1	5×10^4	
<i>Enterococcus spp.</i>	2.42×10^2	1.18×10^4	1.02×10^5	1.67×10^6	2.67×10^4	1.87×10^6	2.16×10^6
<i>Klebsiella- Enterobacter- Serratia (KES)</i>	5.20×10^2	5.01×10^3	1.24×10^5	1.24×10^7	1.01×10^3	7.03×10^6	2.09×10^7
<i>Acinetobacter spp. / Hafnia alvei</i>	1.93×10^2	6.7×10^1			3.55×10^3		
<i>Pseudomonas spp.</i>	1.24×10^3	2.03×10^3	2.68×10^4		7.35×10^3	2.07×10^5	1.77×10^6
<i>Staphylococcus spp.</i>	1×10^3	2.44×10^3	1.84×10^5	2.59×10^5	5.13×10^4		2.20×10^6

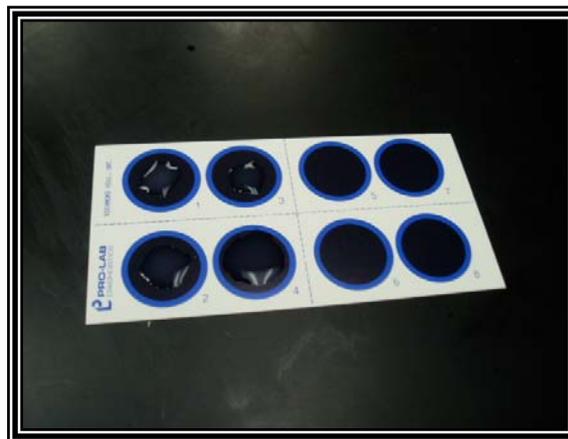
Por otra parte en el medio “CHROMAgar O157” se logró determinar que no se encontraba presente el patógeno *E. coli* O157:H7 en las muestras analizadas y lo que se encontraba en este medio era la presencia de *E. coli* genérica. El crecimiento de este género en el medio correspondiente se muestra en la Figura 2.

Figura 2. Crecimiento de *E. coli* genérica en medio CHROMAgar O157



Se confirmó que las bacterias presentes eran *E. coli* genérica mediante la prueba de aglutinación mostrada en la Figura 3, donde se observa el control positivo en los círculos superiores y un ejemplo de las colonias analizadas donde se observó la no aglutinación para ambos antígenos (somático y flagelar) en los círculos inferiores.

Figura 3. Prueba de aglutinación



Se realizaron diferentes pruebas y ensayos para lograr la caracterización de bacterias presentes en los diferentes medios de cultivo. Para las bacterias provenientes del medio “Reinforced Clostridial Agar” se utilizaron las pruebas bioquímicas y otros ensayos que en conjunto permitieron identificar la presencia de *Peptostreptococcus spp.*,

Prevotella oralis y *Staphylococcus saccharolyticus* en muestras empacadas al vacío y *Porphyromonas assacharolytica* en muestras empacadas comercialmente.

Tabla 5. Microorganismos aislados e identificados de carne empacada al vacío y comercialmente

Código	Tiempo de Almacenamiento	Gram	Esporas	Morfología	Identidad
B.V.7d.RCA.4	7 días	+	No	coco	<i>Peptostreptococcus spp.</i>
BV.7d.RCA.3	7 días	-	No	bacilo	<i>Prevotella oralis</i>
BV.3d.RCA.2	3 días	+	No	coco	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>
B.P. 3d.RCA.1	3 días	-	No	bacilo	<i>Porphyromonas assacharolytica</i>

No se ha encontrado literatura que indique que estas bacterias formen parte de la flora microbiana de la carne, por lo que se considera que su procedencia parece ser de origen humano. Esto se debe a que estas bacterias en particular *Staphylococcus saccharolyticus*, es parte de la flora de la piel humana (Westblom et al., 1990). Por otro lado, la presencia de algunas especies de *Peptostreptococcus* se ha encontrado como parte de la flora del rumen pero estas no se consideran proteolíticas (Guangjieng y Russell, 1988) por lo que no se considera que juegue un papel importante en el deterioro de la carne cuando está presente y se deben conducir estudios adicionales sobre este particular.

6. CONCLUSIONES

En este estudio se encontró que no existe diferencia significativa entre empaques desde el punto de vista microbiológico por lo que no se puede decir que un empaque es mejor que otro. Aún cuando se esperaba obtener una carne de mejor calidad microbiológica con el empaque al vacío, las pruebas realizadas en las muestras de carne empacadas de esta manera revelaron la presencia de microorganismos anaeróbicos y facultativos que, eventualmente, pueden afectar las características organolépticas de la carne y su aceptación general debido al deterioro.

En este estudio se pudieron aislar e identificar diferentes microorganismos presentes en las muestras de carne tales como: *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, el grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (KES), *Pseudomonas spp.* y *Staphylococcus spp.* los cuales se ha indicado se encuentran en la carne (Jay et al, 2005; INAL et al., 2004; Tsigarida et al., 2000). La mayoría de estos microorganismos son eliminados durante el proceso de cocción (Jay et al., 2005) por lo que el hecho de éstos encontrarse en la carne cruda no debería representar un riesgo a la salud. Lo que se debe considerar en este caso es la posible presencia de microorganismos productores de toxinas termoestables como lo son algunas cepas de *Staphylococcus aureus*. Pero para esto se deben conducir estudios que permitan identificar dichas cepas o la probabilidad de formación de toxina. Por el momento, en base a lo encontrado en este estudio, se recomienda que la carne refrigerada empacada comercialmente no se almacene por más de 3 días y la carne refrigerada empacada al vacío no se almacene por más de 7 días, y que al cabo de este tiempo se congele.

También se pudieron identificar varios microorganismos: *Peptostreptococcus*, *Prevotella oralis* y *Staphylococcus saccharolyticus* en muestras empacadas al vacío, y *Porphyromonas assacharolytica* en muestras empacadas comercialmente. No se ha encontrado literatura sobre la presencia de éstas y sus efectos sobre la carne pero su presencia sugiere que se deben evaluar las prácticas de manejo previas al empaque ya que

según se ha indicado en diversos estudios (Bernhard et al., 2006) estas prácticas afectan la carga microbiana inicial del alimento y por consiguiente pueden acelerar el deterioro.

7. RECOMENDACIONES

De este estudio surgen varias recomendaciones que se podrían seguir para ampliar la información obtenida y contestar preguntas o dudas que quedaron debido a la naturaleza del mismo. Entre las recomendaciones se encuentran:

- Se deben realizar más estudios sobre la interacción de la microflora nativa de la carne con otros microorganismos ajenos de manera que se pueda identificar la fuente de contaminación, si hubiese.
- Se deben realizar estudios sobre las características microbiológicas de las carnes importadas ya que éstas exceden en muchos casos los 14 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración.
- Se deben realizar análisis de las características organolépticas de la carne local bajo las mismas condiciones de empaque que se usaron en este estudio para ver la interacción de los microorganismos sobre éstas.
- Se deben realizar estudios sobre el efecto inhibitorio que aparenta tener el empaque al vacío sobre los microorganismos entéricos.
- Se deben realizar estudios microbiológicos para determinar el perfil de la carne de res producida a nivel local y compararlo con la carne de res producida en el extranjero.
- Se debe estudiar, en más detalle, el efecto de atmósferas modificadas sobre la calidad e inocuidad de la carne de res producida localmente.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, M. 2004. Evaluación de los atributos principales de calidad de la carne de res de origen local e importada, según se ofrece al consumidor. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez (Mayagüez Campus) 81: AAT 1421809.
- Beggan, M., P. Allen y F. Butler. 2004. Shelf life of retail beef muscles following storage in a low oxygen environment. *Journal of Muscle Foods*. 15(269).
- Bernhard, N., K. Sammet, G. Klein y T. Mueffling. 2006. Trends in the production and storage of fresh meat – the holistic approach to bacteriological meat quality. *International Journal of Food Science and Technology*. V41, 303-310.
- Bolling, B.W., D.J. Schmidt, y S.C. Ingham. 2002. Development of a simple method for detecting presumptive *Escherichia coli* en fresh retail beef. *Journal of Food Science*. V67 (1) 2002.
- Bridges, A. 2006. Charter News. EEUU rastrear brote de *E. coli* en bolsas de espinaca: 1 muerto.
<http://charter.net/news/read.php?id=13092140&ps=3292&cat=&cps=0&lang=es>.
Sitio visitado Octubre 18, 2006.
- Broda, D.M., J.A. Boerema y R.G. Bell. 1998. A PCR survey of psychotropic *Clostridium botulinum*-like isolates for the presence of BenT genes. Blackwell Publishing. Volume 27 Iss4.
- Casas, A., D. Cianzio y A. Rivera. 2005. Nuestra carne de res, la más saludable. *La Res Informativa*. Departamento de Industria Pecuaria, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. V9 (2) pp. 2.
- Casas, A., D. Cianzio y A. Rivera. 2004. Industria de carne de res: una responsabilidad compartida. *La Res Informativa*. Departamento de Industria Pecuaria, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. V8 (2, 3 y 4) pp.1.
- Casas, A., D. Cianzio y A. Rivera. 2002. Proteger nuestras tierras agrícolas: Responsabilidad indelegable. *La Res Informativa*. Departamento de Industria Pecuaria, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. V6 (3 y 4) pp. 1-2.
- Chung, M.S., J.H. Lee y D.B. Min. 2002. Effects of *Pseudomonas putrefaciens* and *Acinetobacter spp.* on the flavor quality of raw ground beef. *Journal of Food Science*. V67 (1) pp.77-83.
- Consumers Research Magazine. 1996. Fighting foodborne diseases with radiation (excerpt from a Council for Agricultural Science and Technology, CAST, overview). Farmington Hills, Michigan. <http://www.highbeam.com/doc/1G1-18735115.html>.
Sitio visitado Septiembre 21, 2006.

- Djenane, D., L. Martínez, A. Sánchez-Escalante, L. Montañés, D. Blanco, J. Yangüela, J. Beltrán y P. Róncales. 2006. Effect of lactic acid bacteria en beef steak microbial flora stored under modified atmosphere and on *Listeria monocytogenes* in broth cultures. *Food Science and Technology*. 12 (4): 287-295.
- Eichenberger, C., K. Hoover, A. Johnsen y J. Menk. 2006. Sheep Processing Start to Finish. Univeristy of Purdue, Animal Sciences Department.
<http://ag.ansc.purdue.edu/sheep/ansc442/Semprojs/2004/process/index.htm>. Sitio visitado Octubre 18, 2006.
- Estado Libre Asociado de Puerto Rico, Departamento de Agricultura, Oficina de Estadísticas. 11.58C9 Carne de Res: Proceso de Cómputos de Consumo per cápita 1975- 2004.
- Forrest, J. 2006. Meat Spoilage, Meat Safety and Quality. University of Purdue, Animal Sciences Department.
http://ag.ansc.purdue.edu/meat_quality/spoiled_meat.html. Sitio visitado Octubre 18, 2006.
- Gill, C.O., y K.G. Newton. 1977. The development of aerobic spoilage flora on meat at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriololy* 43:189-195.
- Guangjieng, Chen y James B. Russell. 1988. Fermentation of Peptides and Amino Acids by a Monensin-Sensitive Ruminant Peptostreptococcus. *Applied and Environmental Microbiology*. 54 (11) 2742-2749.
- Hedrick H.B., E.D. Aberle, J.C. Forrest, M.D. Judge y R.A. Merkel. 1994. Principles of Meat Science. Third Edition., Kendall Hunt Publishing Co., Dubuque, Iowa. pp1, 3.
- Hunt, M., R. Mancini, D. Hachmeister, D. Kropf, M. Merriman, G. de Lduca y G. Milliken, 2004. Carbon monoxide in modified atmosphere packaging affects color, shelf life, and microorganisms of beefsteaks and ground beef. *Journal of Food Science*. 69 (1) 1365 – 2621.
- Instituto Nacional de Alimentos (INAL), Grupo Técnico de Criterios Microbiológicos (CONAL). 2004. Guía para la interpretación de resultados microbiológicos de alimentos. Boletín Oficial No 30.407.
- Jay, J., M. Loessner y D. Golden. 2005. *Modern Food Microbiology*. Springer. Seventh Edition. pp:18, 19, 23, 25, 26, 55.

Kannan G., C.B. Chawan, B. Kouakou y S. Gelaye. 2002. Influence of packaging method and storage time on shear value and mechanical strength of intramuscular connective tissue of Cheven. *Journal of Animal Science*. 80: 2383-2389.

King, D.A., R.C. Andersen, R.K. Miller, M.A. Carr, G.E. Carstens, J.W. Savell, Y.S. Jung, T.R. Callaway, T.S. Edrington, K.J. Genovese y D.J. Nisbet. 2005. Effects of pre-harvest supplemental chlorate on beef carcass and meat quality. *Meat Science* 70(2005) 215-221.

Kuber, P.S., J.R. Busboom, E. Huff-Lenergan, S.K. Duckett, P.S. Mir, Z. Mir. R.J. McCormick, M.V. Dodsen, C.T. Gaskins, J.D.Crenrath, D.J. Marks y J.J. Reeves. 2004. Effects of biological type and dietary fat treatment on factors associated with tenderness: I. measurements on beef Longissimus muscle. *Journal of Animal Science*. 82: 770-778.

Mustapha, M., T. Ariyapitipun y A D. Clarke. 2002. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid, and nisin. *Journal of Food Science*. 67(1): 262.

Oquendo, M. 2006. Incidencia de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 en carne proveniente de ganado bovino de mataderos de Puerto Rico. Tesis de Maestría. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez (Puerto Rico)

Phil. Marcelo, O. Masana, L., Meichtri y R. Rodríguez. 2000. Determinación de la vida útil en cortes bovinos: Mayor calidad por más tiempo. Instituto de Tecnología de Alimentos, INTA Cautelar. pp157, 158.

Santrich-Vacca, D. 2006. Evaluación de la calidad y composición química de la carne de res proveniente de animales de dos grupos de edad en Puerto Rico. Tesis de Maestría. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez (Puerto Rico).

SAS, versión 9.1, 2005.

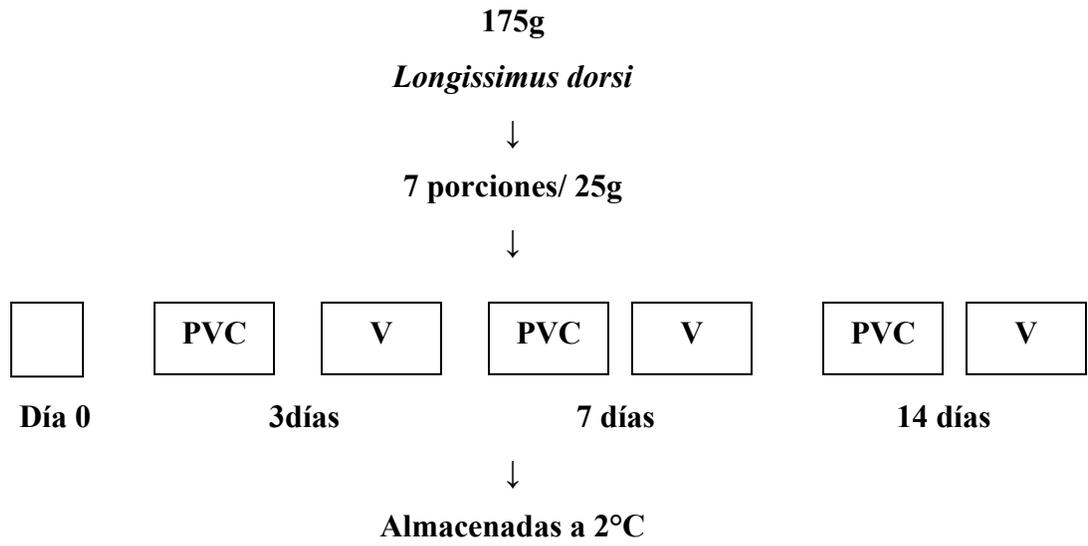
Tsigarida, E., P. Skandamis, y G-J.E. Nychas. 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. *Journal of Applied Microbiology*. V89 (901-909).

Westblom, T., G. Gorse, T. Milligan, y A. Schindzielorz. 1990. Anaerobic endocarditis caused by *Staphylococcus saccharolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*. Diciembre 1990, V28(18) pp.218 – 219.

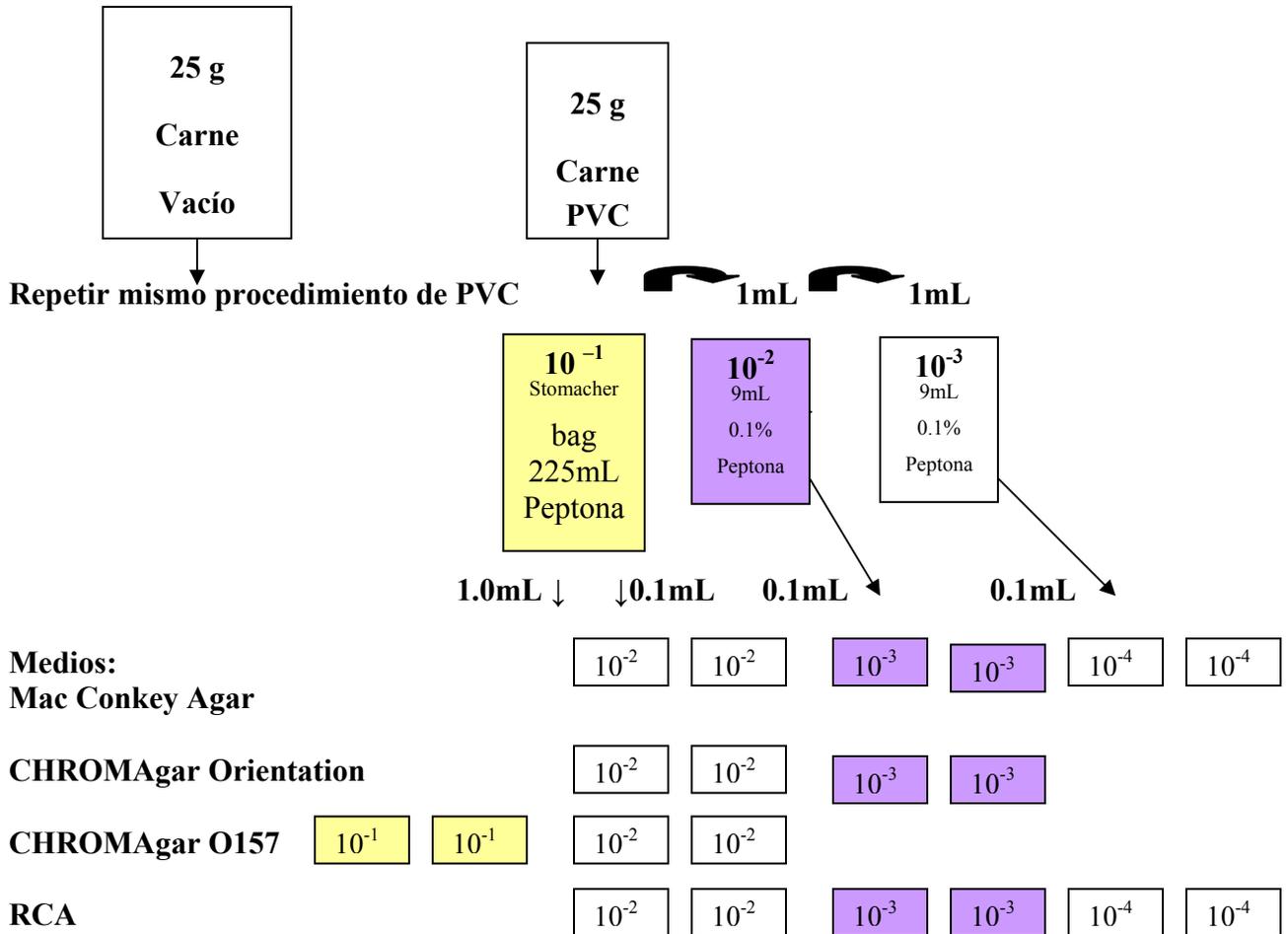
Wiggs, L., J. Cavallero y J. Miller. 1999. Evaluation of the Oxyrase Oxyplate Anaerobe Incubation System. *Journal of Clinical Microbiology*. February 2000, V38, (2p) 499.

APÉNDICES

Apéndice A. Diagrama de flujo de empaque de las carnes



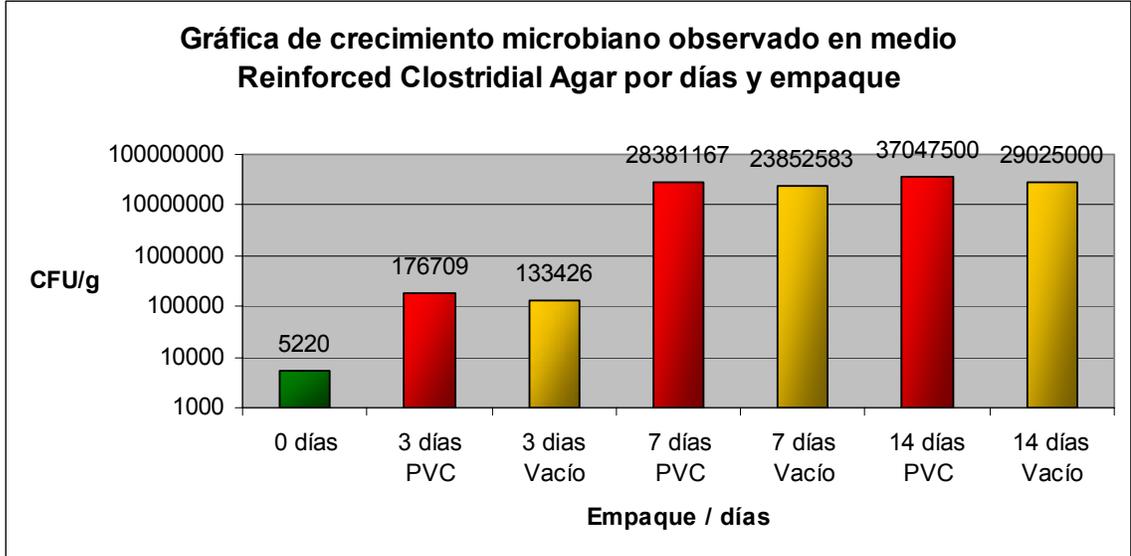
Apéndice B. Ejemplo del diagrama de flujo utilizado para los procedimientos de laboratorio



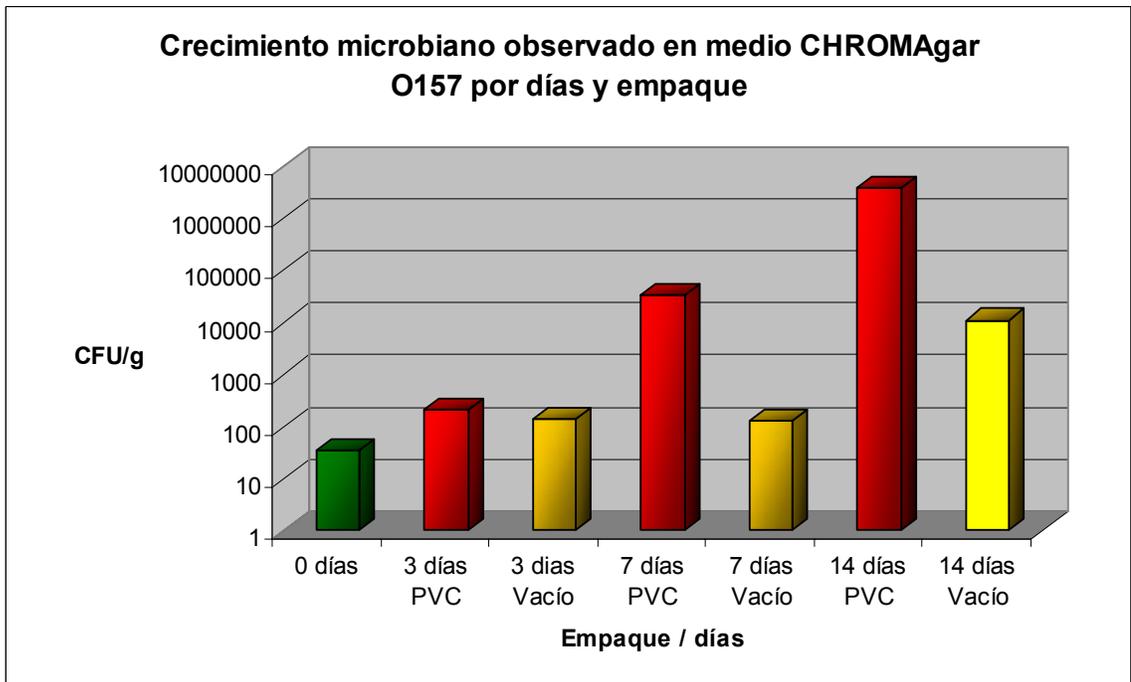
Las diluciones representadas anteriormente no son las únicas que se utilizaron en este experimento. Pueden variar dependiendo del contenido microbiano inicial de la carne, empaque y día de muestreo y por esto pueden aumentar hasta incluir diluciones tan altas como 10⁻⁸.

Apéndice C. Gráficas

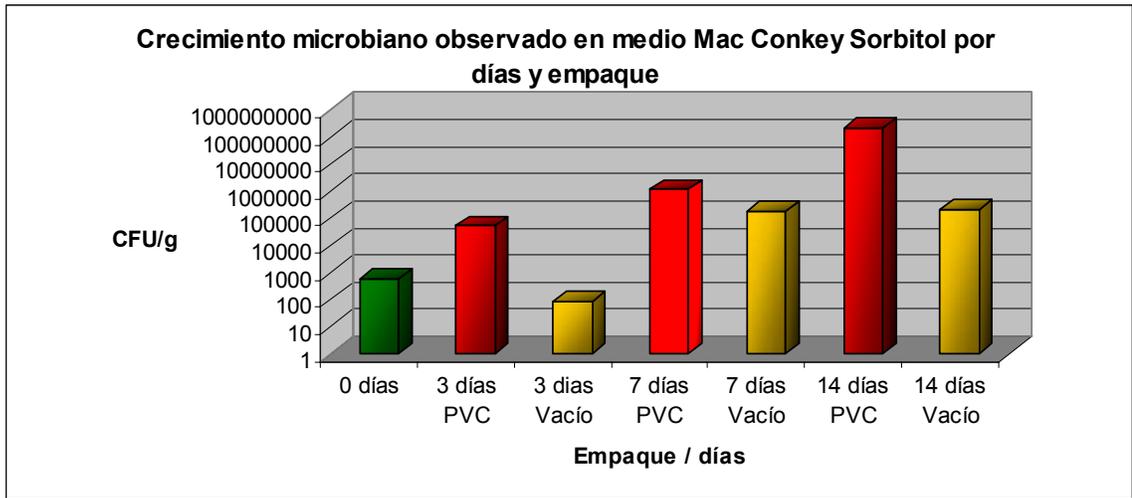
Apéndice C.1 Gráfica de crecimiento microbiano observado en medio Reinforced Clostridial Agar por días y empaque



Apéndice C.2 Crecimiento microbiano observado en medio CHROMAgar O157 por días y empaque



Apéndice C.3 Crecimiento microbiano observado en medio Mac Conkey Sorbitol por días y empaque



Apéndice C.4 Crecimiento microbiano observado en medio CHROMAgar Orientation por días y empaque

