

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA CAMPARATIVA DE
CARNE DE RES (*Longissimus dorsi*), BAJO EL EMPAQUE
AL VACÍO Y EL EMPAQUE COMERCIAL TRADICIONAL.**

Edwin Adalberto Muñoz Espinoza

**Maestría en Gestión De La Calidad con
Especialidad en Inocuidad de Alimentos**

Guatemala, Febrero de 2010

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA CAMPARATIVA DE
CARNE DE RES (*Longissimus dorsi*), BAJO EL EMPAQUE
AL VACÍO Y EL EMPAQUE COMERCIAL TRADICIONAL.**

Trabajo de Graduación

presentado por

Edwin Adalberto Muñoz Espinoza

Para optar al grado de

**Maestría en Gestión De La Calidad con
Especialidad en Inocuidad de Alimentos**

Guatemala, Febrero de 2010

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Óscar Manuel Cobar Pinto, Ph. D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. María Estuardo Guerra Valle	Vocal IV
Br. Berta Alejandra Morales Mérida	Vocal V

CONSEJO ACADEMICO
ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Óscar Manuel Cobar Pinto, Ph. D.
Licda. Anne Marie Liere de Godoy, MSc.
Dr. Jorge Luis de León Arana
Dr. Jorge Erwin López Gutiérrez
Lic. Félix Ricardo Véliz Fuentes, MSc.

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	4
4. MARCOTEORICO.....	5
5. OBJETIVOS.....	8
6. HIPOTESIS	8
7. METODOLOGÍA.....	9
7.1 Muestras de carne y condiciones de almacenamiento	9
7.2 Cepas Bacterianas.....	9
7.3 Medios de crecimiento y condiciones	9
7.4 Caracterización de aislados Microbianos.....	10
7.5 Análisis estadístico	11
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
9. CONCLUSIONES.....	17
10. RECOMENDACIONES.....	17
11. BIBLIOGRAFIA.....	18
12. ANEXOS.....	20

1. RESUMEN

Se evaluó la carga microbiana 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 presentes a 0, 3, 7 y 14 días de almacenaje.

Los resultados obtenidos del análisis estadístico mostraron que existe diferencia significativa en el crecimiento microbiano atribuible al tipo de empaque y tiempo de almacenaje; por lo que se puede inferir que un empaque es mejor que el otro, desde el punto de vista microbiológico.

A través de la caracterización de grupos de bacterias se logró identificar diversas bacterias, cultivadas en medios selectivos y diferenciales.

En las muestras analizadas no se encontró el patógeno *E. coli* O157: H7. Pruebas bioquímicas demostraron la presencia de *Pseudomonas spp*, *Clostridium spp* y de la familia *Enterobacteriaceae*; tanto en muestras empacadas al vacío y en muestras empacadas comercialmente. De lo anterior se deduce la importancia de la carga microbiana inicial y el tipo de microorganismo presente; indistintamente del empaque utilizado.

Al final, se obtuvo una carne de mejor calidad microbiológica en el empaque al vacío, con menos deterioro y recuentos menores, comparados con las muestras de carne empacadas utilizando el empaque comercial tradicional.

2. INTRODUCCIÓN

Los consumidores de carne de res, aparentan preferir las carnes importadas sobre las carnes de origen local. Los consumidores Guatemaltecos perciben que la carne de res importada de los Estados Unidos y de América Central (Nicaragua), posee mejores atributos de calidad, al menos en lo que a ternera se refiere, comparada con la que se produce localmente.

La ternera es el atributo más importante y apreciado por el consumidor al determinar la calidad de la carne. 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 (1,2).

Los productores están consientes 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 tiempo de vida de la carne procesada y mantener la calidad del producto por períodos más prolongados.

La microbiología de un alimento es muy importante en términos de su inocuidad. Además de la posibilidad de que algunos microorganismos puedan ocasionar enfermedades, el contenido microbiológico en los alimentos incide directamente sobre el tiempo de vida y la aceptación general de los productos (3).

Durante la última década, informes epidemiológicos han descrito brotes de trastornos gastrointestinales en las poblaciones humanas vinculadas 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. Otros brotes atribuidos a este patógeno se han relacionado con la contaminación de vegetales y jugos, como el originado en septiembre del 2006 en espinacas (4).

Aún así, la carne sigue siendo el principal vehículo de transporte relacionado a *Escherichia coli* serotipo O157:H7, seguido por la lechuga fresca pre-empacada. Este patógeno en cuestión puede ser 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 (5).

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 la carga de bacterias en muestras de carne, utilizando dos tipos de empaque, y además; determinar la calidad e inocuidad a través del tiempo normal de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración.

3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

Las grandes empresas en la actualidad se hacen más competitivas dentro de su ramo y cada vez adoptan más estrategias a fin de garantizar el éxito. Estas organizaciones están adoptando herramientas de optimización, a fin de alcanzar el éxito a corto y mediano plazo. La necesidad de plantear la evaluación de los procesos incidirá en la optimización de los mismos, ya que mediante su análisis se podrán establecer los lineamientos requeridos para el logro de los objetivos.

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.

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

Esta investigación también se justifica desde el punto de vista práctico, ya que la misma propone estrategias de acción fácilmente aplicables al proceso de empaque; desde el punto de vista teórico, genera reflexión y discusión tanto sobre el conocimiento existente del área investigada, como dentro del ámbito de la Industria Alimentaria; y desde el punto de vista metodológico, esta investigación genera conocimiento válido y confiable dentro del área de la Microbiología de Alimentos.

Por otra parte, esta investigación abre nuevos caminos para empresas que procesen productos similares a los que aquí se plantean, sirviendo como marco referencial a éstas.

Por último, profesionalmente pone de manifiesto los conocimientos adquiridos durante la carrera y permitirá sentar las bases para otros estudios que surjan partiendo de la problemática aquí especificada.

4. MARCO TEÓRICO

En general, carne se define como todo tejido animal apto para el consumo humano, e incluye tejido muscular, conectivo y otras partes comestibles. 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 (2, 6, 7).

Aunque el tejido muscular es el principal componente de la carne, otros tejidos blandos (adiposo, epitelial, conectivo y nervioso) también están presentes. 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(7).

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 (2,7).

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*, lo que fue corroborado posteriormente, a través de mediciones físico-mecánicas (1, 2, 8).

Ambos estudios son relevantes para la industria de la carne, ya que se reconoce que el valor nutricional así como la calidad organoléptica de la carne, son dos factores que influyen significativamente cuando el consumidor está tomando la decisión de cuál producto adquirir.

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, terneza, sabor, jugosidad) por parte del consumidor (1, 8).

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 (8, 9).

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 (8).

Se ha indicado, que tanto los cortes de carne fresca o enternecida 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 (8, 10).

Algunas de las bacterias que intervienen en el deterioro de la carne almacenada son del tipo anaeróbicos o anaeróbicos facultativos, 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 (11).

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 (12).

Un estudio que comparó el tiempo de vida de exhibición de segmentos del músculo *Longissimus dorsi* empacado al vacío y 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. 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 (13, 14).

Hunt et al., (2004) realizaron un estudio para evaluar el efecto del monóxido de carbono sobre el color, tiempo 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* (12).

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 (5, 10).

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 (15, 16).

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.

5. OBJETIVOS

General:

- Evaluar los cambios de la carga microbiana en muestras de carne, bajo dos condiciones de empaque; durante un período de catorce días de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración.

Específicos:

1. Evaluar el crecimiento microbiano de patógenos anaeróbicos y bacterias aeróbicas deteriorantes en la carne.
2. Determinar el impacto de los microorganismos sobre la calidad de la carne y su tiempo de vida.
3. Determinar los cambios en la carga microbiana, a los tres, siete y catorce días de almacenamiento.
4. Aislar bacterias en diferentes medios de cultivo selectivos y diferenciales para su caracterización.

6. HIPÓTESIS

- No existe diferencia microbiológicamente significativa en la carne de res, entre la utilización de empaque al vacío y el empaque con film 914 tradicional.
- El tipo de empaque utilizado para la carne de res, se encuentra íntimamente asociado a la proliferación de microorganismos deteriorantes del producto.

7. METODOLOGÍA

7.1 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. Las muestras se obtuvieron inmediatamente después del sacrificio de los animales en una planta procesadora de carne local. Las muestras obtenidas fueron manejadas asépticamente e inmediatamente procesadas.

De cada muestra de carne se obtuvieron 7 submuestras (de 25 g) que posteriormente fueron empacadas al vacío, utilizando la máquina de empaque al vacío FoodSaver Vacuum Packaging System, Series V1005 debidamente calibrada, y empacadas comercialmente utilizando envoltura plástica Reynolds Foodservice Film 914 con bandeja de poliestireno; dando un total de 42 muestras analizadas por microorganismo identificado.

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.

7.2 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 "MacConkey 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.

7.3 Medios de crecimiento y condiciones

Se determinó la población de bacterias anaeróbicas luego de realizar diluciones en serie e inoculaciones en placas Petri con "Reinforced Clostridial Agar". Las condiciones anaeróbicas se alcanzaron mediante la utilización de jarras anaeróbicas con el sistema de generación anaeróbica gas-pack (GasPack Inc.); incubadas a 35° C ± 2° C por aproximadamente 24 horas. En este medio, las colonias típicas de *Clostridium spp.* lucen de color negro con halo blanco.

La presencia de *Escherichia coli* O157:H7 se determinó luego de hacer diluciones en serie e inoculaciones en placas Petri con "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. Se incubó 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* y *Proteus*, fueron estimados mediante diluciones seriadas y utilizando “BBL CHROMAgar Orientation”. Estas placas, fueron incubadas a 37°C por 24 horas según las instrucciones del fabricante. Este medio es aprobado también por la AOAC.

Para la detección de *Pseudomonas spp.* las muestras fueron diluidas en serie e inoculadas en placas Petri con “MacConkey Sorbitol Agar”. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Las colonias típicas de *Pseudomonas spp.* en este medio lucen de color rosa pálido.

7.4 Caracterización de aislados Microbianos

Los aislados de medios selectivos fueron purificados y cultivados para su caracterización. Pruebas confirmativas se realizaron en colonias típicas seleccionadas de “Reinforced Clostridial Agar” utilizando 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 efectuado siguiendo las instrucciones del fabricante.

La confirmación de colonias típicas de *Escherichia coli* O157:H7 en el 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”. La prueba se basa en el recubrimiento de partículas de látex con anti-O157, de manera que cuando se mezclen con cultivo fresco de bacteria *E. coli* O157:H7 se unan al antisuero formando un complejo visible por aglutinación.

Aislados obtenidos del medio “CHROMAgar Orientation” fueron identificados utilizando ensayo bioquímico API 20E (Biomeriux, Missouri). El sistema API20E es una tirilla de pruebas utilizada para la identificación de bacilos entéricos Gram negativo, y consiste en 20 microcápsulas donde ocurren diferentes

reacciones bio-enzimáticas: 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 llevo a cabo el ensayo bioquímico API20E para las colonias encontradas en el medio "Mac Conkey Sorbitol Agar".

7.5 Análisis estadístico

Los conteos microbianos obtenidos (logaritmo base 10 de los conteos), se evaluaron mediante análisis de varianza para un diseño Factorial 2 X 4 con bloques.

Si efectuaron comparaciones gráficas, prueba de intervalos múltiples de Duncan, diagramas de Tukey y gráficos de barras de error.

El diseño estadístico fue el propuesto por el Director de la Unidad de Biometría y Profesor titular de Bioestadística de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

El análisis numérico se efectuó mediante la utilización del programa estadístico SAS, versión 9.1 (2005).

El modelo estadístico utilizado:

$$n_j = (Z)^2 / 2$$

donde el límite de error = 2σ

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron y cuantificaron, los siguientes microorganismos:

- *Enterobacteriaceae* (incluida aquí, *E. coli* genérica)
- *Clostridium spp*
- *Pseudomonas spp*

No se encontró en ninguna de las muestras analizadas E. coli O157:H7

Por medio del análisis estadístico, se pudo determinar que existe diferencia estadísticamente significativa entre tiempos ($p < 0.00001$) y también entre empaques ($p = 0.00354$), por lo que se puede inferir que el tipo de empaque utilizado es determinante en el tiempo de vida y calidad microbiológica del producto. Además, el factor determinante de la carga microbiana inicial contenida en las muestras, es el manejo del producto en la cadena de proceso y no el empaque por sí solo.

La carne de res puede presentar conteos iniciales aceptables de 10^2 UFC/g, iniciando su deterioro cuando los conteos alcanzan entre 10^5 y 10^7 UFC/g, según se observa en las tablas No.1, 2 y 3.

Tabla No. 1

Valores de crecimiento obtenidos en UFC/g, para el género *Enterobacteriaceae* (incluida aquí, *E. coli* genérica), durante el tiempo de almacenamiento a 2° C.

		Muestras de carne (25 gr.)						
		1	2	3	4	5	6	
Inicio	0	1.2×10^1	1.0×10^1	1.04×10^1	2×10^1	1.03×10^1	3.2×10^1	
Empaque al vacío	Días de evaluación	3	3.2×10^2	2.1×10^1	8.9×10^1	5.3×10^2	3.33×10^2	9.83×10^1
		7	2.1×10^3	4.3×10^3	2.0×10^4	7.1×10^3	8.3×10^3	6.7×10^2
		14	5.8×10^4	6.44×10^4	7.3×10^6	$6.1. \times 10^5$	7.34×10^5	11.3×10^5
Empaque con film 914	Días de evaluación	3	2.3×10^2	1.44×10^2	2.11×10^1	6.33×10^1	3.12×10^2	4.33×10^2
		7	6.1×10^4	1.11×10^5	7.12×10^4	9.3×10^3	11.2×10^3	4.12×10^4
		14	3.11×10^6	1.12×10^7	8.7×10^6	9.18×10^6	4.5×10^5	10.1×10^5

En el análisis Post –ANDEVA y la prueba de intervalos múltiples de Duncan para enterobacterias a los diferentes tiempos de almacenaje, se puede observar que el logaritmo del recuento bacteriano se incrementa en relación al tiempo. La prueba Post-ANDEVA para el tipo de empaque concluye que el empaque 1 (al vacío) presenta significativamente menores recuentos de enterobacterias que el empaque 2 (tradicional con film 914).

Tabla No. 2

Valores de crecimiento obtenidos en UFC/g, para *Clostridium spp.* durante el tiempo de almacenamiento a 2° C.

		Muestras de carne (25 gr.)						
		1	2	3	4	5	6	
Inicio	0	1.0 x 10 ¹	0	0	0	0	1.0 x 10 ¹	
Empaque al vacío	Días de evaluación	3	1.2 x 10 ¹	0	0	0	0	2.2 x 10 ¹
		7	2.1 x 10 ³	0	0	0	0	6.2 x 10 ²
		14	5.8 x 10 ⁴	0	0	0	0	1.4 x 10 ³
Empaque con film 914	Días de evaluación	3	2.1 x 10 ¹	0	0	0	0	1.6 x 10 ¹
		7	1.0 x 10 ¹	0	0	0	0	2.0 x 10 ²
		14	2.2 x 10 ²	0	0	0	0	4.0 x 10 ²

El análisis estadístico solamente fue aplicado a los resultados del género *Enterobacteriaceae*; ya que como se puede observar, las muestras 1 y 6 fueron las únicas con resultado cuantitativo para *Clostridium spp.*, y la muestra 6 fue la única con resultado positivo para *Pseudomonas spp.*, presentados en las Tablas No. 2 y No. 3; sin embargo, el comportamiento es similar para todos los casos: los conteos se incrementan con el tiempo y utilizando el empaque 1 (al vacío), se obtienen recuentos menores.

Tabla No. 3

Valores de crecimiento obtenidos en UFC/g, para *Pseudomonas spp.* durante el tiempo de almacenamiento a 2° C.

		Muestras de carne (25 gr.)					
		1	2	3	4	5	6
Inicio	0	0	0	0	0	0	1.0 x 10 ¹
Empaque al vacío	Días de evaluación	3	0	0	0	0	1.3 x 10 ¹
		7	0	0	0	0	1.5 x 10 ¹
		14	0	0	0	0	1.6 x 10 ¹
Empaque con film 914	Días de evaluación	3	0	0	0	0	1.8 x 10 ¹
		7	0	0	0	0	2.1 x 10 ²
		14	0	0	0	0	2.4 x 10 ²

Es importante hacer notar, que en ninguna de las muestras analizadas se encontró *E. coli* O157:H7.

Los valores de crecimiento de microorganismos entéricos (10⁶), están muy por encima de los valores de crecimiento de los otros microorganismos aislados. Esta información da una idea del tipo de bacterias causantes de deterioro y de las condiciones de manejo en la cadena de proceso previo al empaque.

Los microorganismos entéricos y otros microorganismos, pueden encontrarse en la carne debido al contacto con varias fuentes de contaminación microbiana, como los utensilios para el corte y manejo de la canal, el contacto con material proveniente 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 general, 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, 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 último, cabe hacer notar que los resultados presentados en el presente estudio, reflejan condiciones ideales de incubación, nutrientes, temperatura y pH; por lo que recuentos de microorganismos en medios menos selectivos podrían variar, tomando en cuenta la competencia por los nutrientes y espacio para su crecimiento.

9. CONCLUSIONES

1. Existe diferencia significativa entre empaques, concluyendo que el empaque 1 (al vacío) presenta significativamente menores recuentos que el empaque 2 (tradicional con film 914).
2. El empaque por sí solo, no asegura la inhibición en el crecimiento de los microorganismos.
3. Las prácticas de manejo, previas al empaque son determinantes en la carga microbiana inicial del alimento y por consiguiente pueden acelerar el deterioro.
4. Los productos cárnicos son alimentos con niveles de contaminación importantes y con una presencia constante de patógenos.
5. La carne de res puede presentar conteos iniciales aceptables de 10^2 UFC/g, iniciando su deterioro cuando los conteos alcanzan entre 10^5 y 10^7 UFC/g.
6. En general, se puede notar que el crecimiento microbiano va en aumento según avanza el tiempo de almacenamiento de la carne en refrigeración.

10. RECOMENDACIONES

1. Aplicar Buenas Prácticas de Manufactura, tendientes a la prevención de la contaminación del alimento durante el proceso de matanza, eviscerado, despiece; así como también durante el empaque, transporte y conservación de la carne.
2. Reproducir este estudio, empleando atmósferas modificadas para determinar el crecimiento bacteriano y la calidad global de la carne.
3. Con 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. Al cabo de este tiempo, deberá congelarse.
4. Conducir estudios comparativos, utilizando muestras cárnicas provenientes de diferentes músculos y de diferentes empresas empacadoras.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. King, A.S. Meat Science. Sixth Edition, Fox Randall Publishing Co., Texas, USA. pp 10, 14.
2. 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.
3. 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).
4. Bridges, A. 2006. Charter News. EEUU rastrean 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>.
Octubre 18, 2006.
5. 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.
6. Casas, A., D. Cianzio y A. Rivera. 2005. Nuestra carne de res, la más saludable. La Res Informativa. Departamento de Industria Pecuaria, UNAM. V9 (2) pp. 2.
7. 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.
8. Forrest, J. 2006. Meat Spoilage, Meat Safety and Quality. University of Purdue, Animal Sciences Department. 2006.
9. 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>. Septiembre 21, 2006.
10. 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.

11. 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.
12. Hunt, M., R. Mancini, D. Hachmeister, D. Kropf, M. Merriman, G. de Leduc 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.
13. 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).
14. 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.
15. 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.
16. Gill, C.O., y K.G. Newton. 1977. The development of aerobic spoilage flora on meat at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* 43:189-195.

12. ANEXOS

Análisis Estadístico:

ANDEVA - ENTEROBACTERIAS

ANOVA log enter empaque tiempo bloque empaque*tiempo, cat. (empaque tiempo bloque)

Number of obs. = 48 R-squared = 0.9272

Root MSE = 0.60552 Adj. R-squared = 0.9023

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	163.539213	12	13.6282678	37.17	0.0000
Empaque	1.75593745	1	1.75593745	4.79	0.00354
Tiempo	158.802194	3	52.9340647	144.37	0.0000
Bloque	1.02059102	5	0.204118204	0.56	0.7322
Empaque*tiempo	1.96049059	3	0.653496863	1.78	0.1685
Residual	12.8329269	35	0.366655055		
Total	176.37214	47	3.75259872		

ANALISIS POST-ANDEVA DE TIEMPOS:

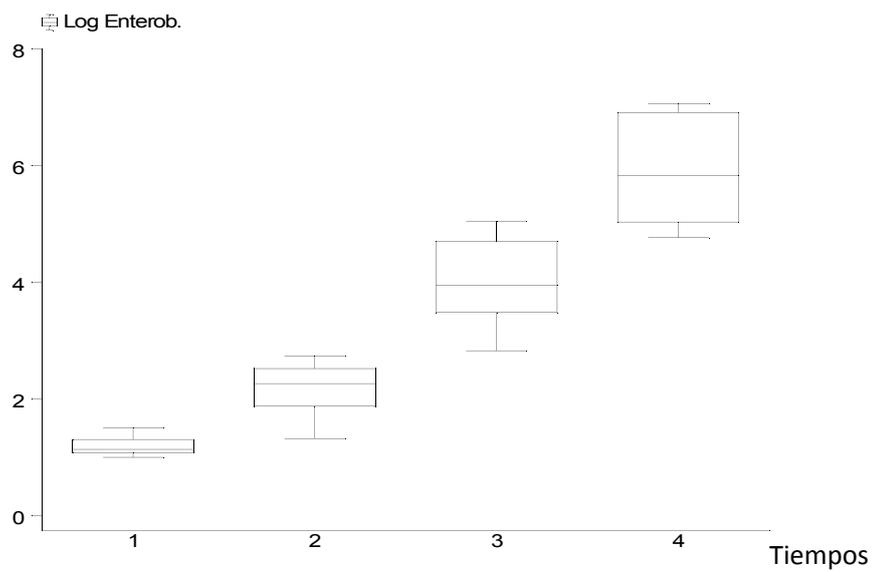
Datos de enterobacterias a los diferentes tiempos.

Tabulate tiempo, s umm (log-enter)

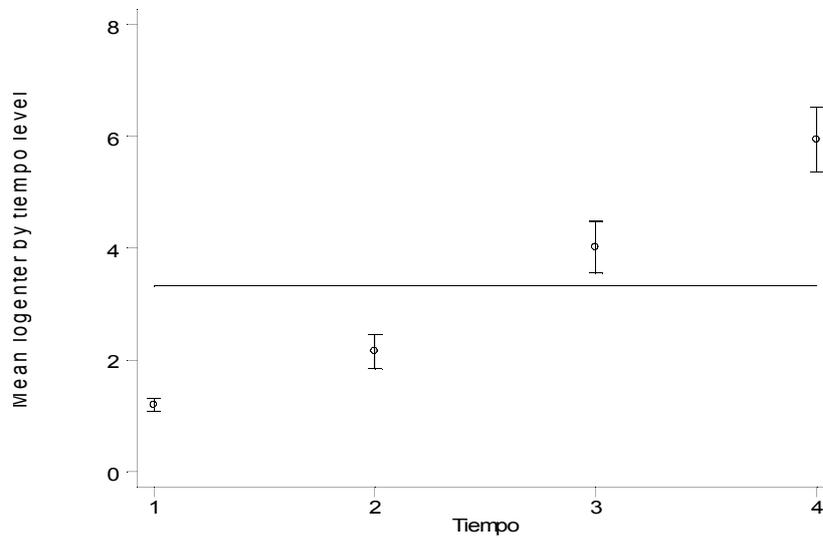
Summary of Log Enterob.			
Tiempo	Mean	Std. Dev.	Freq.
1	1.1909054	0.17463334	12
2	2.1490528	0.48198254	12
3	4.0140717	0.72663553	12
4	5.9368013	0.89803377	12
Total	3.3227078	1.9371625	48

Al graficar estos promedios se tiene:

1. Cajas de Tukey:



2. Gráficos de barras de error:



Al realizar la prueba de intervalos múltiples de Duncan, se obtiene que todos los tiempos son diferentes entre sí de la siguiente manera:

Tiempo 4 vs. Tiempo 3 $P < 0.0001$

Tiempo 4 vs. Tiempo 2 $P < 0.0001$

Tiempo 4 vs. Tiempo 1 $P < 0.0001$

Tiempo 3 vs. Tiempo 2 $P < 0.0001$

Tiempo 3 vs. Tiempo 1 $P < 0.0001$

Tiempo 2 vs. Tiempo 1 $P = 0.0007$

El logaritmo del recuento bacteriano se incrementa en relación al tiempo (lo que también representa incremento en los conteos correspondientes).

ANALISIS POST-ANDEVA EMPAQUES:

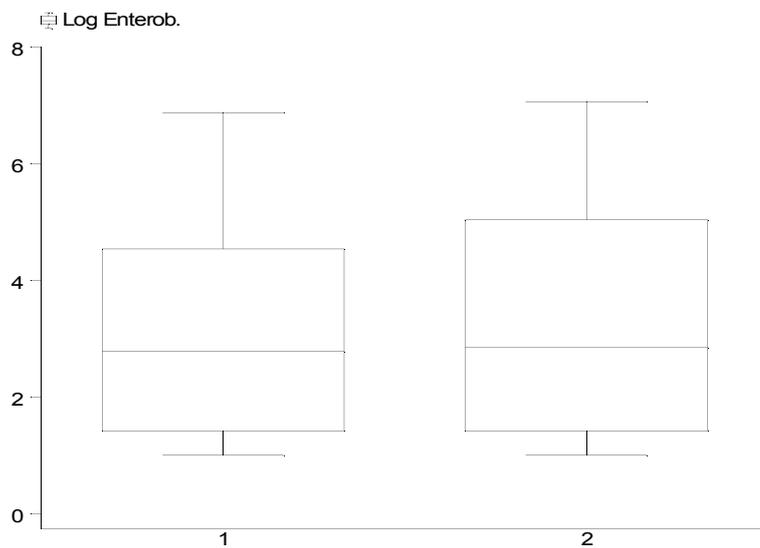
Datos de enterobacterias a diferentes empaques, se tiene lo siguiente:

Tabulate empaque, sum.(log-enter)

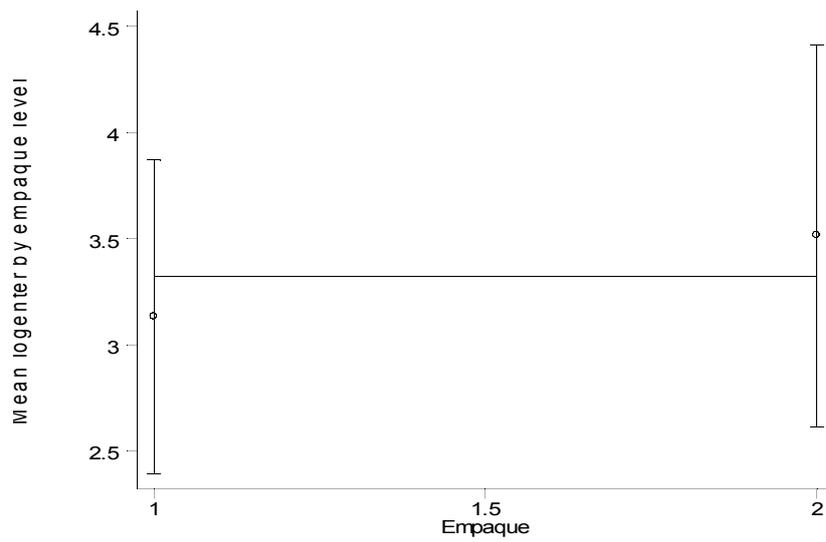
Summary of Log Enterob.			
Empaque	Mean	Std. Dev.	Freq.
1	3.1314435	1.746602	24
2	3.5139721	2.1310538	24
Total	3.3227078	1.9371625	48

Al graficar los datos:

1. CAJAS DE TUKEY:



2. GRAFICOS DE BARRAS DE ERROR:



El empaque 1 (al vacío) presenta significativamente menores recuentos de enterobacterias que el empaque 2 (tradicional).