



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**  
**Facultad de Química**

**EFFECTO DE TRATAMIENTOS DE PRESIÓN HIDROSTÁTICA ULTRA ALTA SOBRE  
LA MICROBIOTA DE CARNE FRESCA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
QFB LILA LUBIANKA DOMÍNGUEZ RAMÍREZ**

**TUTOR PRINCIPAL**  
**Dra. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE**  
**FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**  
**Dra. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH**  
**FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**Dra. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**MÉXICO, D. F. MAYO, 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

## Índice General

Índice.....	i
Índice de Tablas.....	iv
Índice de Figuras.....	vi
Agradecimientos y Dedicatoria.....	vii
Resumen.....	xi
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	4
2.1 La Carne.....	4
2.2 Microbiología de la carne roja (ganado bovino).....	6
2.2.1 Microorganismos relacionados con la descomposición.....	7
2.2.2 Microorganismos patógenos.....	10
2.3 Métodos de Conservación de Alimentos.....	11
(a) Control de la Temperatura.....	12
▶ <u>Tratamientos térmicos</u> .....	12
<u>Pasteurización</u> .....	13
▶ <u>Bajas temperaturas</u> .....	13
<u>Refrigeración</u> .....	13
<u>Congelación</u> .....	15
(b) Control de humedad.....	15
▶ <u>Deshidratación</u> .....	15
<u>Secado</u> .....	16
▶ <u>Curado y ahumado</u> .....	16
(c) Inhibición directa.....	17
▶ <u>Irradiación</u> .....	17
<u>Luz Ultravioleta</u> .....	17
<u>Radiación Ionizante</u> .....	18
▶ <u>Atmósfera modificada</u> .....	19
2.3.1 Métodos no térmicos.....	21
<i>Campos eléctricos pulsados (CEP) de alto voltaje</i> .....	21
<i>Campos magnéticos oscilantes (CMO)</i> .....	22
<i>Efectos fotodinámicos (luz blanca de alta intensidad)</i> .....	22
2.3.2 Presión Hidrostática Ultra Alta.....	23
2.3.2.1 Métodos de Tratamiento con Presión Hidrostática Ultra Alta.....	26
2.3.2.2 Efecto sobre los microorganismos.....	28
2.3.2.3 Otras perspectivas para el uso de Presión Hidrostática Ultra Alta.....	31
2.4 Metodologías para la evaluación de la calidad microbiológica de la carne.....	32
2.4.1 Método tradicional, Cuenta de células viables.....	32
2.4.2 Método molecular, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	34
2.5 Metodologías para la evaluación de la modificación de la microbiota de la carne.....	35
2.5.1 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).....	35
2.5.2 Identificación de bacterias: Sistema Vitek® 2.....	36
2.6 Evaluación colorimétrica de la carne.....	37

3. Justificación.....	40
4. Hipótesis.....	42
5. Objetivos.....	42
a) Objetivo general.....	42
b) Objetivos particulares.....	42
6. Materiales y Métodos.....	43
6.1 Muestras y condiciones de trabajo.....	43
6.2 Efecto de los tratamientos en la eliminación de bacterias patógenas.....	46
6.2.1 Reactivación de cepas puras.....	47
6.2.2 Estandarización del inóculo.....	48
6.2.3 Inoculación de la muestra de carne.....	49
6.3 Pruebas de reto para patógenos.....	50
6.3.1 Método tradicional.....	50
6.3.1.1 Procesamiento de las muestra de carne para cuenta en placa.....	50
6.3.2 Método molecular.....	50
6.3.2.1 Procesamiento de las muestra de carne para enriquecimiento celular.....	50
6.3.2.2 Extracción de DNA mediante el kit Fast ID (Fast ID/DNA extraction kit; Genetic ID NA, Inc., Iowa, EE. UU.).....	51
6.3.2.3 Electroforesis horizontal (gel de agarosa).....	53
6.3.2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	53
6.4 Efecto de los tratamientos sobre la microbiota nativa.....	54
6.4.1 Método tradicional.....	55
6.4.1.1 Cuenta en placa.....	55
6.4.1.2 Identificación utilizando el sistema Vitek® 2.....	56
6.4.1.2.1 Muestras y aislamiento.....	56
6.4.1.2.2 Identificación de los aislados.....	58
6.4.2 Método molecular.....	58
6.4.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa región V3, gen 16S rRNA.....	58
6.5 Efecto de los tratamientos en el pH.....	60
6.6 Efecto de los tratamientos en el color de la carne fresca.....	60
7. Resultados y discusión.....	62
7.1 Efecto de la PHUA en la eliminación de bacterias patógenas.....	62
7.1.1 Efecto de la PHUA sobre <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	62
7.1.1.1 Cuantificación de la inactivación.....	62
7.1.1.1.1 Estandarización del inóculo de <i>S.</i> <i>Typhimurium</i> .....	62
7.1.1.1.2 Evaluación y selección de método de inoculación: micropipeta contra jeringa hipodérmica.....	63
7.1.1.1.3 Efecto de la PHUA y los procesos asociados en la inactivación de <i>S. Typhimurium</i> .....	64
7.1.1.2 Detección de <i>S. Typhimurium</i> mediante una reacción de PCR con oligos específicos.....	68

7.1.2 Efecto de la PHUA sobre <i>Listeria monocytogenes</i> .....	69
7.1.2.1 Cuantificación de la inactivación.....	69
7.1.2.1.1 Estandarización del inóculo de <i>L. monocytogenes</i> .....	69
7.1.2.1.2 Efecto de la PHUA y los procesos asociados en la inactivación de <i>L. monocytogenes</i> .....	70
7.1.2.2 Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante una reacción de PCR con oligos específicos.....	72
7.2 Comparación del efecto de la presurización con 345 MPa por 1 minuto sobre <i>S. Typhimurium</i> y <i>L. monocytogenes</i> .....	73
7.3 Efecto de la PHUA sobre la microbiota nativa de la carne fresca.....	75
7.3.1 Efecto de los tratamientos en el pH de la carne.....	75
7.3.2 Evaluación de la microbiota nativa por medio de Método tradicional.....	76
7.3.2.1 Cuantificación de la inactivación de la microbiota nativa.....	76
7.3.2.2 Obtención e identificación de cepas aisladas de diferentes muestras de carne por medio del sistema Vitek®.....	80
7.3.3 Evaluación de la microbiota nativa por medio de PCR-DGGE.....	85
7.3.3.1 PCR gen 16S rRNA, región V3.....	85
7.4 Efecto de los tratamientos en el color de la carne fresca.....	87
7.4.1 Registro fotográfico.....	87
7.4.2 Análisis colorimétrico.....	89
8. Conclusiones.....	94
9. Perspectivas.....	96
10. Biblioherografía.....	97
Anexo.....	107
Análisis estadístico.....	107

---

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b>	Composición química del músculo típico de un bovino adulto después del <i>rigor mortis</i> .....	4
<b>Tabla 2.</b>	Géneros de bacterias encontradas en carnes.....	9
<b>Tabla 3.</b>	Métodos de conservación de la carne y productos cárnicos.....	12
<b>Tabla 4.</b>	Principales efectos de la PHUA sobre la microbiota en alimentos.....	28
<b>Tabla 5.</b>	Muestras de trabajo.....	44
<b>Tabla 6.</b>	Condiciones de presión y temperatura utilizadas durante la operación del equipo.....	45
<b>Tabla 7.</b>	Cinética de cambio de presión y cambio de temperatura.....	46
<b>Tabla 8.</b>	Oligonucleótidos (oligos) especie-específicos.....	54
<b>Tabla 9.</b>	Condiciones de la reacción de PCR para: <i>Salmonella</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> .....	54
<b>Tabla 10.</b>	Concentración de reactivos utilizados en la reacción de PCR.....	54
<b>Tabla 11.</b>	Colonias seleccionadas para aislamiento.....	57
<b>Tabla 12.</b>	Oligos utilizados para la evaluación de las modificaciones en la microbiota nativa.....	59
<b>Tabla 13.</b>	Condiciones de la reacción de PCR para Agc338f-B518R.....	59
<b>Tabla 14.</b>	Concentración de reactivos utilizados en la reacción de PCR para Agc338f-B518R.....	59
<b>Tabla 15.</b>	Condiciones de análisis en la evaluación instrumental del color.....	60
<b>Tabla 16.</b>	Estandarización del inóculo, <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	62
<b>Tabla 17.</b>	Resultados de cuenta en placa, métodos de inoculación artificial de carne.....	63
<b>Tabla 18.</b>	Efecto de la aplicación de diferentes combinaciones de procesos (vacío, presurización con 172 MPa o 345 MPa y refrigeración) en la cuenta de <i>S. Typhimurium</i> inoculada en cuentas altas y bajas en muestras de carne fresca (Sirloin).....	65
<b>Tabla 19.</b>	Estandarización del inóculo, <i>Listeria monocytogenes</i> .....	70
<b>Tabla 20.</b>	Efecto de la aplicación de diferentes combinaciones de procesos (345 MPa, vacío y refrigeración) en la cuenta de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en cuentas altas y bajas en muestras de carne fresca (Sirloin).....	70
<b>Tabla 21.</b>	Comparación del efecto de los diferentes tratamientos (R, VR, VPF, VPR; presión de 345 MPa) en la disminución de las cuentas de <i>S. Typhimurium</i> y <i>L. monocytogenes</i> .....	74
<b>Tabla 22.</b>	Modificación del pH en diferentes muestras.....	76
<b>Tabla 23.</b>	Resultado de cuenta en placa para diferentes grupos microbianos para muestras de carne sometidas a diferentes combinaciones de procesos, evaluando 345 MPa.....	77
<b>Tabla 24.</b>	Comparación del efecto de los diferentes tratamientos (R, VR, VPF, VPR; presión de 345 MPa) en la disminución de unidades logarítmicas de bacterias (UFC g <sup>-1</sup> ).....	80
<b>Tabla 25.</b>	Colonias seleccionadas para aislamiento e identificación utilizando el sistema Vitek® 2.....	81
<b>Tabla 26.</b>	Identificación por medio del sistema Vitek® 2 de aislados obtenidos de muestras de carne sometidas a diferentes procesos (refrigeración, empacado al vacío, presurización).....	81
<b>Tabla 27.</b>	DNA seleccionado para efectuar PCR-DGGE.....	86
<b>Tabla 28.</b>	Modificación de los parámetros de color del sistema CIE L*a*b* y valor del cambio total del color.....	90
<b>Tabla 29.</b>	Comparación del cambio total del color ( $\Delta E^*$ ) por efecto de los tratamientos evaluados.....	92
<b>Tabla 30.</b>	Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la disminución de unidades logarítmicas de <i>Salmonella</i> Typhimurium considerando las dos variables implicadas: Presión (172 MPa y 345 MPa) y concentración (alta $\alpha$ y baja $\beta$ ).....	107
<b>Tabla 31.</b>	Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la disminución de unidades logarítmicas considerando las tres variables implicadas: Tratamiento (R, VR,	

---

	VPF, VPR), microorganismo ( <i>S. Typhimurium</i> , <i>L. monocytogenes</i> ) y concentración (alta $\alpha$ y baja $\beta$ ).....	107
<b>Tabla 32.</b>	Prueba de Duncan para la comparación del efecto de los diferentes tratamientos (R, VR, VPF, VPR, presión de 345 MPa) en la disminución de las cuentas de <i>S. Typhimurium</i> y <i>L. monocytogenes</i> .....	108
<b>Tabla 33.</b>	Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la disminución de unidades logarítmicas considerando las dos variables implicadas: Tratamiento (R, VR, VPF, VPR) y grupo microbiano (Mesófilos, Psicrótrofos, BAL, Enterobacterias, <i>Pseudomonas</i> sp.).....	109
<b>Tabla 34.</b>	Prueba de Duncan para la comparación del efecto de los Tratamientos (R, VR, VPF, VPR) en la disminución de unidades logarítmicas de bacterias (UFC g <sup>-1</sup> ).....	109
<b>Tabla 35.</b>	Prueba de Duncan para la comparación del efecto en la disminución de unidades logarítmicas de bacterias (UFC g <sup>-1</sup> ; Mesófilos, Psicrótrofos, BAL, Enterobacterias, <i>Pseudomonas</i> sp.).....	110
<b>Tabla 36.</b>	Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el cambio total del color ( $\Delta E^*$ ) considerando la variable Tratamiento (R, VR, VPF, VPR).....	110
<b>Tabla 37.</b>	Prueba de Duncan para la comparación del cambio total del color ( $\Delta E^*$ ) por efecto de los tratamientos evaluados.....	111
<b>Tabla 38.</b>	Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la modificación del pH considerando la variable Tratamiento (R, VR, VPF, VPR).....	111

---

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Modificación del color de la carne de acuerdo al estado de oxidación de la mioglobina.....	5
<b>Figura 2.</b> Modificación del color de carne de res después de ser sometida a diferentes presiones.....	25
<b>Figura 3.</b> Principios de funcionamiento de la presión directa y de la presión indirecta.....	27
<b>Figura 4.</b> Ejemplo del equipo utilizado para el proceso semi-continuo.....	28
<b>Figura 5.</b> Cassette de identificación utilizado por el sistema Vitek® 2.....	36
<b>Figura 6.</b> Análisis instrumental del color. A. Representación de los ángulos de visión que utiliza el detector del colorímetro. La fovea es la zona de la retina donde se enfocan los rayos luminosos, especializada en la visión del color. B. Fundamento del colorímetro.....	38
<b>Figura 7.</b> Representación de las coordenadas del color con el sistema.....	39
<b>Figura 8.</b> Diagrama de flujo del procedimiento experimental. Las muestras R, VR y VPR fueron refrigeradas a 4°C durante 5 días. Cabe mencionar que para poder presurizar es indispensable empacar el producto al vacío.....	43
<b>Figura 9.</b> Esquema de trabajo para evaluar el efecto de la PHUA en la eliminación de bacterias patógenas.....	47
<b>Figura 10.</b> Esquema de trabajo para evaluar el efecto de la PHUA sobre la microbiota nativa de la carne.....	55
<b>Figura 11.</b> Efecto de los tratamientos en la inactivación de <i>Salmonella</i> Typhimurium con 172 y 345 MPa de presión durante 1 minuto a temperatura ambiente.....	67
<b>Figura 12.</b> Ejemplo de gel de agarosa con el producto de PCR obtenido utilizando oligos específicos para <i>Salmonella</i> spp.....	69
<b>Figura 13.</b> Efecto de los tratamientos en la inactivación de <i>Listeria monocytogenes</i> con 345 MPa de presión durante 1 minuto a temperatura ambiente.....	71
<b>Figura 14.</b> Ejemplo de gel de agarosa con el producto de PCR obtenido utilizando oligos específicos para <i>Listeria monocytogenes</i> .....	73
<b>Figura 15.</b> Efecto de los tratamientos en la inactivación de <i>S. Typhimurium</i> y <i>L. monocytogenes</i> con 345 MPa de presión durante 1 minuto a temperatura ambiente.....	75
<b>Figura 16.</b> Modificaciones de la microbiota nativa en muestras de carne sometidas a diferentes procesos, $\pm$ DS resultado de 3 réplicas.....	77
<b>Figura 17.</b> Ejemplo de gel de electroforesis obtenido de los ensayos para la estandarización de la PCR de V3, 16S rRNA con los oligos Agc338f, B518R.....	85
<b>Figura 18.</b> Ejemplo de gel de electroforesis obtenido del ensayo con las condiciones óptimas para la PCR de V3, 16S rRNA con los oligos Agc338f, B518R.....	86
<b>Figura 19.</b> Efecto de los tratamientos evaluados en el color de la carne.....	88
<b>Figura 20.</b> Ejemplo del aspecto de algunas muestras de carne sometidas al tratamiento con PHUA.....	88
<b>Figura 21.</b> Aspecto de las muestras de carnes utilizadas para el análisis colorimétrico.....	89
<b>Figura 22.</b> Modificación de los parámetros del color evaluados con el sistema CIE L*a*b* por efecto de los tratamientos.....	90



---

## ☞ Agradecimientos y Dedicatoria ☜

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 324 del departamento de Alimentos y Biotecnología en el Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM bajo la tutoría de la Dra. Carmen Wachter Rodarte.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado la beca para Estudios de Posgrado y al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT-DF) por el proyecto PICS08-42 “Efecto de las altas presiones isoestáticas sobre la calidad integral de la carne de bovino” del cual forma parte este trabajo.

Gracias a todas las personas que de una u otra forma estuvieron ahí conmigo, contribuyendo de forma directa e indirecta en la realización de este proyecto de Maestría, contribuyendo con en el aprendizaje, el crecimiento y el fortalecimiento de quien soy.

Un especial agradecimiento a la Dra. Carmen por su consejo e instrucción. Realmente agradezco la confianza depositada en mí al aceptarme como alumna de Posgrado para la Maestría y, ahora, para el Doctorado. Gracias por su paciencia, sus comentarios, el conocimiento compartido, el apoyo y las palabras de aliento.

Gracias a mi Comité Tutor: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch y Dra. Romina Rodríguez por sus comentarios, sugerencias, las evaluaciones, las preguntas y recomendaciones hechas para mejora y para el progreso de este proyecto y de mí como estudiante, aspirante a investigador y para desarrollar mi sentido crítico y analítico.

Igualmente, un agradecimiento al Dr. Alberto Tecante Coronel por permitirme ser parte del proyecto ICyT-DF, PICS08-42 y por permitirme el uso del equipo de Alta Presión Hidrostática del laboratorio 313 del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM así como a la I. A. Mariana Ramírez Gilly por enseñarme el modo de operarlo y ayudarme con el procesamiento de las muestras.

Agradezco también a la Dra. Patricia Severiano Pérez del laboratorio 4D del Edificio A de la Facultad de Química por permitirme el uso del equipo de colorimetría utilizado para evaluar las modificación del color en las diferentes muestras de carne y también gracias por su tiempo al ayudarme y enseñarme a efectuar las lecturas y el manejo del equipo.

---

Al Dr. Carlos Alberto Eslava Campos del Departamento de Salud Pública del Posgrado de Medicina le agradezco su ayuda para la identificación de las bacterias aisladas de diferentes muestras de carne por medio del Sistema Vitek® 2, así como al Departamento de Microbiología por el facilitarnos su uso en el Anexo del laboratorio 1B del Edificio A de la Facultad de Química. Gracias también a Paloma por ayudarme e instruirme en la preparación adecuada de las muestras para su análisis.

Un agradecimiento también a la Dra. Rebeca Ramírez Carrillo por su gran y valiosa ayuda para efectuar el análisis estadístico, por su tiempo y el enseñarme y el facilitarme el acceso y uso del programa SPSS.

Muchas gracias a mis sinodales: Dra. Teresita Sainz de la UAM Xochimilco, Dra. Edith Ponce de la UAM Iztapalapa, Dra. Amelia Farrés y Dr. Francisco Ruiz Terán de la Facultad de Química de la UNAM y Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco de la Facultad de Medicina de la UNAM. Gracias por su valioso tiempo, por el apoyo prestado al revisar este trabajo, por todos los comentarios y sugerencias y por el conocimiento compartido para mejorar la calidad de este escrito, de mi proyecto y por contribuir a reforzar mis sentidos crítico y analístico así como mi curiosidad y mis deseos de aprender siempre algo nuevo.

Gracias también a la Dra. Gloria Ruíz por las revisiones y las sugerencias planteadas para este trabajo, y junto con la Biol. Teresa Flores, gracias por su apoyo y la ayuda prestada. Les agradezco de corazón por la retroalimentación, son una excelente ayuda y contribuyen a mejorar constantemente.

También, con mucho cariño, gracias a los amigos y compañeros del laboratorio 324 quienes han estado muy próximos a mí a lo largo de este tiempo. Gracias a Bárbara y a Marisol por ser, ahora, tan cercanas a mí y tan buenas amigas. Gracias a Betty quien me enseñó a trabajar con la carne, Arely, Karina, Carlos, Israel, Sandra y Gris, David Zayas, David Hernández y Adalberto por la compañía, las risas y la diversión en el laboratorio.

Claro está, ¡un gran agradecimiento a mis amigos del corazón! Mis mejores amigos: Gabi, Lalo y Rocío, muchas gracias por seguir ahí conmigo, por los buenos y malos momentos, por las risas, los cafés, los chismes, las salidas, las excursiones, las charlas y todo eso que hace que sean tan geniales para mí. ¡Gracias por ser mis amigos! ¡Gracias, gracias, gracias!

---

Un agradecimiento también a mis nuevos amigos por haberle dado más sabor a mi experiencia durante mi último semestre de Maestría, por todos los momentos compartidos y las risas en francés: Leslie, Naomi, Jessica y Juan Manuel. Merci beaucoup mes amis!

También y de forma muy especial, un agradecimiento a mi mamá por haberme dado su apoyo durante mis estudios, por la enorme paciencia que me tiene, realmente eso es heroico (lo admito, no soy fácil de tratar). Por ti y para ti, siempre mi mayor esfuerzo.

Ludmila, Lenin, Paulina, el pequeño Jules que son mi familia, mis modelos, los quiero mucho-mucho al igual que al lindo gatito Alfonso. Ustedes también me inspiran.

Gracias a mis niñas: Piraña, Frambuesa y a la pequeña Corazón...ayudan a que las cosas resulten más desesperantes y caóticas en casa que por contraste hacen que las dificultades del proyecto, los experimentos, la universidad y demás cosas sean nimiedades. Jajaja, ¡las quiero! Y son una excelente terapia anti-estrés a pesar de todo, mis mejores amigas.

Expreso mi gratitud a mis hermanas, mis queridas brujitas, por ayudarme también a crecer. Zuhari por ser una excelente maestra, a Lilia y a Paty, Angy, a María Milher y a Mildred también. A Avalon va mi agradecimiento porque también ha contribuido a que yo esté aquí y ahora con un corazón renovado. Igualmente, porque contribuyen a dar nuevos aires y nueva inspiración a lo que hago y planear y proyectar mi trabajo para el futuro. Un abrazo a Regina de las Hadas, yo tu hada madrina te hago partícipe con el don de la curiosidad y la resolución para buscar y encontrar respuestas y maravillarte siempre con tus descubrimientos. Con tus pequeños pasitos también irás construyendo el futuro.

Gracias, gracias, gracias a todos ustedes por su colaboración que ha dado como fruto esta Tesis y me ha ayudado a crecer y seguir caminando en este planeta escuela, feliz y disfrutando cada momento siendo yo misma y descubriéndome a mí misma.

Mi familia y mis amigos son la inspiración, la alegría, la curiosidad y la creatividad que me llena día con día.

Este trabajo está dedicado a todas estas grandes personas de las cuales siempre aprendo algo nuevo.

---

*“Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo,  
involúcrame y lo aprendo.”*  
-Benjamín Franklin

♥ ¡Gracias a todos! ♥  
Mi familia, mis amigos mis maestros.  
Feliz encuentro, feliz partida, feliz reencuentro.  
)O(

*“Los sueños son las alas que te ayudarán a volar.”*

---

## Resumen

La Presión Hidrostática Ultra Alta (PHUA) ha mostrado ser de gran utilidad para mejorar la inocuidad de los alimentos sin afectar los nutrientes, sabor, aroma o frescura. En la actualidad existe una gran variedad de productos procesados a través de este tratamiento que se encuentran disponibles en diferentes países, sin embargo, no hay reportes de carne roja fresca conservada por este método. Como la carne es un alimento de gran demanda y con un periodo de vida útil corto, resulta relevante el saber si la PHUA puede ser un tratamiento alternativo eficiente para prolongar su conservación en refrigeración.

El efecto de la PHUA fue evaluado utilizando 345 MPa de presión durante 1 minuto, a temperatura ambiente, aplicándose a muestras de sirloin. Las muestras de carne corresponden a: carne fresca, carne refrigerada, carne empacada al vacío y refrigerada, carne empacada al vacío y presurizada y carne empacada al vacío, presurizada y refrigerada. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Listeria monocytogenes* fueron inoculados artificialmente previo a los tratamientos y su inactivación fue evaluada por medio de cuenta en placa, apreciándose diferencia significativa en la disminución de las cuentas de *S. Typhimurium* ( $P < 0.05$ ) al presurizar, siendo mucho más lábil al tratamiento respecto a *L. monocytogenes*. También se determinó la inactivación de la microbiota nativa: mesófilos y psicrótrofos (aerobios y anaerobios facultativos), bacterias ácido lácticas (BAL), enterobacterias y *Pseudomonas* spp. Se observó diferencia altamente significativa en la disminución de las cuentas bacterianas al tratar con PHUA y en el efecto del tratamiento sobre los diferentes grupos microbianos ( $P < 0.01$ ), siendo las enterobacterias y *Pseudomonas* spp. los más afectados. Así mismo, en las muestras sometidas a PHUA el crecimiento de mesófilos aerobios se mantuvo por debajo de lo estipulado por la NOM-034-SSA1-1993, considerándose como referencia de buena calidad microbiana. El grupo microbiano menos afectado por los tratamientos corresponde a las BAL.

De manera tal que este estudio muestra la posible contribución que la PHUA ofrece como método para preservar la carne fresca por más tiempo en refrigeración.

**Palabras clave:** Presión Hidrostática Ultra Alta, carne bovina fresca, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, microbiota nativa de la carne.

---

# Efecto de tratamientos de Presión Hidrostática Ultra Alta sobre la microbiota de carne fresca

## 1. Introducción

Desde el sacrificio del animal hasta la distribución y almacenamiento, la carne está sujeta a una manipulación constante por lo que es fácilmente colonizada por microorganismos ambientales. Además, al ser una matriz rica en agua y nutrientes se ve favorecido el desarrollo y mantenimiento de los microorganismos haciéndola un alimento perecedero.

Aunque la industria alimentaria cuenta con una gran variedad de métodos de conservación, la gran mayoría de éstos atentan contra parámetros sensoriales como el color, la textura y algunos nutrientes de la carne fresca. Además, para ser considerada *carne fresca* sólo puede haber sido refrigerada o empacada al vacío (o con atmósfera modificada) y refrigerada, así mismo, la refrigeración no debe prolongarse por más de 5 a 7 días [Warriss, 2003; USDA: [www.fsis.usda.gov/es/Refrigeracion/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/es/Refrigeracion/index.asp) (2010)] pues el deterioro se hace evidente. Actualmente, en busca de mejoras en la calidad sensorial y microbiana de los alimentos, han entrado en escena nuevas tecnologías para conservar los productos, en particular los métodos alternativos no térmicos, que buscan preservar sus cualidades en mejores condiciones por más tiempo.

Es el caso de la Presión Hidrostática Ultra Alta (PHUA). Este proceso no altera la forma del alimento, tampoco modifica las características funcionales y nutricionales del mismo ya que no afecta nutrientes termolábiles como vitaminas o los componentes responsables del sabor y del aroma (no afecta enlaces covalentes). Igualmente, el proceso es amigable con el ambiente, no genera residuos y es de bajo consumo energético [Cheftel, 1995; Téllez-Luis *et al.*, 2001; Picouet *et al.*, 2008; Hicks *et al.*, 2009]. Se trata de una técnica de conservación muy efectiva para aumentar la vida de anaquel en refrigeración, manteniendo la frescura e inocuidad [Fonberg-Broczen *et al.*, 2005; Heinz *et al.*, 2009].

Este método también responde a las demandas surgidas con la modificación de los hábitos de consumo de la población mundial. En la actualidad se buscan atributos como frescura, productos mínimamente procesados, que el alimento sea más sano y natural al disminuir o eliminar el uso de aditivos, que mantenga su inocuidad y que posean una larga vida de anaquel.

---

Estos cambios en los hábitos de consumo también han tenido efecto sobre las enfermedades vinculadas al consumo de ciertos productos, por ejemplo, la listeriosis. Esta enfermedad es de baja incidencia pero con un alto índice de mortalidad y ha sido asociada al consumo de carne (res, pollo, puerco), leche y quesos (principalmente productos no pasteurizados), entre otros [Farber & Peterkin, 1991; Kerr *et al.*, 1993; Chmielewski & Frank, 2003; Allan *et al.*, 2004; Norrung & Buncic, 2008; Rossi *et al.*, 2008; Jeyaletchumi *et al.*, 2010], afectando principalmente a personas inmunocomprometidas, adultos mayores y mujeres embarazadas. Así mismo, *Salmonella* spp. se encuentra dentro de los patógenos con mayor incidencia en infecciones asociadas al consumo de alimentos contaminados como carne y productos cárnicos [Norrung & Buncic, 2008; Rossi *et al.*, 2008].

En México se ha reportado la presencia de *Salmonella* spp. y de *Listeria monocytogenes* en carne de res y son, junto con *Yersinia* sp. y *Staphylococcus* sp., los principales agentes causantes de enfermedades transmitidas por alimentos a través de la carne o sus derivados [Estrada *et al.*, 2004; Rubio *et al.*, 2013]. *Salmonella* sp. y *L. monocytogenes* han sido detectadas en carnes nacionales y en carnes importadas de EE. UU. [Farber & Peterkin, 1991; Estrada *et al.*, 2004; Rubio *et al.*, 2013]. Particularmente Rubio y col. [2013] analizaron 90 muestras tanto nacionales como importadas procedentes de supermercados de Monterrey, Ciudad de México y Tabasco, representando las tres áreas geográficas comerciales más importantes del país (Norte, Centro y Sur); de las muestras analizadas el 27.7% dio positivo a la presencia de *L. monocytogenes* (nacionales e importadas) y el 8.8% a *Salmonella* spp. (sólo nacionales).

El efecto de la PHUA sobre patógenos como *Salmonella* sp. y *L. monocytogenes* entre otros, ha sido también ampliamente estudiado en una gran variedad de matrices alimentarias con resultados favorables para avalar su uso como método de conservación de calidad [Fonberg-Broczek *et al.*, 2005; Aymerich *et al.*, 2008; Escriu & Mor-Mur, 2009; Sun & Holley, 2010; Jofré *et al.*, 2010]. Y en los últimos años se ha dado un avance significativo en las nuevas tecnologías con grandes progresos con los nuevos equipos, logrando una exitosa comercialización de muchos productos cárnicos procesados (jamones, salchichas, salamis, productos listos para el consumo, etc.) tratados con PHUA. También se destaca el hecho de que deben aplicarse los estudios necesarios para estandarizar el proceso para cada nuevo producto. De esta manera encontrar las condiciones adecuadas para conseguir la eliminación de patógenos y disminuir las cuentas de la microbiota nativa asociada, la cual posee un papel importante en la descomposición,

---

sin afectar seriamente las características sensoriales del producto o las cualidades más apreciadas por el consumidor.

Por este motivo es necesario estudiar y evaluar la respuesta de cada alimento ante diferentes condiciones de presión y tiempo de presurización, porque de ello dependerá la eliminación de la microbiota nativa del alimento o la disminución en las cuentas microbianas. Igualmente, habrá alimentos que no sean aptos para este proceso o que alguna de sus cualidades, como textura o color, resulte afectada.

La PHUA tiene efectos importantes sobre la estructura cuaternaria y terciaria de proteínas, afectando la estabilidad de interacciones no covalentes como fuerzas electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, etc. En el caso de la carne (roja) fresca al ser sometida a presiones mayores a 400 MPa la mioglobina ferrosa (deoximioglobina:  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}$  u oximioglobina:  $\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$ ) cambia su conformación de manera que pasa a estado de mioglobina férrica (metamioglobina:  $\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$ ) sufriendo una desnaturalización que modifica su color habitual [Hugas *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2003; Picouet *et al.*, 2008]. Igualmente, al empacar al vacío la mioglobina queda en su estado de deoximioglobina y proporciona un color purpúreo a la carne [Varnam & Sutherland, 1995; Grèbol, 2004]. Ambos procesos no tienen más efecto que un cambio en la apariencia del producto, aunque el color rojo cereza brillante es uno de los criterios más importantes para el consumidor al momento de la compra (decisivo para aceptar o rechazar el producto). Cabe mencionar que esta modificación deja de ser evidente después de ser cocida y no presenta diferencia con respecto a carne que ha sido refrigerada o carne fresca cocidas bajo las mismas condiciones [Jung, *et al.*, 2003; Picouet *et al.*, 2008].

Hay que hacer notar que se ha mostrado que los consumidores estarían dispuestos a adquirir carne y otros productos presurizados si se les informa sobre los beneficios del uso de estas nuevas tecnologías y las mejoras en la calidad y seguridad del producto, incluso pagando un monto adicional [Hicks *et al.*, 2009]. Además ya existen en el mercado una amplia variedad de productos, no solamente cárnicos, cuya demanda va en aumento. Países como Japón, Alemania, Australia, España, Estados Unidos, Francia, Italia y Reino Unido son algunos de los países donde se comercializan productos en los que se aplica esta tecnología [Grèbol, 2004; Herrero *et al.*, 2006].



---

## 2. Antecedentes

### 2.1 La Carne

La carne roja<sup>1</sup> corresponde a partes comestibles de mamíferos domésticos como bovinos, cabras, ovejas, etc. Está formada por músculo esquelético y puede incluir o no grasa, tejido conectivo u órganos internos como hígado, riñones, cerebro, corazón, estómago [NOM-009-ZOO-1994<sup>2</sup>; Adams & Moss, 1997].

La carne procedente de ganado bovino contiene gran cantidad de aminoácidos esenciales en sus proteínas, contiene vitaminas del grupo B (B1, B2, B3, B6), vitaminas A, C, D, E, fósforo, calcio, entre otros elementos (tabla 1) [Lawrie, 1998].

**Tabla 1. Composición química del músculo típico de un bovino adulto después del *rigor mortis***

	% en peso
Agua	75.00
Proteínas	19.00
Lípidos	2.50
Carbohidratos:	1.20
Ácido láctico	0.90
Glucógeno	0.10
Glucosa e intermediarios glucolíticos	0.20
Nitrógeno no proteico soluble	1.65
Inorgánicos:	0.65
Fósforo total soluble	0.20
Potasio	0.35
Sodio	0.05
Magnesio	0.02
Otros metales	0.23

[Adaptado de: Lawrie, 1998].

Existe una amplia variedad de cortes de bovino que se cotizan a un alto precio en el mercado y que además poseen una gran demanda. Así que es importante el conocer los atributos sensoriales de la carne roja puesto que de estas características dependerá la aceptación o el rechazo por el consumidor [Escamilla, 2006].

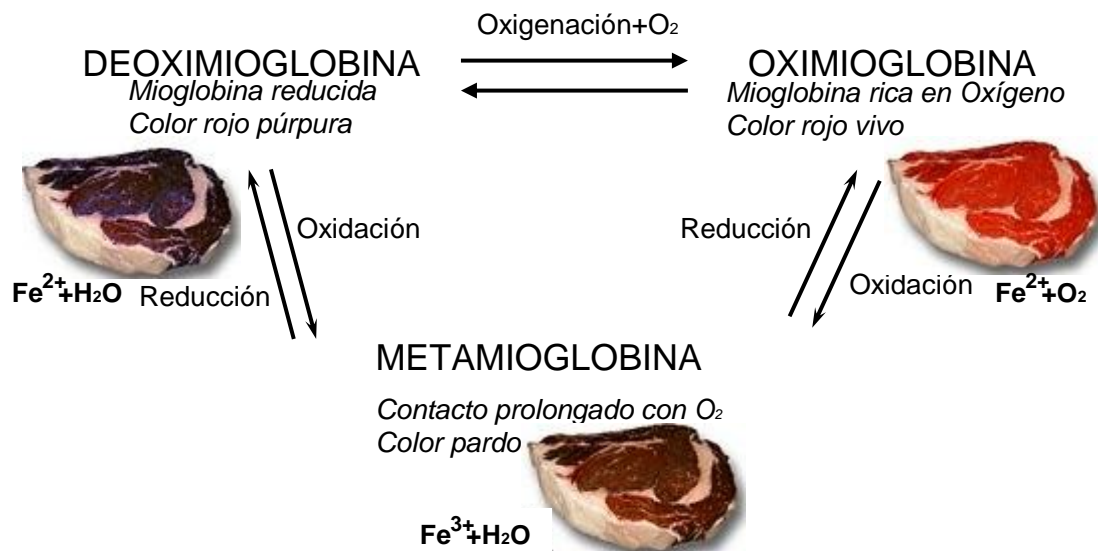
Las características sensoriales de la carne son:

---

<sup>1</sup> Para fines de este proyecto, la carne roja corresponde a músculo esquelético con bajo contenido en grasa (carne magra).

<sup>2</sup> NOM-009-ZOO-1994. PROCESO SANITARIO DE LA CARNE.

- Color. Rojo cereza<sup>3</sup>. Éste depende de la edad del animal, sexo, hábitat, alimentación, actividad, función del músculo, exposición al aire y grado de maduración de la carne. A nivel químico, depende de la concentración y estado de oxidación de la mioglobina<sup>4</sup> (figura 1) presente en el músculo [Varnam & Sutherland, 1995].



**Figura 1.** Modificación del color de la carne de acuerdo al estado de oxidación de la mioglobina.

- Olor. Ligeramente a ácido láctico.
- Sabor, ternura y jugosidad.

De los atributos sensoriales destaca el color porque en los humanos la primer impresión se da por medio del sentido de la vista [Hui *et al.*, 2006]. De hecho, este atributo tiende a verse afectado después de aplicar algunos métodos de conservación, siendo que el principal objetivo de estos tratamientos es manipular las condiciones ambientales para inhibir o disminuir el desarrollo microbiano, también se busca evitar en la medida de lo posible la pérdida de peso y la modificación de la apariencia del producto además del color, también el sabor y la textura. Los más usados como la congelación y la refrigeración suelen tener un serio impacto tanto a nivel fisicoquímico como a nivel sensorial de la carne.

<sup>3</sup> Diferentes tonalidades de rojo: gris rojizo, rojizo clero, rojizo oscuro, rojo cereza (es el color idóneo), rojo brillante, rojo fuerte, rojo oscuro [Sanz, 1976].

<sup>4</sup> Oximioglobina, proporciona el color rojo brillante que es deseable en la carne fresca; metamioglobina, pigmento color café, su formación es la causa principal de la modificación del color de la carne; sulfomioglobina, pigmento de color verde resultado de la interacción entre sulfuro de hidrógeno y la mioglobina [Varnam & Sutherland, 1995]. La mioglobina en estado nativo como deoximioglobina proporciona una coloración púrpura.

---

La carne fresca posee un  $A_w^5$  de 0.98-0.99, esto y la abundancia de nutrientes hacen de la carne un medio muy adecuado para el mantenimiento del crecimiento microbiano, particularmente en la superficie (por estar en contacto con el medio ambiente), siendo así un alimento perecedero.

Cuando el animal es sacrificado, se interrumpe el suministro de oxígeno al músculo, el potencial redox (Eh) disminuye y la respiración se detiene pero el desdoblamiento glucolítico continúa, así se genera la acumulación de ácido láctico que lleva a un descenso del pH, originalmente de 7 a un pH de 5.5 a 5.7 después del *rigor mortis* [Ingram & Simonsen, 1980; Rosset, 1994; Adams & Moss, 1997; Board, 1998; Jackson *et al.*, 2001]. Es verdad que este pH ácido protege a la carne en cierta medida del desarrollo microbiano, pero puede ser colonizada por algunos tipos de bacterias que pueden contribuir de forma importante en su deterioro, éstas pueden ser parte de la microbiota nativa o contaminación e incluso patógenos.

## 2.2 Microbiología de la carne roja (ganado bovino)

Aunque se considera que el músculo esquelético es estéril, no así la superficie del animal que puede ser contaminada con microorganismos procedentes del aire, agua o suelo. La microbiota normal de la piel del animal incluye bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, así como levaduras y hongos filamentosos [Ingram & Simonsen, 1980].

Los microorganismos que afectan la carne llegan a ella por la infección del animal *in vivo* (contaminación endógena) o por invasión *post-mortem* (contaminación exógena). Aunque es difícil que la contaminación sea atribuida a la enfermedad del animal ya que se cuenta con regulación sanitaria que especifica la inspección antes del sacrificio. Igualmente, después del sacrificio, los animales, canales<sup>6</sup>, órganos y tejidos son sometidos a un examen macroscópico y de ser necesario a examen microscópico y/o bacteriológico [NOM-009-ZOO-1994]. De modo que la contaminación se da *post-mortem*.

---

<sup>5</sup>  $A_w$ . Potencial del agua o actividad del agua. Queda definido como la presión de vapor del agua de un alimento con respecto a la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura [Board, 1998]. Así, la cantidad de agua de un alimento tendrá gran influencia en su estabilidad química y microbiológica, cuanto más elevado sea (~1) más intenso el desarrollo microbiano [Rosset, 1994].

<sup>6</sup> Canal. Corresponde al cuerpo del animal desprovisto de piel, cabeza, vísceras y patas [NOM-009-ZOO-1994].

---

Las zonas más densamente colonizadas como la piel y el tracto gastrointestinal pueden ser la principal fuente de contaminación que puede ocurrir después del sacrificio, durante las diferentes fases de procesamiento de la canal.

El número de microorganismos en muestras de tejido tomadas en condiciones asépticas antes del procesamiento de la canal es menor a 10 UFC/kg [Adams & Moss, 1997]. Al término de la formación de la canal, en condiciones higiénicas, el conteo de microorganismos en la superficie alcanza los:  $10^3$  a  $10^5$  bacterias/cm<sup>2</sup>, menos de  $10^2$  psicrófilos/cm<sup>2</sup> y de  $10^1$  a  $10^2$  coliformes/cm<sup>2</sup> [Ingram & Simonsen, 1980; Warriss, 2003].

Después del procesamiento de la canal pueden llegar a cuantificarse de  $10^1$  a  $10^5$  UFC/cm<sup>2</sup>, principalmente mesófilos [Ingram & Simonsen, 1980; Johnston & Tompkin, 1992; Rosset, 1994; Adams & Moss, 1997]. Igualmente llegan a encontrarse contaminantes psicrótrofos<sup>7</sup> provenientes del ambiente, principalmente bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Moraxella* [Johnston & Tompkin, 1992; Ellis & Goodacre, 2006].

Los microorganismos que pueden encontrarse en el alimento pueden agruparse como: responsables de alteraciones, patógenos, tolerables y benéficos (p. ej. en fermentaciones) [Nychas & Drosinos, 1999; Ellis & Goodacre, 2006].

### **2.2.1 Microorganismos relacionados con la descomposición**

La calidad de un producto así como su vida de anaquel dependen en gran medida del contenido y las características de los microorganismos contaminantes.

Cuando un alimento se altera sus características resultan perjudicadas, de tal manera que ya no es aceptable. Las señales de deterioro comprenden la aparición de olores anormales (principalmente por el metabolismo de bacterias aerobias en la superficie), cambios de color y la aparición de manchas, modificación en la textura e incluso la formación de limo [Jackson *et al.*, 2001; Ellis & Goodacre, 2006].

---

<sup>7</sup> Psicrótrofos. Su temperatura mínima de crecimiento es de 0° C, no crecen a temperaturas mayores a 40° C y poseen una temperatura óptima de entre 20-30° C; crecen bien a temperatura de refrigeración [Tortora *et al.*, 2004].

---

Las alteraciones dependerán del número y del tipo de microorganismos, así como de las condiciones de almacenamiento. Los factores que pueden influir en el desarrollo de cierto tipo de microbiota en la carne son<sup>8</sup>:

- Factores físico-químicos y estructura de la carne (pH, Aw, presencia de antimicrobianos).
- Procesamiento.
- Factores que tienen influencia selectiva sobre el desarrollo (temperatura, humedad relativa, atmósfera gaseosa utilizada durante su empaque, distribución o almacenamiento).

La carne fresca se considera alterada cuando el número de bacterias es del orden de  $10^6$  bacterias/cm<sup>2</sup> [Rosset, 1994] y se considera que los primeros signos de putrefacción aparecen cuando las bacterias alcanzan cuentas del orden de  $10^7$  bacterias/cm<sup>2</sup> (mal olor) [Rosset, 1994; Varnam & Sutherland, 1995; Nychas & Drosinos, 1999; Warriss, 2003].

Cuando la carne es manejada en condiciones higiénicas, el número de patógenos es bajo y la microflora que posteriormente puede causar alteraciones consiste en especies psicrótrofas, en su mayoría bacilos gram-negativos y micrococos. Por ejemplo, bacterias de los géneros: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Igualmente se han reportado bacterias gram-positivas, principalmente *Micrococcus* spp. y *Staphylococcus* spp. y en números aún más bajos: bacterias ácido lácticas, *Brochothrix thermosphacta* y *Bacillus* [Ingram & Simonsen, 1980; Rosset, 1994; Warriss, 2003].

Bacterias psicrótrofas como *Pseudomonas* spp. predominan (es considerado el principal género asociado a la descomposición de la carne [Nychas & Drosinos, 1999; Warriss, 2003]), pero también destacan *Serratia liquefaciens* y *Alteromonas putrefaciens* [Labadie & Dousset, 1994; Nychas & Drosinos, 1999].

La putrefacción profunda, que ocurre entre 25 y 40°C, está caracterizada por el mal olor y el color verdoso de la carne. La alteración se da por la presencia de bacterias del género *Clostridium* como: *C. perfringens*, *C. histolyticum*, *C. sporogenes* [Rosset, 1994].

---

<sup>8</sup> Nychas & Drosinos, 1999.

**Tabla 2. Géneros de bacterias encontradas en carnes**

Género	Carne fresca	Carne procesada
<i>Acinetobacter</i>	xx	x
<i>Aeromonas</i>	xx	
<i>Alcaligenes</i>	x	
<i>Alteromonas</i>	x	x
<i>Arthrobacter</i>	x	x
<i>Bacillus</i>	x	x
<i>Bacteroides</i>	x	
<i>Brochothrix</i>	x	x
<i>Carnobacterium</i>	x	x
<i>Citrobacter</i>	x	
<i>Clostridium</i>	x	
<i>Corynebacterium</i>	x	x
<i>Enterobacter</i>	x	x
<i>Enterococcus</i>	xx	
<i>Escherichia</i>	x	
<i>Flavobacterium</i>	x	
<i>Hafnia</i>	x	
<i>Lactobacillus</i>	x	xx
<i>Leuconostoc</i>	x	x
<i>Listeria</i>	x	
<i>Micrococcus</i>	x	x
<i>Moraxella</i>	xx	
<i>Neisseria</i>	x	x
<i>Pediococcus</i>	x	x
<i>Proteus</i>	x	
<i>Pseudomonas</i>	xx	x
<i>Psychrobacter</i>	x	
<i>Serratia</i>	x	x
<i>Shewanella</i>	x	
<i>Streptococcus</i>	x	xx
<i>Streptomyces</i>	x	
<i>Staphylococcus</i>		x
<i>Vibrio</i>		x
<i>Yersinia</i>	x	

x reportado; xx frecuentemente reportado [Nychas & Drosinos, 1999; Ellis & Goodacre, 2006]

Entre los 10 y 25°C los microorganismos que participan en la descomposición pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y al género *Pseudomonas*, así como también *Lactobacillus*, *Brochothrix* y *Proteus*, pero en menor medida [Rosset, 1994; Jackson *et al.*, 2001]. Se observa la aparición de limo y de olores nauseabundos que corresponden a la putrefacción superficial y la carne se aprecia de un color marrón grisáceo.

Por debajo de los 10°C, en atmósfera seca, suelen predominar hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Thamnidium*, *Sporotrichum*, *Penicillium* y *Mucor*, así como levaduras como *Candida*, *Monilia* y *Rhodotorula* [Rosset, 1994; Ellis & Goodacre, 2006].

En países desarrollados, se han reportado varios géneros bacterianos asociados a la descomposición de la carne (Tabla 2).

También se presenta el caso de que ciertos microorganismos participan en la alteración de la carne pero al alcanzar ciertos niveles pueden ocasionar infección al ser ingerido el alimento (p. ej. *Salmonella*, *Clostridium*) o causar intoxicación (*Staphylococcus*, *Bacillus cereus*).

---

## 2.2.2 Microorganismos patógenos

Considerando entonces las posibilidades de que la carne pueda sufrir contaminación, para garantizar un abastecimiento del alimento salubre e inocuo hay que tener conocimiento sobre la ecología microbiana del mismo y los efectos de los tratamientos de conservación sobre ésta. Es de vital importancia reconocer que habrá microorganismos contaminantes que no solamente tengan efectos en la calidad de la carne, sino que también representan un peligro potencial para el consumidor.

La transmisión de bacterias patógenas al hombre a partir de la carne se puede dar de 3 formas<sup>9</sup>:

- Por la manipulación de productos contaminados, p. ej., *Bacillus anthracis*, *Rickettsia burnetti* (fiebre Q).
- Ingestión de patógenos (infección alimentaria). Es, por ejemplo, la infección por *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* y en ocasiones *Bacillus anthracis*. En la mayoría de estos casos, las condiciones higiénicas de producción y la inspección veterinaria descartan el peligro. También se pueden mencionar *Salmonella enterica* serovar Typhimurium<sup>10</sup>, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, como patógenos cuya presencia se ha reportado en carne [Ingram & Simonsen, 1980; Nychas & Drosino, 1999; Farkas, 2001; Warris, 2003; Ellis & Goodacre, 2006; Ercolini *et al.*, 2006].
- Intoxicación alimentaria. Claros ejemplos son aquellas bacterias productoras de toxinas como: *C. botulinum*, *C. perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* como *E. coli* O157:H7 [Ingram & Simonsen, 1980; Warriss, 2003; Ellis & Goodacre, 2006].

Es común encontrar coliformes fecales o estreptococos fecales cuando la apertura de la canal no se ha hecho de forma adecuada y estos microorganismos son indicativo de contaminación por contacto con el tracto gastrointestinal del animal [Ingram & Simonsen, 1980].

---

<sup>9</sup> Rosset, 1994.

<sup>10</sup> Para fines prácticos, en este proyecto *Salmonella enterica* serovar Typhimurium se denominará *Salmonella* Typhimurium.

---

Bacterias de los géneros *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Yersinia*, entre otros, pueden ser controlados en gran medida con una buena higiene y buena cocción de la carne antes de su consumo [Nychas & Drosinos, 1999], pero el uso de métodos de conservación adecuados también contribuye en la eliminación o disminución de la carga microbiana para mejorar la calidad del producto y prolongar su vida útil.

### 2.3 Métodos de Conservación de Alimentos

Los tratamientos o métodos de conservación se aplican a los alimentos con el objeto de<sup>11</sup>:

- Prevenir la alteración por causas mecánicas y contacto con animales como insectos.
- Retrasar los cambios químicos del alimento debido a causas enzimáticas o reacciones químicas (p. ej., la oxidación de grasas).
- Prevenir o retardar la descomposición microbiana del alimento.
  - a) Inhibiendo el desarrollo
  - b) Destruyendo los microorganismos
- Favorecer el crecimiento de microorganismos específicos que contribuyen en la conservación.

De esta manera se evitan pérdidas en la producción y se asegura un abasto continuo de alimento.

Así, la alteración de los alimentos puede retrasarse significativamente inhibiendo el crecimiento microbiano, lo cual puede conseguirse por inactivación irreversible o mediante la eliminación física de los microorganismos. Considerando esto, los métodos de conservación pueden agruparse como sistemas que destruyen microorganismos (bactericidas) o los que impiden el desarrollo (bacteriostáticos).

Al primer grupo pertenecen: ebullición, pasteurización, enlatado, ahumado, la adición de sustancias químicas, irradiación, etc. Dentro del grupo de bacteriostáticos: refrigeración, congelación, deshidratación.

---

<sup>11</sup> Board, 1998.



Igualmente, los principales métodos de conservación pueden basarse en: (a) control de la temperatura, (b) control de la humedad e (c) inhibición directa de los microorganismos (tabla 3). Dentro de este último grupo se encuentran también los llamados métodos no térmicos o alternativos, muchos de los cuales son nuevas tecnologías. Sin embargo, no todos estos métodos pueden ser aplicados a la carne fresca exitosamente pues pueden modificar seriamente sus cualidades sensoriales, con lo que pierde su *status* de carne fresca.

**Tabla 3. Métodos de conservación de la carne y productos cárnicos**

<b>Método de conservación</b>	<b>Principio</b>	<b>Mecanismos implicados</b>	<b>Biocida</b>	<b>Biostático</b>	<b>Reacciones enzimáticas</b>
<i>Refrigeración</i>	Control de la temperatura	Disminución de la velocidad de las reacciones	-	+	+
<i>Congelación</i>	Control de la temperatura	Inmovilización del agua	-	+	+
<i>Secado</i>	Control de la humedad	Deshidratación por evaporación	-	+	+
<i>Ahumado</i>	Control de la humedad e inh. directa	Fenoles y difenoles son los que poseen el efecto	+	+	+
<i>Irradiación</i>	Inhibición directa	Esterilización	+	-	+/-

+ Pertenece a la categoría; - No corresponde a la categoría.

En el caso de las reacciones enzimáticas, éstas disminuyen o quedan inhibidas.

#### (a) Control de la Temperatura

##### ➤ Tratamientos térmicos

El tratamiento con calor es el método de conservación más utilizado para destruir e impedir el desarrollo de microorganismos, así como inactivar enzimas. Son descritos comúnmente como pasteurización o esterilización [Olson & Nottingham, 1980].

El utilizar temperaturas por arriba de la temperatura máxima de crecimiento de un microorganismo puede causar lesiones subletales o la muerte. La exposición drástica y prolongada promueve un descenso en el número de microorganismos, favoreciendo la eliminación.

A pesar de sus ventajas y su eficacia, el exponer algunos alimentos al calor provoca modificaciones físicas y químicas, teniendo efecto negativo sobre sus propiedades

---

sensoriales y puede afectar los nutrientes termolábiles [Raventós, 2005]. Además, en el caso de alimentos sólidos se requieren tratamientos prolongados para que la temperatura sea homogénea en todo el producto.

Se debe mencionar que un proceso de esterilización debe alcanzar la completa eliminación de todas las formas de vida y la autoestabilidad de los productos envasados herméticamente. Esto no es posible para todos los alimentos ya que suele generarse alguna modificación indeseable. Si bien, los productos considerados “comercialmente estériles” cumplen en cierta medida lo mencionado, pueden llegar a contener bajo número de esporas viables pero en estado de latencia [Farkas, 2001].

### Pasteurización

Se trata de un método térmico en el cual se utilizan temperaturas menores a 100°C y su objetivo es disminuir la carga microbiana que puede alterar el alimento, así como eliminar el riesgo sanitario y en algunos casos para impedir fermentaciones anómalas [Olson & Nottingham, 1980; Cerf *et al.*, 1994]. Este tratamiento calórico ligero no daña sustancias termolábiles pero sí inactiva enzimas y destruye entre 99 a 99.9% de células vegetativas bacterianas, siendo el principal objetivo el eliminar bacterias patógenas [Farkas, 2001]. Los productos pasteurizados poseen mayor vida útil (vida de anaquel) manteniendo buena calidad microbiológica, organoléptica y nutritiva [Cerf *et al.*, 1994].

A pesar de ello, un tratamiento térmico con temperatura insuficiente puede tener un efecto selectivo sobre aquellos microorganismos para los que no resulta letal, permitiendo la recuperación y crecimiento posterior al tratamiento [Cerf *et al.*, 1994]. Por este motivo, no solamente debe controlarse la temperatura adecuada, sino que también se debe complementar el proceso con un método de envasado que impida recontaminación. Adicionalmente, el alimento debe ser almacenado a baja temperatura para evitar la germinación de esporas que resisten el tratamiento térmico [Farkas, 2001].

#### ➤ Bajas temperaturas

##### Refrigeración

La temperatura utilizada para la conservación en refrigeración es menor a 7°C pero superior al punto de congelación del alimento [Olson & Nottingham, 1980]. El rango va de 16°C hasta -2°C, siendo apropiado utilizar temperaturas inferiores a la temperatura mínima

---

de crecimiento de los microorganismos productores de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) [Farkas, 2001].

El efecto sobre los microorganismos depende de la temperatura y del tiempo de almacenamiento e igualmente del estado fisiológico de estos. En términos generales, las bajas temperaturas disminuyen la velocidad de crecimiento de los microorganismos o lo inhibe.

En el caso de la carne, el almacenamiento de las canales en cámaras frías lo más rápido posible después del faenado puede reducir sustancialmente la velocidad de deterioro y el desarrollo de patógenos [Varnam & Sutherland, 1995; Lawrie, 1998; Warriss, 2003]. Ya que la mayor parte de los microorganismos patógenos son mesófilos, su crecimiento en el alimento almacenado en refrigeración no constituye un problema. Sin embargo, patógenos psicrótrofos como *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophila* son importantes en alimentos mínimamente procesados de larga vida útil [Farkas, 2001].

Es destacable mencionar el hecho de que aquellas bacterias productoras de toxinas requieren de cierta temperatura para poder tener efecto. *S. aureus* puede crecer a temperaturas menores a 7°C pero la temperatura debe ser más elevada para que produzca toxinas [Olson & Nottingham, 1980]. Temperaturas por debajo de 5°C se consideran eficaces para impedir el desarrollo de patógenos [Olson & Nottingham, 1980].

Hay que considerar también que las bajas temperaturas tienen una acción selectiva sobre la microbiota y afecta la composición inicial de ésta. Si el almacenamiento se prolonga, la población psicrótrofa se eleva, llegando a tener efectos negativos sobre la calidad del alimento. Algunos saprófitos asociados al deterioro de alimento almacenado bajo condiciones de refrigeración y que pueden crecer hasta -5°C son: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Lactobacillus*, algunos hongos filamentosos y levaduras [Olson & Nottingham, 1980]. Otras bacterias que pueden desarrollarse en condiciones de refrigeración son del género *Brochothrix thermospactha* y *Carnobacterium* [Ercolini *et al.*, 2006].

La carne fresca puede ser almacenada a temperatura de refrigeración (no mayor a 7°C) de 5 a 7 días [Warriss, 2003]. Si bien, se congela aproximadamente a -1.5°C [Warriss,

---

2003], se sugiere preferentemente mantenerla en almacenamiento a  $-1.4^{\circ}\text{C}$ , donde puede permanecer hasta por más de 60 días [Lawrie, 1998].

En cuanto a las cualidades del producto, un subenfriamiento de canales aún calientes pueden originar carnes duras [Lawrie, 1998]. Puede ocurrir también un aumento de la salinidad de forma local, causar desecación o efectos en la apariencia de la carne pues la mioglobina es reducida adquiriendo un color café o grisáceo [Lawrie, 1998].

Es importante también controlar la humedad en las cámaras de enfriamiento (y el flujo de aire) porque ésta favorece el desarrollo de hongos filamentosos en la superficie de la carne causando alteraciones como: modificación de la apariencia, degradación de las grasas produciendo olor a rancio, etc. [Varnam & Sutherland, 1995].

### Congelación

El someter a temperaturas de  $-10^{\circ}\text{C}$  a  $-60^{\circ}\text{C}$  puede producir lesiones subletales o la muerte de los microorganismos. Si se presentan lesiones subletales, con la consecuente descongelación de la carne, las células pueden reparar el daño generando una fuente potencial de alteración o incluso de enfermedad. Las bacterias gram-positivas son más resistentes a la congelación y al almacenamiento bajo estas condiciones, no así las bacterias gram-negativas. Adicionalmente, las esporas resultan resistentes a este tratamiento y las toxinas de *C. botulinum* y *S. aureus* no se ven afectadas [Olson & Nottingham, 1980].

La carne de ternera puede ser almacenada a  $-18^{\circ}\text{C}$  por periodo de 6 a 12 meses [Warriss, 2003]. Aunque una desventaja de este proceso es el hecho de que la congelación, el transporte y el almacenamiento bajo estas condiciones resulta ser energéticamente costoso [Frakas, 1980]. Así mismo, la congelación de la carne disminuye su calidad y la devalúa [Varnam & Sutherland, 1995].

#### (b) Control de humedad

##### ➤ Deshidratación

El objetivo de este tipo de tratamientos consiste en disminuir el  $A_w$ , privando de agua a los microorganismos para inhibir su metabolismo y así evitar su crecimiento. Son las bacterias gram-negativas aquellas que requieren elevados  $A_w$  para su desarrollo y por lo tanto, este tipo de tratamiento tiene mayor impacto sobre éstas [Farkas, 2001].

---

## Secado

Para el tratamiento de alimentos sólidos, como carne, se recurre a secado usando aire caliente (bajo condiciones de humedad controlada) para que evapore el agua y la arrastre consigo en forma de vapor. Con esto se logra disminuir el Aw del producto. Igualmente, la temperatura del aire afecta la microbiota, aunque el calor húmedo es más letal que el calor seco.

La efectividad del método depende de factores tales como el tamaño de la pieza y las combinaciones de tiempo-temperatura. Si el proceso dura lo necesario (mínimo 30 minutos) se logra la combinación que permite un daño irreversible en las células microbianas [Farkas, 2001]. Igualmente, la pérdida de viabilidad de las células continúa durante el almacenamiento pues son incapaces de regenerarse con Aw bajos.

Los productos secados son microbiológicamente estables en tanto la humedad relativa de la atmósfera del almacén sea menor al 70% [Farkas, 2001].

### ➤ Curado y ahumado

En el **curado** se recurre al uso de cloruro de sodio, nitrato de potasio o nitrato de sodio y nitrito de sodio para impregnar la carne [Warriss, 2003]. Puede aplicarse a carne picada o a piezas (falda, músculo de pierna) [Frazier & Westhoff, 1993].

La sal actúa como conservador y condimento y contribuye a la disminución del Aw [Varnam & Sutherland, 1995].

El nitrato de sodio posee actividad bacteriostática al estar en solución ácida, al igual que el nitrito de sodio, teniendo un fuerte efecto sobre microorganismos anaerobios [Frazier & Westhoff, 1993; Varnam & Sutherland, 1995]. El nitrito también es fuente de óxido nítrico, que actúa como fijador del color.

La mayor parte de las carnes que han sido ahumadas son también curadas para mejorar sus cualidades y su conservación, p. ej., la cecina [Frazier & Westhoff, 1993].

Una vez que la carne ha sido sometida a ambos procedimientos puede ser almacenada a temperatura ambiente [Varnam & Sutherland, 1995].

---

Durante el **ahumado**, el alimento experimenta desecación, lo cual posee el mayor efecto conservador, principalmente en la superficie del alimento [Frazier & Westhoff, 1993]. Los dos objetivos primordiales de este proceso son el impartir sabor al alimento y contribuir a su conservación.

Los componentes del humo que poseen actividad bacteriostática, fenoles y ácidos orgánicos, también actúan como agentes conservadores. Así mismo, el calor empleado para el ahumado posee efecto inhibitorio sobre la multiplicación de los microorganismos durante el almacenamiento. De modo que en el ahumado convergen el tratamiento térmico, la deshidratación y el uso de agentes bactericidas o bacteriostáticos [Frazier & Westhoff, 1993; Varnam & Sutherland, 1995].

Tanto en el caso de la deshidratación, así como en el ahumado y el curado, la carne obtenida desarrolla un color, sabor, aroma e incluso una textura característicos [Varnam & Sutherland, 1995] y ya no puede ser considerada carne fresca. En el ahumado, por ejemplo, el humo obtenido de la combustión de maderas duras proporciona un color particular a las carnes y también las ablanda.

(c) Inhibición directa

➤ Irradiación

Luz Ultravioleta

El rango de mayor capacidad destructiva de la luz UV corresponde a 240-280 nm, siendo la longitud de onda con mayor efecto letal la correspondiente a 260 nm ya que es el máximo al cual absorben los ácidos nucleicos [Ingram & Roberts, 1980; Farkas, 2001]. Con ello, la supervivencia microbiana se ve afectada.

A pesar de su capacidad inhibitoria, su aplicación se limita a suspensiones de aire y superficies (de alimento o equipo) debido a su baja penetrabilidad. Para evitar el crecimiento de microorganismos en la superficie de la carne (de cordero y de res), es aplicado en cámaras de refrigeración [Ingram & Roberts, 1980]. Con esto no se busca esterilizar la pieza sino frenar la multiplicación microbiana al aplicar radiación de forma continua, siendo las bacterias gram-negativas las más susceptibles a este tratamiento [Farkas, 2001].

---

Una desventaja de este método es que puede haber dificultad para alcanzar niveles de exposición uniformes en la superficie de los alimentos [Farkas, 2001]. Además, si los microorganismos poseen una capa protectora, como al hallarse en superficies húmedas o en alimentos grasos, pueden presentar resistencia [Ingram & Roberts, 1980]. Igualmente, este método puede tener efectos negativos sobre el color de la carne, siendo el uso de empaques adecuados una buena opción para preservar el color durante su vida de anaquel [Varnam & Sutherland, 1995].

### Radiación Ionizante

Este tipo de tratamiento utiliza radiación de alta energía como rayos X o gamma utilizando cobalto ( $\text{Co}^{60}$ ) [Ingram & Roberts, 1980; Le Corre & Venaille, 1994; Farkas, 2001; Herrero & Romero de Avila, 2006]. Se caracteriza por un alto poder de penetración debido a la cantidad de energía que posee, lo cual también le da un gran poder letal. Produce alteraciones en el DNA, genera radicales libres y moléculas reactivas que afectan seriamente a los microorganismos.

Una de las ventajas es el que pueden procesarse piezas grandes como canales enteras, cuartos, piezas, carne picada, permitiendo eliminar células vegetativas además de que permite obtener carnes más tiernas. Irradiar la carne mejora la calidad microbiana, disminuye flora alterante y elimina patógenos, de manera que el periodo de almacenaje puede prolongarse entre 14 y 21 días sin alteración organoléptica o microbiana [Jackson *et al.*, 2001].

De acuerdo al objetivo, la exposición a radiación ionizante puede ser:

*Radurización.* Su objetivo es la reducción significativa de microorganismos alterantes (con dosis aproximadamente de 5 kGy<sup>12</sup>), aumentando la vida de anaquel del alimento [Ingram & Roberts, 1980; Frazier & Westhoff, 1993; Farkas, 2001]. En el caso de que sea refrigerado, su almacenamiento puede prolongarse de 3 a 4 veces más que la vida normal [Farkas, 2001]. Pero se debe mencionar que se han detectado bacterias radioresistentes a este proceso, tal es el caso de *Moraxella* y *Acinetobacter* [Le Corre & Venaille, 1994].

---

<sup>12</sup> kiloGray (kGy).  $10^3$  Gy. El Gy es la energía equivalente a un Joule (J) absorbida por un kilogramo (kg) de alimento irradiado [Le Corre & Venaille, 1994].

---

*Radicación.* Su finalidad principal es la reducción del número de patógenos no esporulados [Frazier & Westhoff, 1993; Farkas, 2001].

Se considera que una irradiación menor de 10 kGy no provoca cambio en la calidad del alimento, pero sí posee efectos sobre los microorganismos (altera DNA y RNA, impidiendo su replicación) [Le Corre & Venaille, 1994; Herrero & Romero de Avila, 2006]. En el caso particular de la carne, la mayor parte de los microorganismos son eliminados al utilizar dosis de entre 1 y 3 kGy (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*) [Le Corre & Venaille, 1994].

La exposición a esta radiación no eleva la temperatura del producto, además, puede aplicarse a través de cualquier tipo de material de envasado. Si bien, para efectuar la irradiación son necesarias condiciones particulares como: bajas temperaturas o atmósfera libre de oxígeno e incluso llega a ser necesario aplicar en combinación con otros tratamientos [Le Corre & Venaille, 1994; Farkas, 2001].

Así mismo, es importante aplicar la dosis adecuada, un equilibrio entre lo que se necesita y lo que tolera el producto sin que cause alteraciones indeseables. Si se utilizan dosis muy elevadas pueden originarse cambios organolépticos (olores, sabores, texturas) en los alimentos de alta humedad como la carne [Ingram & Roberts, 1980; Frazier & Westhoff, 1993; Le Corre & Venaille, 1994; Farkas, 2001; Warriss, 2003].

Otros efectos negativos por la aplicación de dosis incorrectas son, por ejemplo, el aumento del pH, el aumento de compuestos carbonilo, sulfuro de hidrógeno, metilmercaptano, disminución en la concentración de tiamina y de otras vitaminas [Frazier & Westhoff, 1993]. Algunos de estos efectos pueden derivar en la aparición de olores desagradables (por el efecto de la radiación sobre lípidos y proteínas), aunque en mayor parte estos desaparecen durante el almacenamiento [Le Corre & Venaille, 1994].

➤ Atmósfera modificada

Este proceso puede aplicarse a carne fresca para prolongar su almacenamiento en refrigeración o congelación, manteniéndola en buen estado.

Para conservación de carnes se ha sugerido el uso de óxido nitroso (NO) y dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) como atmósfera gaseosa para el envasado [Jackson *et al.*, 2001] pero



---

también el uso de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), nitrógeno (N<sub>2</sub>) como gas inerte, bajas concentraciones de oxígeno (O<sub>2</sub>) e incluso se ha sugerido el uso de monóxido de carbono (CO). Este último genera carboxihemoglobina, lo que ayuda a mantener un color rojo cereza estable por tiempo prolongado, sin embargo, este puede preservarse incluso cuando hay deterioro causado por microorganismos.

El mecanismo de acción del dióxido de carbono (y otros gases usados en diferentes combinaciones y proporciones) es la inhibición directa de la respiración microbiana. Miembros de los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, reconocidos por ser parte de la flora alterante en carne, son particularmente sensibles al CO<sub>2</sub> [Farkas, 2001]. En el envasado, el CO<sub>2</sub> proporciona un efecto bacteriostático principalmente sobre gram-negativos y bacterias aerobias, aunque favorece el desarrollo de bacterias ácido lácticas [López-Alfonso *et al.*, 2004].

La ventaja del uso de N<sub>2</sub> es que no altera los pigmentos de la carne por lo que no genera cambios en su coloración. Con este gas se busca sustituir el oxígeno del interior del envase, actuando como gas de relleno. Al ser poco soluble en agua y grasas resulta muy conveniente para conservar alimentos y bebidas [López-Alfonso *et al.*, 2004].

La aplicación de atmósfera modificada puede ser utilizado durante el almacenamiento, junto con algún otro proceso de conservación, o bien, durante el envasado (MAP<sup>13</sup>) utilizando empaques impermeables a los gases.

Es importante mencionar que se recomienda incluir oxígeno en la mezcla de gases, si bien favorece el desarrollo de microorganismos aerobios y procesos oxidativos que contribuyen al deterioro del alimento, resulta necesario para preservar la coloración roja de la carne fresca al mantener en estado oxidado la mioglobina [Varnam & Sutherland, 1995; López-Alfonso *et al.*, 2004].

Por otro lado, también llega a utilizarse el envasado de productos cárnicos al vacío. Con esto se cambia la presión del aire dentro del empaque reduciendo con ello la disponibilidad de oxígeno y se modifica la composición de la atmósfera normal disminuyendo también la concentración de CO<sub>2</sub>. Con esta medida se inhibe el desarrollo de aerobios estrictos y se retarda el crecimiento de anaerobios facultativos. Además,

---

<sup>13</sup> MAP. Modified atmosphere packaging o Envasado en atmósfera modificada.

---

también retarda y disminuye los procesos oxidativos que se presentan naturalmente en la carne. Sin embargo, al eliminar totalmente el O<sub>2</sub> disponible en el envase, se forma metamioglobina, cambiando la coloración roja de la carne por un color pardo [Varnam & Sutherland, 1995; Grèbol, 2004]. Además, se genera la acumulación de exudado por la pérdida de agua del producto [Grèbol, 2004].

Otra desventaja del uso de vacío consiste en que éste promueve el crecimiento de bacterias ácido lácticas durante el almacenamiento de la carne [Tuboly, 2009].

### **2.3.1 Métodos no térmicos**

Hay que mencionar que se ha dado un avance significativo en el desarrollo de sistemas físicos que afectan la viabilidad de los microorganismos sin incrementar sustancialmente la temperatura del alimento. Estos métodos suelen ser considerados como métodos alternativos y permiten eliminar microorganismos sin alterar el alimento, obtener productos más frescos que conserven sus propiedades funcionales, disminuyendo la alteración de sustancias nutritivas como vitaminas.

Dentro de estas nuevas tecnologías se encuentran tratamientos como:

#### *Campos eléctricos pulsados (CEP) de alto voltaje*

También conocido como Campos eléctricos de alta intensidad. El proceso se basa en el uso de entre 20 y 60 kV/cm<sup>14</sup>, aplicando el tratamiento en forma de pulsos eléctricos cortos (entre 1 y 10ms de duración) [Herrero & Romero de Avila, 2006]. Su fundamento se sustenta en la propiedad que tienen ciertos alimentos con alto contenido de agua, minerales, vitaminas y triglicéridos, que los convierte en buenos conductores por la alta concentración de iones que presentes [Raventós, 2005].

Este tratamiento también es conocido como *electroporación* por el efecto que causa en las células microbianas. Genera la alteración irreversible de la permeabilidad de membrana debido a la generación de una diferencia de potencial entre ambos lados de ésta [Raventós, 2005; Herrero & Romero de Avila, 2006].

---

<sup>14</sup> kiloVolt (kV). Equivale a 10<sup>3</sup> V. El Volt es la unidad empleada en el Sistema Internacional (SI) para el potencial eléctrico y se define como la diferencia de potencial existente entre dos puntos, cuando el trabajo necesario para mover una carga de 1 Coulomb (C) de un punto a otro es de 1 Jule (J) [Giancoli, 1997].

---

El valor crítico para células vegetativas es de 15 kV/cm [Farkas, 2001]. Las bacterias gram-negativas son más susceptibles que las gram-positivas. Aunque la inactivación es proporcional al número y duración de los pulsos, también estará en función de la temperatura de tratamiento.

En la industria cárnica, la estimulación eléctrica empleada reduce significativamente la viabilidad de los microorganismos en la superficie de la carne vacuna, utilizándose como pasteurización [Farkas, 2001]. Este tratamiento también es conocido como pasteurización fría y también es recomendable para el tratamiento de leche, huevo líquido, jugos de frutas y concentrados, sopas y extractos de carne [Herrero y Romero de Avila, 2006].

#### *Campos magnéticos oscilantes (CMO)*

Este tratamiento también induce una alteración en la permeabilidad de membranas de células microbianas y afecta tanto el crecimiento como la reproducción de los microorganismos [Farkas, 2001]. Causa la ruptura del DNA y de ciertas proteínas [Herrero & Romero de Avila, 2006].

El producto envasado en material plástico es sometido a un campo magnético de entre 5 y 50 T<sup>15</sup> con una frecuencia de entre 5 y 500 kHz<sup>16</sup>, manteniendo la temperatura entre 0 y 50°C [Herrero & Romero de Avila, 2006]. El tiempo de exposición es corto y no produce cambio térmico en el alimento. Tiene efecto pasteurizante, inactivando células vegetativas [Farkas, 2001].

Esta tecnología todavía está en desarrollo pero puede ser aplicada para el tratamiento de derivados cárnicos, productos cocidos y productos envasados y listos para el consumo [Herrero & Romero de Avila, 2006].

#### *Efectos fotodinámicos (luz blanca de alta intensidad)*

La aplicación de esta tecnología se limita a la superficie de productos y puede ser utilizada para pasteurizar alimentos envasados en materiales transparentes o para líquidos transparentes [Herrero & Romero de Avila, 2006].

---

<sup>15</sup> Tesla (T). Es la unidad en el SI que expresa el flujo magnético o inducción magnética [Giancoli, 1997].

<sup>16</sup> Kilohertz (kHz). Equivalente a 10<sup>3</sup> Hz. Corresponde a la unidad en el SI para expresar frecuencia, 1 Hz equivale a un ciclo por s<sup>-1</sup> [Giancoli, 1997].

---

La luz utilizada para la irradiación va del espectro del ultravioleta lejano (200 nm) hasta el infrarrojo cercano (1 100 nm) [Herrero & Romero de Avila, 2006].

Los efectos que tiene son a nivel fotoquímico y fototérmico (genera un aumento local de la temperatura que no afecta la temperatura global del producto), causando modificaciones en el DNA, en membranas celulares y en los sistemas de reparación enzimáticos [Herrero & Romero de Avila, 2006], comprometiendo la viabilidad de la célula.

Otro método alternativo que se puede considerar en auge es la *Alta presión hidrostática* (o Presión Hidrostática Ultra Alta).

### **2.3.2 Presión Hidrostática Ultra Alta**

La Presión Hidrostática Ultra Alta (PHUA)<sup>17</sup> resulta ser una técnica de conservación muy efectiva, puede inactivar esporas y enzimas sin alterar la calidad sensorial de los alimentos aumentando su vida de anaquel [Fonberg-Broczek *et al.*, 2005; Heinz *et al.*, 2009]. Con ello destaca con respecto a los tratamientos térmicos pues estos causan pérdida de nutrientes y sabores.

En la industria alimentaria básicamente se utiliza el sistema de presurización en frío o a temperatura ambiente, con tiempos de tratamiento de 5 a 20 minutos con presiones de entre 400 a 900 MPa<sup>18</sup> [Téllez-Luis *et al.*, 2001].

Dentro de las ventajas que ofrece este método se pueden mencionar<sup>19</sup>:

- El alimento no sufre deformación; de acuerdo con el principio de Pascal (ley isostática), la presión hidrostática se transmite uniformemente sobre el producto de forma instantánea [Heinz *et al.*, 2009], por lo que el tratamiento es independiente del volumen y de la forma del producto y el tiempo de proceso es reducido para procesar grandes cantidades [Farkas, 2001].

---

<sup>17</sup> También es denominada: Alta Presión Hidrostática (APH), pascalización o presurización.

<sup>18</sup> Megapascal (MPa). Equivale a  $10^6$  Pa, siendo el Pa la unidad para expresar la presión hidrostática (proyección de la fuerza en dirección perpendicular por unidad de superficie) en el SI y se define como:  $1 \text{ Pa} = \text{N m}^{-2}$ , es decir, la fuerza de un Newton actuando uniformemente sobre un metro cuadrado de superficie [Giancoli, 1997]. 100 MPa equivalen a 10.1 atmósferas.

<sup>19</sup> Téllez-Luis *et al.*, 2001.

- 
- No afecta nutrientes termolábiles como vitaminas ni los compuestos responsables del aroma y del sabor pues no afecta enlaces covalentes.
  - No genera residuos y es de bajo consumo energético. La energía necesaria para calentar 1L de agua a 30°C es la misma requerida para presurizar a 400 MPa ese mismo volumen de agua [Cheftel, 1995; Téllez-Luis *et al.*, 2001].
  - Se puede aplicar a alimentos envasados pero considerando que el envase debe ser flexible y deformable, tolerando una reducción del volumen de hasta 15% [Herrero & Romero de Avila, 2006].
  - El tratamiento puede ser aplicado a temperatura ambiente o a temperaturas moderadas.
  - El alimento es mínimamente procesado y no requiere aditivos.

También se pueden mencionar algunos inconvenientes como<sup>20</sup>:

- No se puede aplicar a ciertos alimentos como algunas frutas o verduras porque puede afectar su forma y aspecto original.
- La PHUA puede tener efectos en las características sensoriales de ciertos alimentos<sup>21</sup>, normalmente estas modificaciones suelen dar mejoras. Colores, sabores y olores no suelen verse afectados pero las texturas pueden tener cambios [Sangronis *et al.*, 1997; Raventós, 2005; Herrero & Romero de Avila, 2006; Heinz *et al.*, 2009]. Los tejidos de la carne y el filete de pescado en *pre-rigor mortis* se ablandan y vuelven opacos [Sangronis *et al.*, 1997]. En el caso de la carne fresca, en sólo 10 minutos la carne se ablanda y se incrementa la digestibilidad de proteínas cuando normalmente esto ocurre en 2 semanas (proceso de maduración<sup>22</sup>) [Téllez-Luis *et al.*, 2001].

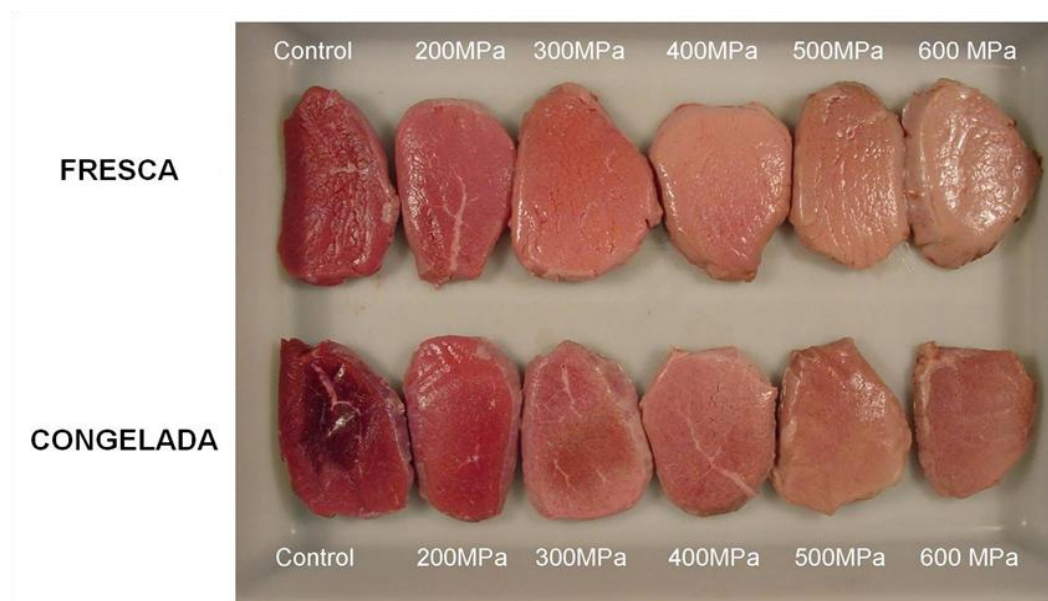
---

<sup>20</sup> Téllez-Luis *et al.*, 2001.

<sup>21</sup> En el caso de la carne, se ha mencionado que el filete de res sufre modificaciones en color y terneza a presiones mayores a 350 MPa o periodos de presurización superiores a 1 minuto [Sánchez-Basurto *e al.*, 2011].

<sup>22</sup> El proceso de maduración de la carne tiene como objetivo la obtención de carnes más tiernas, esto se logra manteniéndola a 5°C durante 14 días [Varnam & Sutherland, 1995].

- La influencia de la PHUA en las características sensoriales de los alimentos depende del alimento y de las condiciones de presurización. En el caso de la carne se puede llegar a alterar su color, a presiones mayores a 300 MPa puede ocurrir este cambio (figura 2). Y a presiones mayores a 400 MPa la mioglobina ferrosa pasa a estado de mioglobina férrica y se desnaturaliza, teniendo también efecto en el color del producto [Hugas *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2003; Picouet *et al.*, 2008]. Siendo que el color es uno de los criterios más importantes para el consumidor, esto puede ocasionar rechazo. Por ello, cada alimento en particular requiere de estudios previos para la aplicación de este tratamiento.



**Figura 2.** Modificación del color de carne de res después de ser sometida a diferentes presiones [Picouet *et al.*, 2008].

- La desconfianza del consumidor ante algo novedoso y desconocido es un aspecto limitante. Sin embargo, estos productos van aumentando su popularidad en países como Japón, EE.UU. y algunos países europeos. Las personas han mostrado que si se les informa sobre los beneficios del uso de esta nueva tecnología y de las mejoras en la calidad y seguridad del producto que se pueden conseguir sin un incremento sustancial del producto (entre \$0.25 a \$0.50 USD<sup>23</sup>) estarían dispuestos a adquirirlo [Hicks *et al.*, 2009]. Gran parte de la población es conciente de la necesidad de nuevas tecnologías para mejorar la calidad de los productos para poder acceder a productos más frescos y seguros, además de ser procesados con tecnologías amigables con el ambiente.

<sup>23</sup> USD, United States Dollar, es decir, dólar norteamericano.

---

Igualmente, cabe mencionar que la PHUA posee otras aplicaciones en la industria alimentaria, por ejemplo, para obtener nuevas texturas, siendo una tecnología de reciente uso para obtener carne más tierna [Heinz *et al.*, 2009; Sun & Holley, 2010]. Si bien, predomina su uso para la conservación de los alimentos.

La aplicación del tratamiento a alta presión fue estudiado en alimentos por primera vez en 1899 por Hite y colaboradores para la esterilización de la leche. Posteriormente a esta fecha se da un desarrollo de la tecnología correspondiente, no siempre aplicado a la industria alimentaria. Es en la década de 1980 cuando la investigación en este campo se vuelve exhaustiva y fue Japón el primer país en producir y comercializar alimentos presurizados (jugos y derivados de frutas) [Téllez-Luis *et al.*, 2001].

En los últimos años se ha dado un avance significativo en las nuevas tecnologías. Se han obtenido grandes progresos con los últimos equipos y se ha logrado una exitosa comercialización de muchos productos cárnicos tratados con presión hidrostática ultra alta. Hay modelos de equipos para los que se ha estimado una productividad desde 170 kg/h con un costo de 0.19 €/kg (0.25 USD) hasta 2 000 kg/h con un costo de 0.5 €/kg (0.65 USD) operando al 50% de capacidad y procesando durante 3 minutos con 600 MPa [Picouet *et al.*, 2008].

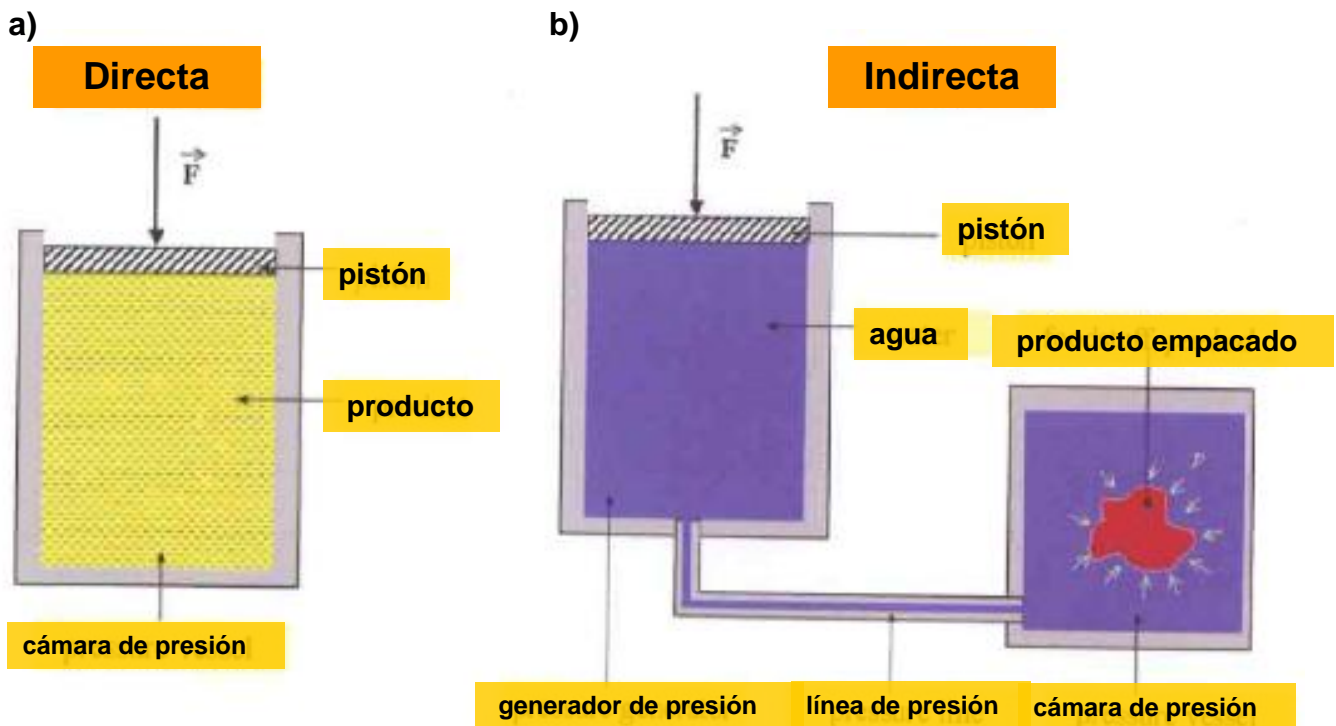
### **2.3.2.1 Métodos de Tratamiento con Presión Hidrostática Ultra Alta**

La PHUA se puede producir por: compresión directa, compresión indirecta o por calentamiento del medio presurizante.

- Compresión directa (se utiliza para productos líquidos). La alta presión se obtiene de forma inmediata y a gran velocidad por la presurización del medio mediante un pistón, como se aprecia en la figura 3a. Su uso se restringe a laboratorios pequeños o en plantas pilotos.

- Compresión indirecta (se utiliza para productos sólidos). Utiliza un intensificador de alta presión que bombea el medio presurizante desde un depósito hacia la cámara de presurizado hasta alcanzar la presión deseada (figura 3b). Este método es utilizado ampliamente en la industria y usualmente se utiliza agua como medio presurizante.

- Compresión por calentamiento del medio presurizable. Se fundamenta en el hecho de que al elevar la temperatura del medio presurizante éste se expande, con lo cual hay un aumento en la presión. De esta manera se combinan alta temperatura y alta presión.



**Figura 3.** Principios de funcionamiento de la presión directa y de la presión indirecta [Heinz *et al.*, 2009].

Dependiendo del tipo de alimento y la temperatura del proceso será el tiempo durante el cual deberá ser sometido el producto al tratamiento con alta presión.

Ya que la PHUA se rige por el principio de Pascal<sup>24</sup>, que como ya se mencionó, señala que la presión se transmite instantáneamente y de forma uniforme a través de la masa del producto de forma independiente del volumen, los tiempos de proceso son cortos. Entonces se puede aumentar la velocidad de la producción, especialmente si se recurre al proceso semi-continuo operando secuencialmente cámaras de presión de forma sucesiva [Téllez-Luis *et al.*, 2001]. Este proceso se vuelve *quasi* continuo (batch) y consiste en el uso de compartimentos colocados en serie en los cuales se introduce el alimento previamente empacado (figura 4). Después las cámaras son llenadas con líquido presurizante y el alimento es expuesto a PHUA [Heinz *et al.*, 2009].

<sup>24</sup> Téllez-Luis *et al.*, 2001; Raventós, 2005; Herrero & Romero de Avila, 2006; Heinz *et al.*, 2009.





**Figura 4.** Ejemplo del equipo utilizado para el proceso semi-continuo [DIL/Meat&Co<sup>25</sup>].

### 2.3.2.2 Efecto sobre los microorganismos

La alta presión produce cambios en diferentes niveles de la célula dependiendo del tiempo, temperatura de procesamiento y presión aplicada, llegando a generar modificaciones morfológicas. La combinación de este conjunto de cambios afecta la viabilidad de las células vegetativas (tabla 4).

**Tabla 4. Principales efectos de la PHUA sobre la microbiota en alimentos**

<b>Presión (MPa)</b>	<b>Efectos</b>
> 200	Influencia sobre la actividad enzimática Modificación de las propiedades físicas de las proteínas Alteración de la membrana plasmática
> 300	Inactivación irreversible de enzimas Muerte de los microorganismos
> 400	Gelificación de almidones Desnaturalización de proteínas
> 500	Muerte de las esporas bacterianas Inactivación de enzimas involucradas en la esporulación

[Raventós, 2005]

La membrana celular es el blanco primario del daño ya que los sistemas de lípidos son lábiles a la presión. El arreglo de la bicapa lipídica pasa de un estado líquido-cristalino a un

<sup>25</sup> Imagen extraída de: Toepfl, S. & Heinz, V. (2009) Schokkende Procestechnieken. Meat&Co, November. Créditos de imágenes: German Institute of Food Technologies (DIL)/Meat&Co. Consultado el 14 de agosto de 2010 en: <http://www.promatecfoodventures.com/doc/SCHOKKEND.pdf>

---

estado de gel al compactarse los fosfolípidos y la fluidez disminuye conforme aumenta la presión [Aymerich *et al.*, 2008; Rivalain *et al.*, 2010]. Por ende, también hay una disrupción entre la unión de la membrana celular y la pared celular, generando con ello cambios en la morfología y también modificaciones que alteran la permeabilidad de la membrana [Téllez-Luis *et al.*, 2001; Hugas *et al.*, 2002; Heinz *et al.*, 2009]. Se presenta la inhibición de reacciones productoras de energía tanto por la pérdida de estabilidad de membrana así como por la pérdida de actividad enzimática en general [Farkas, 2001]. Disminuye la síntesis de DNA y hay disminución en los mecanismos de reparación y se produce la desnaturalización de otros biopolímeros [Herrero & Romero de Avila, 2006]. Con la alteración de la permeabilidad de membrana, se pierde la capacidad para mantener el gradiente de pH (que también afecta las reacciones productoras de energía, por lo que hay una disminución en la producción de ATP), se pierde el balance osmótico y las proteínas de transporte también se ven afectadas [Téllez-Luis *et al.*, 2001; Hugas *et al.*, 2002; Aymerich *et al.*, 2008].

La desnaturalización de proteínas tiene consecuencias en los sistemas biológicos y es irreversible al usar presiones por encima de 300 MPa [Téllez-Luis *et al.*, 2001; Hugas *et al.*, 2002; Heinz *et al.*, 2009; Sun & Holley, 2010]. Es por ello que cuando la PHUA se utiliza como método de conservación se utilizan presiones superiores a este valor. La presión puede generar la ruptura de interacciones no covalentes débiles como las interacciones electrostáticas y las hidrofóbicas que son las que estabilizan la estructura terciaria y cuaternaria de proteínas. Con la aplicación de presión, las regiones hidrofóbicas quedan expuestas (pueden quedar atrapadas moléculas de agua al interior de la proteína promoviendo que zonas hidrofílicas antes ubicadas en la zona externa de la proteína queden en la parte interna), lo que genera la agregación de la proteína y la pérdida de agua (formación de exudado), junto con la disminución del volumen [Téllez-Luis *et al.*, 2001; Rivalain *et al.*, 2010; Sun & Holley, 2010]. Este efecto se ve reforzado por el principio de Le Chatelier (que junto con el principio de Pascal, rige el proceso físico de la PHUA). De acuerdo al principio de Le Chatelier, la presurización acelera las reacciones que involucran un cambio de volumen favoreciéndolas en la dirección de su disminución [Téllez-Luis *et al.*, 2001; Hugas *et al.*, 2002].

En caso de ser una proteína oligomérica, puede ocurrir un cambio conformacional ya sea por la disociación o una mala reasociación de sus componentes (cuando el efecto es reversible); hay un cambio en la estructura intermolecular y cambios en la hidratación que

---

pueden causar dificultades para replegarse o causar un plegamiento incorrecto que afecte los sitios de unión del grupo prostético o del sustrato [Téllez-Luis *et al.*, 2001; Hugas *et al.*, 2002; Rivalain *et al.*, 2010; Sun & Holley, 2010].

El grado en que estos factores se vean afectados originará la disminución de la población microbiana que es proporcional con el incremento de la presión utilizada en el tratamiento o con el tiempo en que ésta es aplicada [Fonberg-Broczek *et al.*, 2005]. Levaduras y mohos presentan mayor susceptibilidad, las bacterias gram-negativas son menos susceptibles pero se ven más afectadas que las bacterias gram-positivas que son más resistentes ante la presurización, pero las esporas lo son aun más [Shigehisa *et al.*, 1991; Smelt, 1998; Hugas *et al.*, 2002]. Las células vegetativas son destruidas en un margen de 300 a 700 MPa [Farkas, 2001]. Las esporas, en cambio, resisten hasta 1 000 MPa, por ello, comúnmente se recurre a la aplicación de presión moderada y alta temperatura para su germinación, para después someter a tratamiento con alta presión y con ello inactivar [Cheftel, 1995; Heinz *et al.*, 2009].

Este tratamiento es utilizado para eliminar agentes patógenos, prolongar el tiempo de vida de anaquel, mantener la calidad sensorial y mejorar la seguridad de los procesos de cocción o el curado de la carne [Sun & Holley, 2010]. El rango de presión utilizado va de 300 a 1 000 MPa [Farkas, 2001; Téllez-Luis *et al.*, 2001]. Valores superiores a 1 000 MPa pueden afectar la conformación de las proteínas del alimento, pudiendo causar desnaturalización, agregación e incluso gelificación [Heinz *et al.*, 2009; Sun & Holley, 2010]. El tratamiento mediante PHUA ha mostrado tener buenos resultados para inactivar bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* y *Enterococcus* spp.<sup>26</sup> Estos resultados se han obtenido en estudios donde se contaminó artificialmente el alimento para tener una densidad bacteriana de  $10^7$  y  $10^{10}$  bacterias/g en productos cárnicos, utilizando 400 MPa durante 15 minutos, teniendo como resultado menos de 10 bacterias/g [Fonberg-Broczek *et al.*, 2005]<sup>27</sup>.

---

<sup>26</sup> *L. monocytogenes* es una bacteria patógena, psicrófila, capaz de crecer a bajas temperaturas y en un amplio rango de pH. Está asociada con enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). *A. hydrophila* es una bacteria patógena de rápido crecimiento a 5° C. Una cocción inadecuada, falta de tratamiento térmico y el almacenamiento en refrigeración por tiempo prolongado promueven su desarrollo. *Enterococcus* spp. es un indicador de la calidad sanitaria de varios productos alimentarios.

<sup>27</sup> Jamón curado, rebanado, inoculados con una mezcla de 5 cepas de *L. monocytogenes*. Después de la inoculación fue empacado al vacío en unidades de 10 gramos y expuesto a PHUA.

---

### 2.3.2.3 Otras perspectivas para el uso de Presión Hidrostática Ultra Alta

En el área de la Medicina se ha planteado el uso de la presurización para la desinfección de biomateriales como prótesis, placas óseas, ligamentos y tendones artificiales, entre otras cosas. Los tratamientos convencionales como radiación, autoclaveado o el uso de detergentes comprometen la integridad biológica y biomecánica de estos materiales. Sustitutos de hueso de fosfato de calcio, tendones de Aquiles y hueso trabecular mantienen su estabilidad después de ser tratados con PHUA sin causar pérdida de función, inactivando células tumorales en tendón y tejido óseo y células bacterianas [Rivalain *et al.*, 2010]. En otras áreas se sugiere el uso de la presión junto con calor moderado para esterilizar productos cosméticos o liposomas y herramientas médicas para cirugía o herramientas para endoscopia [Masson *et al.*, 2001].

Otra de las posibles aplicaciones gira en torno a la hipótesis que sugiere que patógenos inactivados mediante PHUA pueden estimular el sistema inmunitario con posibilidad para utilizarse como vacuna. Otra posible estrategia sería el uso de fantasmas bacterianos en lugar de células atenuadas o muertas. Usualmente estos fantasmas se obtienen por la expresión de genes del ciclo lítico pero sin que ocurra daño en la membrana o en la pared celular por lo que se mantendrían sus propiedades inmunogénicas. En el área de la virología, los virus tratados con PHUA pierden infectividad pero mantienen su capacidad para estimular la formación de anticuerpos. También se sugiere la hipótesis de que al presurizar la cápside se disocia y al reasociarse genera una partícula vírica no infecciosa pero que mantiene sus propiedades inmunogénicas, además de que epitopes anteriormente ocultos pueden quedar expuestos, incrementando la inmunogenicidad del virus inactivado [Masson *et al.*, 2001; Rivalain *et al.*, 2010].

Para el área de la Biología Molecular y la Bioquímica, Pressure Biosciences Inc. ha desarrollado un nuevo método de extracción celular combinando ciclos de presurización junto con extracción con solventes y centrifugación para obtener fracciones de diferentes moléculas. Con ello se han obtenido buenos rendimientos para la extracción de proteínas, lípidos, DNA o RNA intactos e incluso organelos, sin necesitar algún paso posterior de purificación [Tao *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2008a, b].

El uso de PHUA también se ha planteado, por ejemplo, para mejorar la extracción de compuestos químicos de interés farmacéutico a partir de plantas medicinales. Muchos de

---

estos compuestos bioactivos son termolábiles y los métodos de extracción convencionales involucran calentamiento continuo por periodos prolongados (p. ej., extracción mediante reflujo, extracción con soxhlet). Se ha reportado la extracción exitosa de compuestos bioactivos utilizando PHUA, como es el caso de la extracción de los tres principales compuestos fenólicos de *Rubus coreanus* utilizando 500 MPa por 15 minutos mejorando el rendimiento de la extracción convencional basada en métodos térmicos y que dura de 24 a 36 h [Seo *et al.*, 2011].

La formación de geles de polisacáridos o geles de polisacáridos-proteínas homogéneos es de gran interés para la industria cosmética y la farmacéutica. Geles presurizados y emulsiones de proteínas floculadas tienen características reológicas particulares y pueden contribuir a la liberación controlada de principios activos [Masson *et al.*, 2001].

De esta manera, el uso de la PHUA no sólo se restringe a la industria alimentaria como método de conservación sino que también resulta ser una tecnología con buenas perspectivas en diferentes áreas y que posee aún muchas funciones novedosas por descubrir y evaluar.

## **2.4 Metodologías para la evaluación de la calidad microbiológica de la carne**

### **2.4.1 Método tradicional, Cuenta de células viables**

Para poder evaluar la eficiencia de los procesos utilizados en la conservación de alimentos se recurre a procedimientos experimentales acordes a los parámetros de interés. En el caso del análisis de la seguridad microbiológica, se puede proceder al uso de las técnicas clásicas de microbiología que involucran el cultivo en placa, ya sea en medios selectivos o diferenciales e incluso adicionando un paso previo de enriquecimiento celular cuando se busca identificar presencia o ausencia y se sospecha que hay cuentas muy bajas. Así mismo, en caso de sospechar de la presencia de células dañadas, se recurre a un preenriquecimiento, seguido de un enriquecimiento y la siembra en medios sólidos selectivos para su posterior identificación, por ejemplo, a través de pruebas bioquímicas.

Para el análisis de muestras de carne, la normatividad sanitaria mexicana sugiere el uso de las técnicas clásicas de microbiología. Las Normas Oficiales Mexicanas 034-SSA1-2004<sup>28</sup> y 213-SSA1-2002<sup>29</sup> hacen referencia a la 092-SSA1-1994<sup>30</sup> para el análisis de

---

<sup>28</sup> NOM-034.SSA1-1993. BIENES Y SERVICIOS. PRODUCTOS DE LA CARNE. CARNE MOLIDA Y CARNE MOLIDA MOLDEADA. ENVASADA. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.

---

bacterias aerobias a través de cuenta en placa y a la 114-SSA1-1994<sup>31</sup> para la detección de *Salmonella* spp. por cultivo en medio selectivo. Esta normatividad no hace mención a la presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en carne pero se cuenta con la NOM-143-SSA1-1995<sup>32</sup> que indica el método de análisis para su detección en alimentos por medio de cultivo en medio selectivo.

Así mismo, de acuerdo al Manual para el Laboratorio de Microbiología<sup>33</sup>, elaborado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA: United States Department of Agriculture) junto con el Servicio de Seguridad e Inspección de Alimentos (FSIS: Food Safety and Inspection Service), se sugiere también el uso de éstas técnicas. Cabe mencionar que los procedimientos para cuenta de aerobios totales, detección de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* descritos en las normas mexicanas se basan en este Manual (al igual que los procedimientos utilizado en este proyecto para estos grupos microbianos).

La técnica de cuenta en placa se basa en contar las UFC (Unidades Formadoras de Colonias) presentes en 1 g de muestra de alimento, considerando que cada colonia que se desarrolla en el medio de cultivo se origina de un microorganismo (o un agregado de ellos) proveniente de la muestra en estudio.

En las metodologías planteadas por USDA y por las Normas Oficiales Mexicanas se estipula el uso de Agar Cuenta Estándar (agar Triptona-Extracto de Levadura) para cuantificar microorganismos aerobios, incubando a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  de 24 a 48 h para mesófilos y a  $5 \pm 2^\circ\text{C}$  de 7 a 10 días para psicrótrofos<sup>34</sup>. Para *Salmonella* spp. el medio Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato es uno de los medios selectivos que se propone para la detección de esta bacteria y el medio Agar Oxford, también selectivo, para *L. monocytogenes*.

---

<sup>29</sup> NOM-213-SSA1-2002. PRODUCTOS Y SERVICIOS. PRODUCTOS CÁRNICOS PROCESADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS. MÉTODOS DE PRUEBA.

<sup>30</sup> NOM-092-SSA1-1994. BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.

<sup>31</sup> NOM-114-SSA1-1994. BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE SALMONELLA EN ALIMENTOS.

<sup>32</sup> NOM-143-SSA1-1995, BIENES Y SERVICIOS. METODO DE PRUEBA MICROBIOLÓGICO PARA ALIMENTOS. DETERMINACION DE LISTERIA MONOCYTOGENES.

<sup>33</sup> USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook , mayo de 2013:  
[http://www.fsis.usda.gov/science/microbiological\\_lab\\_guidebook/](http://www.fsis.usda.gov/science/microbiological_lab_guidebook/)

<sup>34</sup> USDA/FSIS, 1998. Capítulo 3. Microbiology Laboratory Guidebook, 3<sup>rd</sup> ed. Mayo 2013:  
<http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgchp3.pdf>

---

Dentro de las especificaciones sanitarias microbiológicas que contempla nuestra legislación, se indica como límite máximo permitido 5 000 000 UFC/g ( $7.6 \log_{10}$ ) de mesófilos aerobios y la ausencia de *Salmonella* spp. en 25 g(NOM-034-SSA1-2004). Para el caso de bacterias coliformes se sugiere la técnica del Número Más Probable (NMP) pero no hay especificación de límite máximo en carne. Para bacterias ácido lácticas y *Pseudomonas* spp. no se refiere ningún método en particular, y para éstos últimos no hay especificación del límite máximo permitido en carne.

El efectuar la cuenta en placa permite el registro de células viables de forma confiable pero los tiempos de incubación pueden resultar un inconveniente como en el caso de los psicrótrofos aerobios (7 a 10 días) pues retarda la obtención de resultados. Sin embargo, el límite de detección queda acorde a las diluciones utilizadas y puede ser incluso de 10 UFC/g. En cuanto a su uso para la detección (presencia o ausencia), la posibilidad de que el grupo microbiano se encuentre por debajo del límite de detección puede resultar una limitación si no se lleva a cabo un enriquecimiento previo. Otra limitante consistiría en la posibilidad de que el grupo microbiano de interés sea dañado durante el procesamiento del alimento y que aún en estado viable no pueda ser cultivado.

#### **2.4.2 Método molecular, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Las limitaciones por tiempo, disponibilidad de medios de cultivo y la sensibilidad que se tiene en el método de la cuenta en placa pueden mejorarse por medio del uso de técnicas de Biología Molecular que involucran el uso de la PCR. Además, se sabe que hay microorganismos que no crecen en los medios de cultivo tradicionales, ya sea porque se desconoce sus requerimientos nutricionales o por encontrarse en estado viable pero no cultivable. De esta manera, el DNA recuperado directamente de una muestra puede utilizarse para la PCR (método cultivo-independiente). Éste es un método *in vitro* utilizado para la amplificación enzimática de secuencias específicas de DNA a través de varios ciclos de síntesis.

Para que la reacción de PCR se lleve a cabo se requiere la combinación adecuada de reactivos y del programa de desnaturalización, alineamiento y extensión adecuado para los oligonucleotidos (oligos) de trabajo (dirigidos a la secuencia de DNA de interés). Así mismo, el éxito de la PCR dependerá de la concentración del DNA molde y el límite de detección de los oligos. Otro aspecto a considerar es la presencia de sustancias

---

inhibidoras de la PCR en el alimento, por lo que será necesario eliminarlas o disminuir su efecto [Rossen *et al.*, 1992]. Es por ello que las desventajas que presenta este método giran en torno a la estandarización e implementación de la técnica, así como el diseño y uso de determinados oligos específicos para el grupo microbiano de. Sin embargo, una vez que se han determinado los parámetros adecuados, esta técnica contribuye a tener resultados rápidamente.

El Manual de la USDA también avala el uso de la amplificación por PCR para la detección de *Salmonella* spp. y de *L. monocytogenes*, pero se especifica que las muestras con sospecha de ser positivas deben ser evaluadas para confirmación a través de siembra en placa. En este manual se sugiere el uso del sistema BAX® con previo enriquecimiento de las muestras. Estas placas son específicas para microorganismos patógenos, con límites de detección de 10<sup>4</sup> UFC/mL.

El uso de la PCR resulta muy plausible si se trata de determinar presencia o ausencia, sin embargo, sólo es un indicativo de que el microorganismo que posee la secuencia blanco de los oligos estuvo ahí en algún momento (dejando su DNA) y no un indicativo de presencia de células viables. Por lo que si se desea hacer un análisis cuantitativo o a través de actividad metabólica en curso, la PCR semicuantitativa o la PCR en tiempo real (RT-qPCR) resultan una buena opción.

## **2.5 Metodologías para la evaluación de la modificación de la microbiota de la carne**

### **2.5.1 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)**

Existen otras técnicas de biología molecular que ofrecen nuevas oportunidades para analizar la estructura y composición de comunidades microbianas sin necesidad de aislar a los miembros que las componen. El uso del gen 16S rRNA como marcador filogenético y para identificación taxonómica va a la par del desarrollo de estas aproximaciones. Es el caso de la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante o DGGE por sus siglas en inglés (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Esta técnica se basa en la separación electroforética de amplificadores de PCR (utilizando oligos acordes al grupo taxonómico de interés) en geles de poliacrilamida con un gradiente desnaturalizante que aumenta de forma lineal. Así, los fragmentos del mismo largo pero con secuencia diferente migrarán diferente distancia, ocupando el espacio en donde se localiza el gradiente que lo desnaturaliza de acuerdo a su secuencia de nucleótidos [Muyzer, *et al.*, 1993]. De esta manera, se obtiene un patrón de bandas que en principio refleja la diversidad de la



---

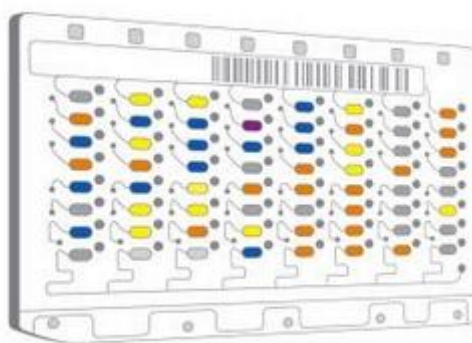
comunidad presente en la muestra. Este patrón de bandas puede compararse con patrones que se obtienen sometiendo a esa misma comunidad microbiana a diferentes condiciones (estrés, diferencia de nutrientes, etc.). Si se desea tener más información sobre las especies presentes, es necesario recuperar las bandas de interés para posteriormente secuenciar el gen que fue blanco de los oligos utilizados.

Para evitar que algún fragmento se salga del gel y hacer más eficiente la separación en la DGGE, para la PCR previa se puede utilizar un oligo de secuencia larga (cola o clamp de GC) que modifica el punto de desnaturalización de los fragmentos en caso de que las secuencias blanco de la amplificación sean muy similares entre sí [Myers *et al.*, 1985; Sheffield *et al.*, 1989]. Si se desea secuenciar, la segunda PCR debe ser sin el clamp de GC.

Para el análisis de la microbiota nativa de la carne fresca en este estudio se plantea el uso de los oligos Agc338F (338F con cola de GC's) y B518R, dirigidos a la región V3 del gen 16S rRNA de bacterias para efectuar la PCR [Muyzer, *et al.*, 1993].

### 2.5.2 Identificación de bacterias: Sistema Vitek® 2

El sistema Vitek® 2 es un recurso automatizado para la identificación microbiana basado en pruebas bioquímicas y resistencia a antibióticos. Una suspensión bacteriana con determinada densidad óptica es inyectada a cada uno de los 64 pozos que conforman el cassette de identificación (test card, figura 5) a los cuales se les monitorea el crecimiento y actividad (en respuesta a las pruebas) durante el periodo de incubación, por medio de lecturas colorimétricas y de transmitancia [BioMérieux, 2009].



**Figura 5.** Cassette de identificación utilizado por el sistema Vitek® 2 [BioMérieux, 2009<sup>35</sup>].

---

<sup>35</sup> BioMérieux, 2009. Imagen extraída de la página consultada en mayo de 2013: [http://www.biomerieux-usa.com/servlet/srt/bio/usa/dynPage?node=VITEK\\_2](http://www.biomerieux-usa.com/servlet/srt/bio/usa/dynPage?node=VITEK_2)

---

Los cassettes disponibles están enfocados a grupos microbianos particulares, por ejemplo, para la identificación de *Enterobacteriaceae* y gram-negativas no fermentadores de glucosa, para la identificación de enterococos, estreptococos y un determinado grupo de gram-positivos, El equipo cuenta con un software y una base de datos particular para llevar a cabo la identificación.

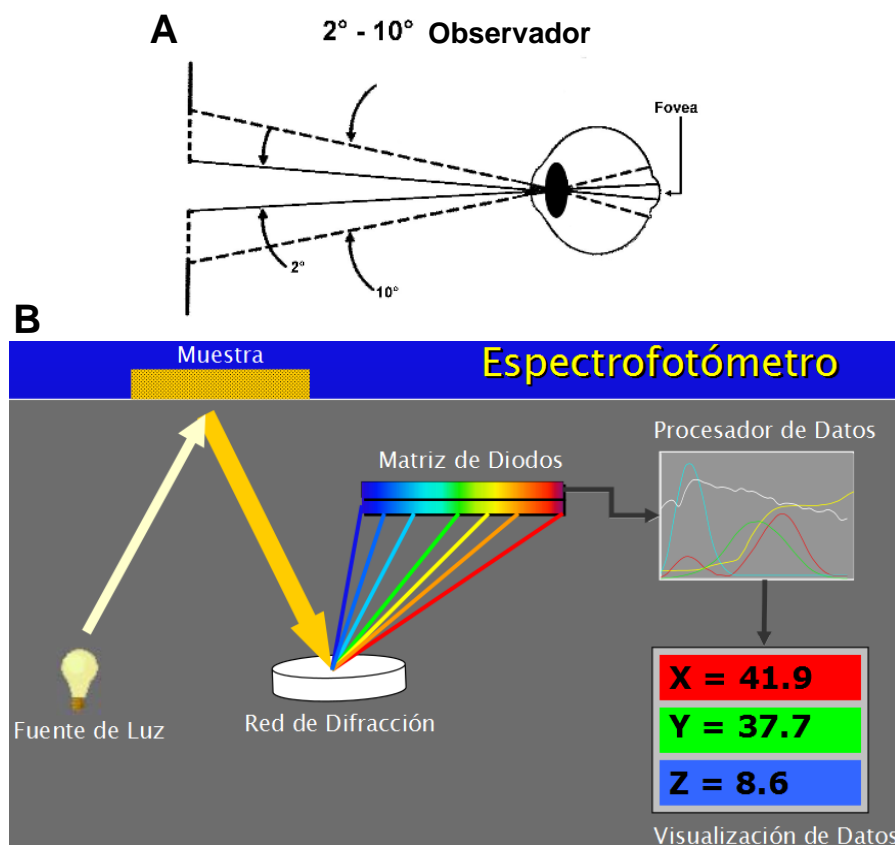
## 2.6 Evaluación colorimétrica de la carne

El color de la carne también es reflejo de la calidad de la misma y resulta ser el principal atributo sensorial que reconoce el ser humano [Hui *et al.*, 2006]. Los métodos de conservación como la PHUA pueden modificar este atributo comprometiendo su aceptación por parte del consumidor. Por ello, además de asegurar la calidad microbiológica, también se busca mantener en condiciones adecuadas este atributo.

Los instrumentos de medición del color buscan recrear la percepción humana de éste. El Colorímetro es el equipo utilizado para el análisis del color en alimentos y su funcionamiento está basado en el Espectrofotómetro y permite identificar diferencias en el color. Un colorímetro tipo espectrofotómetro usa una fuente de luz para iluminar la muestra a medir. La luz reflejada o transmitida por el objeto pasa a una red de difracción que la rompe en el espectro (de luz visible, entre 400 y 700 nm). El espectro cae en una matriz de diodos que mide la luz a cada longitud de onda del espectro visible y los datos se procesan para ser multiplicados con los valores de la tabla de datos para el iluminante tipo CIE y el observador 2° o 10° (detector, son los grados que ocupa el campo de visión a partir del punto focal del observador, figura 6A), para obtener los valores de las coordenadas del color x, y, z (figura 6B) [HunterLab, 2001].

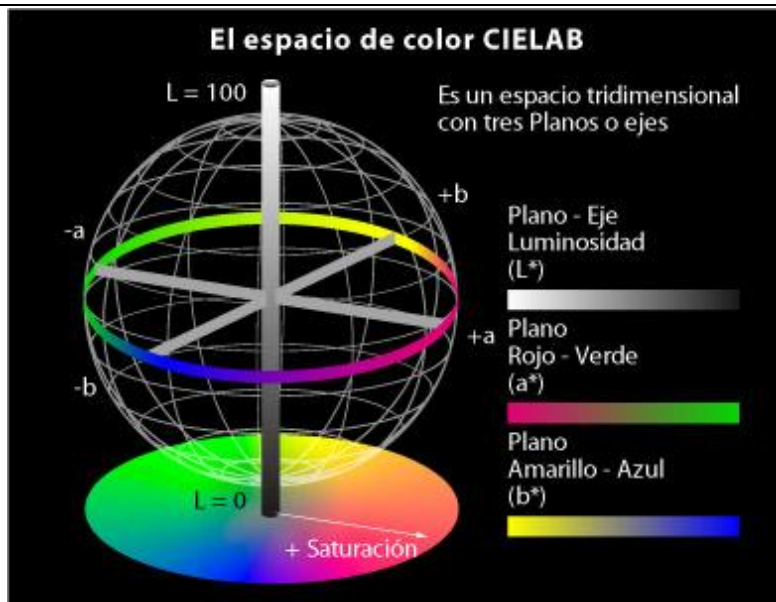
Para dar significado a los valores x, y, z, como escala de color objetiva, de manera que se han sugerido diferentes modelos para ello. El sistema *CIE L\*a\*b\** es el sistema más utilizado para determinar las características de color. Fue propuesto por el Comité Internacional de la Iluminación en 1976 (CIE por la siglas en francés: Commission Internationale de l'Eclairage) y se basa en la teoría tricromática o de los colores opuestos. Esta teoría considera que el ojo humano es capaz de reconstruir los estímulos de color mezclando las cantidades apropiadas de tres estímulos fundamentales: rojo, verde y azul [Padilla, 2010]. Esto se debe a que las células del ojo conocidas como conos son

responsables de la visión del color y la luz diurna y hay tres tipos de conos que posee el humano, los que son sensible al rojo, al verde y los sensibles al azul. A medida que las respuestas de los conos rojo, verdes y azules se remezclan en sus codificadores opuestos ocurre el desplazamiento del estímulo por el nervio óptico hacia el cerebro [HunterLab, 2001].



**Figura 6.** Análisis instrumental del color. A. Representación de los ángulos de visión que utiliza el detector del colorímetro. La fovea es la zona de la retina donde se enfocan los rayos luminosos, especializada en la visión del color [Imagen de: HunterLab, 2008b]. B. Fundamento del colorímetro [Imagen de: Hunterlab, 2001].

El espacio de color  $CIE L^*a^*b^*$  es un sistema tridimensional esférico definido por tres coordenadas colorimétricas:  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , que son magnitudes adimensionales calculadas matemáticamente (figura 7). La coordenada  $L^*$  representa la claridad o luminosidad del punto acromático, es la relación entre la luz absorbida y la luz reflejada por un objeto y adquiere valores de 0 a 100 (de negro a blanco);  $a^*$  con valor positivo define la desviación de la luminosidad hacia el rojo y con valor negativo hacia el verde y  $b^*$  con valor positivo hacia el amarillo y con valor negativo hacia el azul. Para  $a^*$  y  $b^*$  un valor de cero es neutro. [Jung *et al.*, 2003; HunterLab, 2008a; Padilla, 2010; HunterLab, 2001].



**Figura 7.** Representación de las coordinas del color con el sistema  $CIEL^*a^*b^*$ .  
[Westland, S., 2001<sup>36</sup>]

<sup>36</sup> [http://gusgsm.com/espacio\\_color\\_cie\\_lab](http://gusgsm.com/espacio_color_cie_lab) (12 mayo, 2013)

---

### 3. Justificación

Como ya se ha mencionado, las tendencias en los hábitos de consumo de alimentos giran en torno a la búsqueda de productos de alta calidad e inocuidad. El consumidor tiene en la mira productos mínimamente procesados, con menor contenido en sales y aditivos químicos, nutritivos, con apariencia agradable y fresca, sabor y textura naturales y que posean una larga vida de anaquel [Hicks *et al.*, 2009; Tuboly, 2009]. Además se busca que la tecnología implicada en su producción y conservación sea amigable con el ambiente, que tenga el mínimo gasto de energía y de recursos y que a su vez no genere desechos [Cheftel, 1995; Téllez-Luis *et al.*, 2001; Picouet *et al.*, 2008].

La Presión Hidrostática Ultra Alta utilizada como método de conservación de alimentos ha mostrado mantener estos atributos tan apreciados por el consumidor y su uso ha sido ampliamente evaluado en diferentes matrices y en diferentes pruebas de reto para evaluar su eficacia ante patógenos como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, entre otros. Sin embargo, el efecto sobre la carne (roja) fresca no ha sido evaluado de forma tan exhaustiva. Hay que recalcar que deben aplicarse los estudios necesarios para estandarizar el proceso para cada nuevo producto,

Así, se ha planteado a través de este proyecto explorar el efecto de determinadas condiciones de tratamiento<sup>37</sup> en la inactivación de dos tipos de bacterias patógenas: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium<sup>38</sup> y *Listeria monocytogenes*, que son una seria amenaza para el consumidor si llegaran a contaminar la carne (reportándose su hallazgo tanto en México, EE. UU. y Europa [Farber & Peterkin, 1991; Norrung & Buncic, 2008; Estrada *et al.*, 2004; Rubio *et al.*, 2013]). Igualmente, se representa el efecto de la presión sobre las bacterias gram-negativas y las gram-positivas pues ambos tipos muestran diferencias en su susceptibilidad a este tratamiento [Shigehisa *et al.*, 1991; Smelt, 1998; Hugas *et al.*, 2002].

También se plantea determinar los efectos de estas condiciones de tratamiento sobre la microbiota nativa de la carne, disminución de cuentas microbianas o modificación en la estructura de la comunidad, y si algún proceso asociado al tratamiento (empacado al vacío

---

<sup>37</sup> Se ha fijado el tiempo en 1 minuto y la temperatura como temperatura ambiente. Para *Salmonella* Typhimurium se evaluaron 172 MPa y 345 MPa de presión, para *Listeria monocytogenes* y microbiota nativa 345 MPa.

<sup>38</sup> Con fines prácticos, en este trabajo se le denomina *Salmonella* Typhimurium ya que todos los serovar o subsp. Typhimurium pertenece a la especie *S. enterica*

---

y/o refrigeración) favorece a ciertas poblaciones incrementando su número o incluso si facilita la colonización de las bacterias patógenas al eliminar competidores que son inocuos (como las BAL).

Aplicando presiones moderadas (menores a 200 MPa) se han reportado mejoras en el color de la carne, con un incremento del valor  $a^*$  (coloración roja) que se mantuvo estable durante algunos días en refrigeración [Jung *et al.*, 2003]. Así mismo, se han tenido reportes de que presiones moderadas (200 MPa) permiten retardar el crecimiento bacteriano en carne molida durante un periodo de 2 a 6 días de almacenamiento en refrigeración [Carlez *et al.*, 1994]. Con presiones de entre 50 y 150 MPa se ha observado una mejora en la capacidad de retención de agua de algunas carnes con pHs bajos, manteniendo carnes jugosas y con buenas características sensoriales ya que aumenta la solubilidad de proteínas actuando de forma similar al efecto del uso de aditivos como sal y polifosfatos [Chan *et al.*, 2011]. Por esta razón se ha optado por iniciar las evaluaciones con una presión moderada para conservar la carne fresca (172 MPa) y determinar si hay disminución importante en las cuentas de *S. Typhimurium* (al ser gram-negativa es más susceptibles a la presurización). Sin embargo, para sanitizar la carne fresca se recomienda presiones superiores o mayor tiempo de proceso, la USDA considera 300 MPa como la presión crítica por debajo de la cual no hay inactivación microbiana, independientemente de la duración del proceso [USDA, 2004; USDA, 2006].

Cabe mencionar que una de las limitantes que se presenta al buscar mantener la condición de fresca de la carne, logrando una inactivación microbiana adecuada, es que a presiones superiores a 345 MPa o periodos de presurización mayores a 1 minuto la carne comienza a mostrar modificaciones importantes en su color [Sanchez-Basurto *et al.*, 2012]. Siendo que el color de la carne es la primera impresión que el consumidor percibe, en gran medida de esto depende la aceptación o rechazo del producto. Por ello también se ha planteado evaluar la modificación del color de ésta al recibir los tratamientos y determinar si existe alguna diferencia relevante.

---

## 4. Hipótesis

Ya que el tratamiento con Presión Hidrostática Ultra Alta ha sido aplicado exitosamente para conservar diversos alimentos, entonces será posible prolongar el tiempo de vida de anaquel en refrigeración de la carne fresca, utilizando 345 MPa, 1 minuto, a temperatura ambiente, manteniendo mejor calidad microbiana que carne no tratada y que carne refrigerada.

## 5. Objetivos

### a) Objetivo general

Determinar si la PHUA, aplicando 345 MPa por 1 minuto a temperatura ambiente, permite inactivar patógenos y reducir las cuentas de microorganismos asociados con la descomposición de la carne fresca, determinando las modificaciones en la estructura de la población que sufre la microbiota nativa, así como los cambios del color y el pH de la carne fresca.

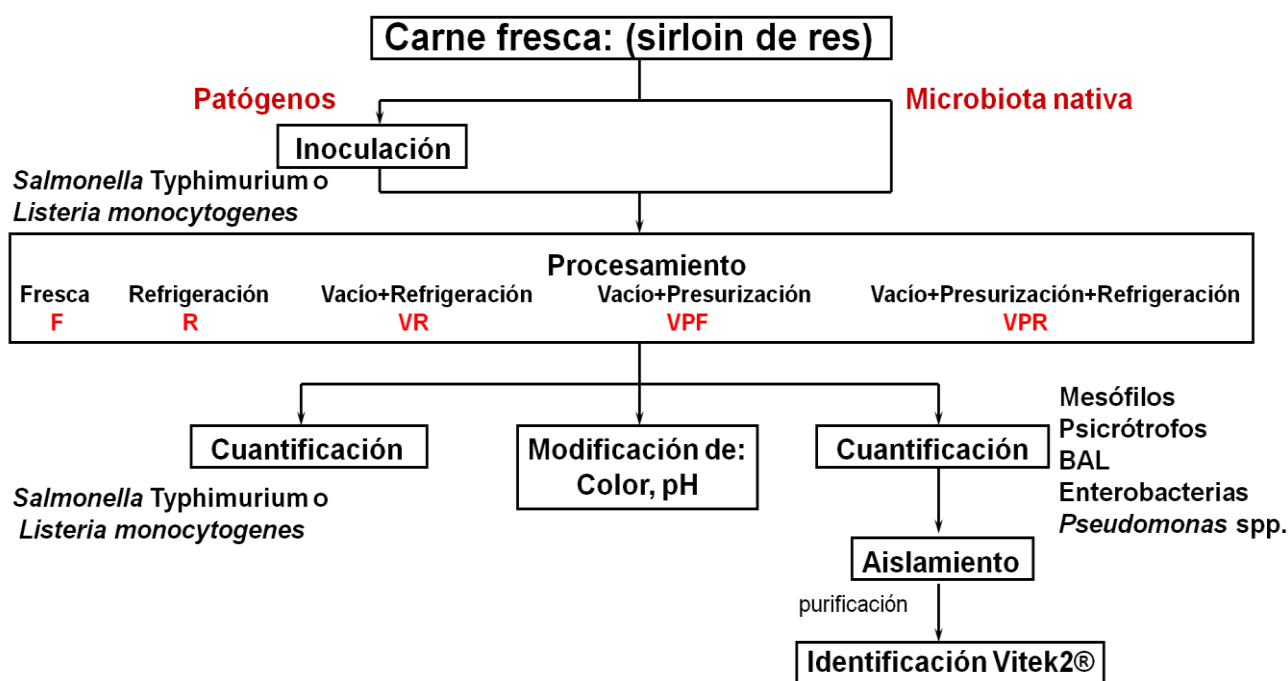
### b) Objetivos particulares

- ☞ Determinar el efecto de los tratamientos con presión hidrostática ultra alta en la inactivación de microorganismos patógenos mediante pruebas de reto: 172 y 345 MPa sobre *Salmonella Typhimurium* y 345 MPa sobre *Listeria monocytogenes*.
- ☞ Determinar el efecto de los tratamientos en la reducción de microorganismos asociados con la descomposición de la carne fresca (microbiota nativa), apreciar las modificaciones en la estructura de la población, así como identificar bacterias presentes en muestras sometidas a los diferentes procesos involucrados en estos tratamientos (empacado al vacío, presurización, refrigeración).
- ☞ Estandarizar la PCR (región V3 del gen 16S rRNA) que proporcionará los amplificadores para identificar las modificaciones en la estructura de la comunidad microbiana de la carne después de ser sometida a los tratamientos (para su uso posterior separación en DGGE).
- ☞ Determinar si los procesos involucrados en la conservación de la carne fresca utilizando PHUA (empacado al vacío, presurización, refrigeración) tienen efecto sobre el color y el pH.
- ☞ Contrastar el efecto de la PHUA como método de conservación con respecto a la refrigeración o el empacar a vacío y refrigerar.

## 6. Materiales y Métodos

El diseño experimental para este proyecto está dividido básicamente en dos partes, la primera de ellas corresponde a la evaluación del efecto de la PHUA en la inactivación de bacterias patógenas (*Salmonella Typhimurium* y *Listeria monocytogenes*) y la segunda parte corresponde al efecto sobre las cuentas y estructura de la población microbiana nativa (aquella que está relacionada con la descomposición de la carne).

La figura 8 representa el esquema general de trabajo.



**Figura 8.** Diagrama de flujo del procedimiento experimental. Las muestras R, VR y VPR fueron refrigeradas a 4°C durante 5 días. Cabe mencionar que para poder presurizar es indispensable empacar el producto al vacío.

### 6.1 Muestras y condiciones de trabajo

Para la realización de este proyecto se trabajó con carne fresca de res seleccionándose un corte de primera, Sirloin de res (corte de bovino de alto precio y alta demanda) adquirido en un supermercado al sur de la Ciudad de México.

Al momento de la compra, la carne se encontraba en refrigeración, debidamente empacada en charola de unicel y con fecha de empaque correspondiente al día de la



compra (mismo día en que fue sometida a tratamiento). Las muestras se transportaron al laboratorio, en bolsa térmica para conservar su temperatura.

En el laboratorio se procedió a pesar en condiciones asépticas e individualmente muestras de carne de 25 y 10 g, por triplicado para cada proceso a evaluar (tabla 5). Las muestras de 25 g se utilizaron posteriormente para el enriquecimiento celular previo a la extracción de DNA y las muestras de 10 g fueron utilizadas para realizar cuenta en placa.

**Tabla 5. Muestras de trabajo**

Muestra	Vacío	PHUA	Refrigeración
F	x	x	x
R	x	x	✓
VR	✓	x	✓
VPF	✓	✓	x
VPR	✓	✓	✓

La letra que etiqueta la muestra representa el proceso al que fue sometida. F corresponde a carne fresca.

La refrigeración fue durante 5 días a 4° C.

✓ el tratamiento ha sido aplicado

x el tratamiento no fue aplicado

De cada uno de los pesos indicados, una muestra se inoculó con una cuenta alta de patógeno ( $\alpha$ ), otra con una cuenta baja ( $\beta$ ) y la tercera se utilizó como control negativo para llevar a cabo las pruebas de reto.

Las muestras para F y R (aquellas que no fueron empacadas al vacío) se pesaron en el interior de bolsas para Stomacher estériles (Stomacher lab system; Seward, Reino Unido) para facilitar su manejo y reducir al mínimo la pérdida de inóculo.

Las muestras que fueron sometidas a vacío fueron pesadas en cajas Petri estériles y se traspasaron a bolsas para uso del equipo Multivac para empacar al vacío (Multivac Inc.; Kansas, EE. UU.), utilizando pinzas esterilizadas previamente. En el interior de estas bolsas las muestras fueron inoculadas superficialmente utilizando micropipeta, esperando 2 minutos a que el inóculo se adsorbiera antes de ser empacadas al vacío.

La conservación en refrigeración fue a 4° C durante 5 días [Warriss, 2003; USDA: [www.fsis.usda.gov/es/Refrigeracion/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/es/Refrigeracion/index.asp) (2010)], manteniendo las muestras en las respectivas bolsas en que se empacaron al vacío, almacenadas en conjunto en un recipiente de plástico hermético de capacidad de 1.1 L (Technoware, México). Las muestras R fueron envueltas cuidadosamente en las bolsas para Stomacher y se almacenaron junto con el resto de las muestras en refrigeración.

Para procesar las muestras con PHUA se utilizó el equipo *500 mL 100 ksi Heated HPP Lab Unit* (Elmhurst Research Inc., NY, EE. UU.), aplicando la presión correspondiente durante 1 minuto, a temperatura ambiente.

Las pruebas con 172 MPa y con 345 MPa se llevaron a cabo por triplicado bajo las condiciones descritas en la tabla 6.

**Tabla 6. Condiciones de presión y temperatura utilizadas durante la operación del equipo**

Evaluación	<i>S. Typhimurium</i> 172 MPa		<i>S. Typhimurium</i> 345 MPa		<i>L. monocytogenes</i> 345 MPa		Microbiota nativa 345 MPa	
	Presión (MPa)	Temp (°C)	Presión (MPa)	Temp (°C)	Presión (MPa)	Temp (°C)	Presión (MPa)	Temp (°C)
1	172	-----	357 364	-----	362-358 356-352	22.7-30.0 22.0-29.3	357 364	-----
2	201-200	22.2-26.2	359 360	-----	365-361 357-352	15.9-22.4 15.9-22.5	357-353	-----
3	206-204	23.0-25.5	359-354 360-357 361-357	23.8-28.8 22.3-28.8 22.8-28.3	361-356	20.3-27.5	362-357	19.8-25.6

En algunas evaluaciones se sometió a presión más de 1 lote, tomándose la máxima y la mínima presión que se registraron durante los 60 segundos de presurización cuando resultó posible, de lo contrario, se registró la más elevada. Así mismo, no en todos los casos se determinó la temperatura interna de la cámara de compresión ya que en los primeros ensayos no se logró acoplar un termopar al equipo. Las temperaturas registradas en la tabla 6 corresponden a la temperatura interna de la cámara antes de presurizar la muestra y la temperatura alcanzada con el máximo de presión.

Con los datos obtenidos se llevó a cabo el registro de los cambios de temperatura en el interior de la cámara de presurización durante el procesamiento de la muestra. De tal

manera que el aumento promedio de temperatura dentro de la cámara de presurizado fue de  $6.5 \pm 0.7^\circ$  al ascender de 0 a 345 MPa. Igualmente, se determinó la cinética de aumento de presión de 0 a 345 MPa (tabla 7), lo que corresponde a  $16.78 \pm 2.40 \text{ MPa s}^{-1}$  y un aumento de temperatura de  $0.019 \pm 0.002^\circ \text{ MPa}^{-1}$ .

**Tabla 7. Cinética de cambio de presión y cambio de temperatura**

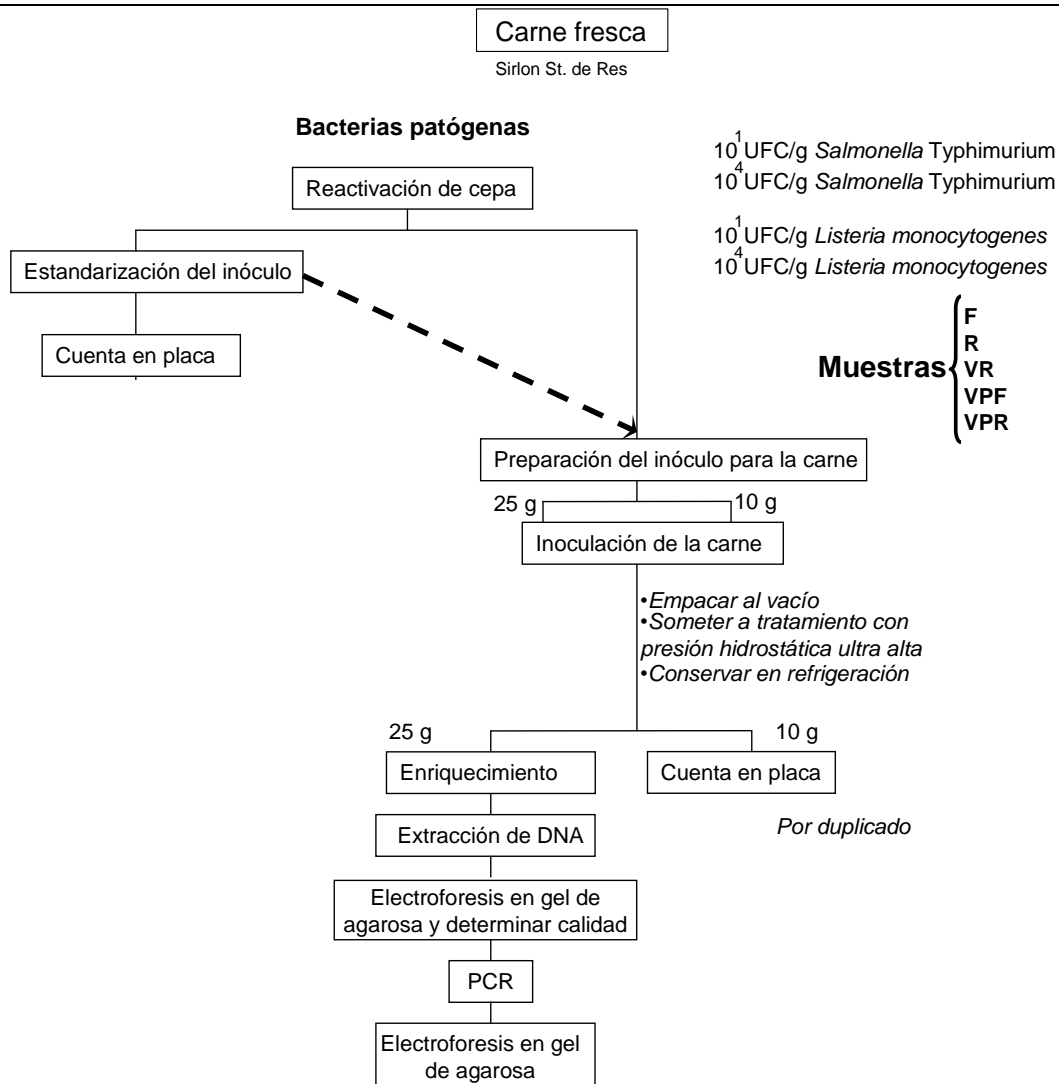
<u>MPa s<sup>-1</sup></u>	<u>ΔT (°)</u>
13.42	5.0
15.50	6.5
18.62	5.5
13.53	5.8
16.20	6.8
20.64	7.3
18.15	6.5
18.19	6.6
	7.2
	7.1
	<u>7.2</u>

## 6.2 Efecto de los tratamientos en la eliminación de bacterias patógenas

Para determinar el efecto del tratamiento con PHUA en la eliminación de bacterias patógenas se llevaron a cabo pruebas de reto con *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*<sup>39</sup>, de acuerdo al esquema general de trabajo de la figura 9.

El día previo a la compra de las muestras, la inoculación y el correspondiente tratamiento de las muestras de carne, se procedió a reactivar las cepas.

<sup>39</sup> Estas cepas forman parte de la colección del Laboratorio 324 del Conjunto E de la Facultad de Química/UNAM.



**Figura 9.** Esquema de trabajo para evaluar el efecto de la PHUA en la eliminación de bacterias patógenas. F, carne fresca; R, carne refrigerada 5 días a 4° C; VR, carne empacada al vacío y refrigerada 5 días a 4° C; VPF, carne empacada al vacío, presurizada; VPR, carne empacada al vacío, presurizada y refrigerada 5 días a 4° C. Los oligos a utilizar son especie-específicos.

### 6.2.1 Reactivación de cepas puras

La cepa correspondiente conservada en medio de cultivo con glicerol al 20% y almacenada en ultracongelador a -66° C, se descongeló agitando en vortex a máxima velocidad hasta obtener una suspensión bacteriana de la cual se tomaron 20 µL para inocular un vial con 4.5 mL de Infusión Cerebro Corazón (medio BHI, BD•BBL, EE. UU.) y se incubó durante 18 h a 37° C. Posteriormente se tomó una alícuota de 500 µL del cultivo y se inoculó un vial con 4.5 mL de medio BHI, incubando por 8 h a 37° C. Después del periodo de incubación, de este vial se tomó una alícuota de 500 µL del cultivo y se inoculó en un vial con 4.5 mL de solución salina isotónica (SSI, solución salina isotónica, es decir, 0.85% de NaCl). Este último vial corresponde a la dilución 10<sup>-1</sup> y a partir de éste se realizaron diluciones decimales seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>.

---

Así mismo, para poder identificar las diluciones correspondientes a la cuenta alta y a la cuenta baja de bacterias ( $10^4$  y  $10^1$  UFC/mL) y asegurar la concentración bacteriana utilizada en las muestras, se realizó la estandarización del inóculo.

### 6.2.2 Estandarización del inóculo

Para llevar a cabo la primera estandarización del inóculo y determinar las diluciones adecuadas para el inóculo  $\alpha$  y  $\beta$  (cuenta celular alta y cuenta baja respectivamente), se efectuaron diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  utilizando SSI como diluyente.

De cada dilución se tomaron los microlitros necesarios de acuerdo a la proporción 100  $\mu$ L de cultivo/20 mL de medio a inocular, para preparar las diluciones correspondientes y realizar la siembra por extensión superficial para cuenta en placa.

Con esta proporción se inoculó un vial con medio BHI (22.5  $\mu$ L de cultivo/4.5 mL BHI) y se efectuaron las diluciones 1:10 necesarias en viales con 4.5 mL de SSI, (tomando alícuotas de 500  $\mu$ L respectivamente). De cada dilución se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L para llevar a cabo la siembra por extensión superficial, sembrando por duplicado cada dilución.

Para la cuenta en placa de *S. Typhimurium* se utilizó Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD, BD•Difco; EE. UU.), dejando incubar 24 h a 37° C. Este medio de cultivo es selectivo y diferencial para bacilos gram-negativos entéricos, está incluido en la USP (United States Pharmacopeia) y en el Microbiology Laboratory Guidebook de la USDA/FSIS para las pruebas 'presencia-ausencia de *Salmonella*'<sup>40</sup> [USDA/FSIS, 1998<sup>41</sup>]. La cuenta en placa se realiza considerando el intervalo de confianza de 25 a 250 colonias, por arriba o por debajo de estos valores se considera como *valor estimado*. Se cuantifican las colonias rojas con centro negro pues una vez que *Salmonella* consume la poca xilosa presente en el medio, continúa consumiendo la lisina resultando en la alcalinización y con ello el indicador (rojo de fenol) permanece rojo. La producción H<sub>2</sub>S característico de este género se aprecia

---

<sup>40</sup> MCD Lab, México, agosto 2011: <http://www.mcd.com.mx/>

<sup>41</sup> Revisar nota 34 al pie de página.

---

gracias al sistema indicador tiosulfato de sodio y citrato férrico con lo que se forma un precipitado negro<sup>42</sup>.

El Agar Oxford<sup>43</sup> (Oxford Listeria Agar Base, Acumedia/Neogen Corp., EE. UU.) se utiliza para la cuantificación de *L. monocytogenes* y *Listeria* spp. El medio inoculado se incubaba a 37° C. Las colonias que se desarrollan son de cerca de 1 mm de diámetro, rodeadas por un halo negro tras 24 horas de incubación debido a la reacción positiva por la hidrólisis de esculina. Después de 48 horas el diámetro usualmente es de 2 a 3 mm, manteniendo el halo negro pero desarrollando un centro hundido.

Para tener la estimación de la carga microbiana inoculada en las muestras de carne, después de realizar la reactivación de la cepa se trabaja como se ha indicado en la estandarización del inóculo pero solamente con las diluciones elegidas como  $\alpha$  y  $\beta$ .

### 6.2.3 Inoculación de la muestra de carne

Se llevó a cabo la reactivación de la cepa como ya se ha descrito y se trabajó de forma individual con la dilución  $10^{-1}$  y  $10^{-5}$  ( $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente).

De la dilución correspondiente se tomaron los microlitros necesarios de acuerdo a la proporción 100  $\mu$ L de cultivo/20 g de carne<sup>44</sup>.

Trabajando con las muestras de 25 g de carne, éstas se inocularon superficialmente utilizando micropipeta con 125  $\mu$ L de cultivo. Se esperaron de 1 a 2 minutos para procesarla de acuerdo a la muestra de trabajo (tabla 5), permitiendo que el inóculo se adsorbiera. Estas muestras fueron utilizadas posteriormente para llevar a cabo enriquecimiento celular y extracción de DNA para PCR especie-específico para el caso de patógenos o para la región V3 del gen 16S rRNA para la microbiota nativa.

Las muestras de 10 g de carne se inocularon siguiendo el procedimiento anterior, utilizando un inóculo de 50  $\mu$ L de cultivo. Posteriormente estas muestras se utilizaron para trabajar cuenta en placa.

---

<sup>42</sup> MCD Lab, México, octubre 2012: <http://www.mcd.com.mx/pdfs/AGAR%20XLD.pdf>

<sup>43</sup> Mast Group, Reino Unido, agosto 2011: [http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU366\\_SPA.pdf](http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU366_SPA.pdf); Acumedia/NeogenCorp, EE. UU.: [http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7428\\_PI.pdf](http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7428_PI.pdf)

<sup>44</sup> Sirlon St. de Res.

---

### **6.3 Pruebas de reto para patógenos**

#### **6.3.1 Método tradicional**

##### **6.3.1.1 Procesamiento de las muestra de carne para cuenta en placa**

Las muestras de 10 g empacadas al vacío se traspasaron de forma individual a bolsas para Stomacher, utilizando pinzas esterilizadas previamente a cada manipulación, y se utilizó SSI para realizar 3 lavados de los empaques, vertiendo estos lavados junto con la carne en la bolsa para Stomacher, completando un volumen final de 90 mL de SSI.

A las muestras que se trabajaron directamente en bolsas para Stomacher se les adicionaron directamente en la bolsa 90 mL de SSI.

Las muestras se homogenizaron utilizando Stomacher (Laboratory Bender, Stomacher 400; Seward, Reino Unido) durante 4 minutos a velocidad media. De la suspensión obtenida se recuperó 1 mL y se transfirió a tubos con 9 mL de SSI para llevar a cabo las diluciones seriadas necesarias. De la dilución correspondiente se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L y se inoculó el medio adecuado para la cepa de trabajo y se sembró por extensión superficial, sembrando por duplicado cada dilución.

Las placas se incubaron bajo las condiciones indicadas para cada medio de cultivo en particular, como se describió en la estandarización del inóculo.

Los resultados de las muestras F se consideran como el inóculo inicial, es decir, la cuenta representa las UFC  $g^{-1}$  inoculadas en las muestras. Siendo así, el inóculo final, recuperado de las demás muestras, es comparado con este valor inicial para determinar el efecto del tratamiento en la inactivación bacteriana.

#### **6.3.2 Método molecular**

##### **6.3.2.1 Procesamiento de las muestra de carne para enriquecimiento celular**

Se recuperaron de forma individual las muestras de 25 g transfiriéndolas de las bolsas en que fueron empacadas al vacío a bolsas para Stomacher, utilizando pinzas esterilizadas previamente a cada manipulación. Se adicionaron 250 mL de SSI a cada muestra y con parte de los 250 mL de SSI se realizaron 3 lavados a las bolsas donde estaban empacadas las muestras.

---

Las muestras que no fueron empacadas al vacío se trabajaron en las bolsas para Stomacher en que fueron almacenadas, adicionándoles el volumen de SSI correspondiente.

Las muestras se homogenizaron en Stomacher durante 4 minutos a velocidad media y de la suspensión obtenida se recuperó 1 mL. Éste se transfirió a un tubo de ensayo con 9 mL de medio BHI, esto se repitió para 2 tubos más (para tener muestra por triplicado) incubando durante 14 h a 37° C.

De los tubos de BHI se recuperó 1 mL de cultivo transfiriendo a tubos Eppendorf, trabajando por duplicado cada muestra. Para hacer la cosecha, las células se centrifugaron a 14 000 rpm durante 10 min (Microcentrífuga Hermle Z160M; Barnstead International, Iowa, EE. UU.). Este procedimiento se realizó dos veces más para obtener las células de un volumen de 3 mL<sup>45</sup>, descartando el sobrenadante después de cada centrifugación. Después de la última centrifugación se retiró todo el BHI remanente con micropipeta, procurando no extraer el pellet formado y se adicionaron 500 µL de SSI, resuspendiendo el pellet con vortex y centrifugando durante 5 minutos a 14 000 rpm. El objetivo de este lavado es eliminar posibles inhibidores de la PCR presentes en el BHI [Rossen *et al.*, 1992].

Finalmente se retiró toda la SSI con micropipeta, procurando no extraer el pellet y se mantuvo a -20° C hasta el momento de la extracción de DNA.

#### **6.3.2.2 Extracción de DNA mediante el kit Fast ID (Fast ID/DNA extraction kit; Genetic ID NA, Inc., Iowa, EE. UU.)**

Se retomó la biomasa recuperada de la cosecha celular. Al tubo Eppendorf se le adicionó la punta de una espátula de lisozima (Lysozyme from Chicken Egg White/SIGMA) y 500 µL de buffer de lisis y se incubó durante 30 minutos a 65° C con agitación (300 rpm).

Se adicionaron 10 µL de proteinasa K (Proteinasa K from *Tritirachium album*/SIGMA), de concentración 1mg/mL, y se incubó durante 30 minutos a 65°C con agitación (300 rpm).

---

<sup>45</sup> En caso de que el volumen de células fuera poco, este procedimiento se repitió lo necesario para obtener una cantidad de biomasa que se considerara adecuada.



---

Después de esta segunda incubación, se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se agitó manualmente por inversión del tubo hasta formar una emulsión. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 minutos y se recuperaron 400  $\mu\text{L}$  de sobrenadante en un microtubo *Binding column*, procurando no extraer parte de la interfase formada durante los tratamientos anteriores. Se adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de buffer *Genomic bind* y se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 minutos. En los casos en que no toda la muestra pasó a través de la columna, se volvió a centrifugar a 1 000 rpm durante 5 minutos.

Se lavó la columna con 800  $\mu\text{L}$  de *Genomic wash* y se centrifugó a 10 000 rpm, 5 minutos. Posteriormente se lavó la columna con 800  $\mu\text{L}$  de etanol al 75% y se centrifugó a 10 000 rpm, 5 minutos. Este paso se repitió con un segundo lavado y un último lavado se efectuó con 1000  $\mu\text{L}$  de etanol al 75% centrifugando bajo las mismas condiciones.

La columna se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y se centrifugó a 14 000 rpm durante 1 minuto para secar el etanol remanente. La columna se colocó en un nuevo Eppendorf y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de *buffer TE 1x*, incubando 10 minutos a 65° C con agitación (300 rpm).

Después de la incubación se centrifugó 1 minuto a 10 000 rpm. La columna se descartó pues en este paso el DNA ha quedado en suspensión en el buffer TE. Se evaluó la calidad (espectrofotometría) e integridad (en gel de agarosa al 1%) de este DNA genómico para su posterior uso en las PCR correspondientes. Su conservación fue a -20° C.

Para la evaluación de la calidad del DNA se determinó la relación de la absorbancia a 260nm y a 280nm mediante espectrofotometría (Agilent 8453E Spectroscopy System; Agilent Technology).

La concentración del DNA extraído se determinó utilizando una celda de 0.2 cm, aplicando la siguiente ecuación:

$$(A_{260 \text{ nm}})(5)(50 \mu\text{g/mL DNA doble cadena}) = \text{Concentración del DNA } [\mu\text{g/mL}]$$

---

### 6.3.2.3 Electroforesis horizontal (gel de agarosa)

Para determinar la extracción exitosa de DNA se elaboró un gel de agarosa al 1%. Para esto, se utilizó 1 g de agarosa por 100 mL de <sup>46</sup>buffer TBE 1x, disponiendo la agarosa en un matraz de 250 mL, se le adicionó el buffer y se calentó en microondas para disolver.

La mezcla se vertió en una charola de electroforesis a la cual previamente se le colocaron los peines para formar los pozos y se permitió la solidificación del gel durante unos minutos, tiempo después del cual se retiraron los peines y se introdujo la charola en la cámara para electroforesis (BIO-RAD PowerPac Basic, EE.UU.; Pharmacia Biotech GNA 100, Suecia). Esta cámara se llenó con buffer TBE 1x, sumergiendo el gel y permitiendo que los pozos se llenaran con el buffer.

Para cargar las muestras en el gel se mezclaron 0.5 µL de buffer de carga 6x (6x DNA Loading buffer, Fermentas) y 5 µL de muestra de DNA o de marcador de peso molecular (Mass Ruler Low Range DNA Ladder, Fermentas o Gene Ruler Low Range DNA Ladder, Fermentas).

La electroforesis se corrió a 90 V durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se retiró el gel de la charola y se tiñó en una solución con bromuro de etidio (0.5 mg/L) durante 10 a 15 minutos. Se visualizó utilizando transiluminador y se procedió a fotografiar el gel utilizando el equipo Kodac (Kodac Image Station, Molecular Imaging System, Carestream Health, Inc., EE. UU.).

### 6.3.2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En la tabla 8 se muestran los oligonucleótidos (oligos) para la PCR de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*, en la tabla 9 las condiciones de reacción del programa correspondiente (Termociclador T-Personal Combi; Biometra, Alemania) y en la tabla 10 se enlistan los reactivos y las concentraciones correspondientes para la mezcla de reacción para la PCR.

---

<sup>46</sup> Buffer TBE 1x. Preparar a partir de una solución stock de TBE 10x, llevando a volumen final con agua destilada. La solución TBE 10x (Tris-Borato-EDTA) está compuesta por 1 g NaOH, 108 g Tris base, 55 g ácido bórico, 7.4 g EDTA, aforando con agua destilada a 1 L.

**Tabla 8. Oligonucleotidos (oligos) especie-específicos**

Bacteria blanco	Oligo	Secuencia del oligo	Referencia
<i>Salmonella</i> spp.	ltsf	5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3'	Chiu <i>et al.</i> , 2005
	ltsr	5'-TATAGCCCCATCGTGTAGTCAGAAC-3' (312bp)	
<i>L. monocytogenes</i>	Hylf	5'-CGCAACAACTGAAGCAAAGG-3'	Park <i>et al.</i> , 2006
	Hylr	5'-TTGGCGGCACATTTGTCAC-3' (210 bp)	

**Tabla 9. Condiciones de la reacción de PCR para: *Salmonella* y *Listeria monocytogenes***

<b>1 ciclo</b>	
Desnat. inicial	94°C 3 m
<b>35 ciclos</b>	
Desnaturalización	94°C 30 s
Alineamiento	61°C 35 s
Extensión	72°C 35 s
<b>1 ciclo</b>	
Ext. final	72°C 10 s

**Tabla 10. Concentración de reactivos utilizados en la reacción de PCR**

Reactivo	Concentración del reactivo	Concentración del reactivo en tubo de reacción	µL
<i>Buffer de la enzima</i>	10x	1x	5
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	25 mM	2.5 mM	5
<i>Tween-20</i>	0.1%	0.001%	5
<i>Glicerol</i>	50%	12%	12
<i>dNTP's</i>	10 mM	0.2 mM	1
<i>Oligo F</i>		10 pmol	1
<i>Oligo R</i>		10 pmol	1
<i>Taq polimerasa</i>	5 U/µL		1
<i>DNA*</i>	Variable		10
<i>H<sub>2</sub>O estéril</i>			9
<b><i>Volumen total</i></b>			<b>50</b>

*Oligo F*, oligo forward o progresivo; *Oligo R*, oligo reverso.

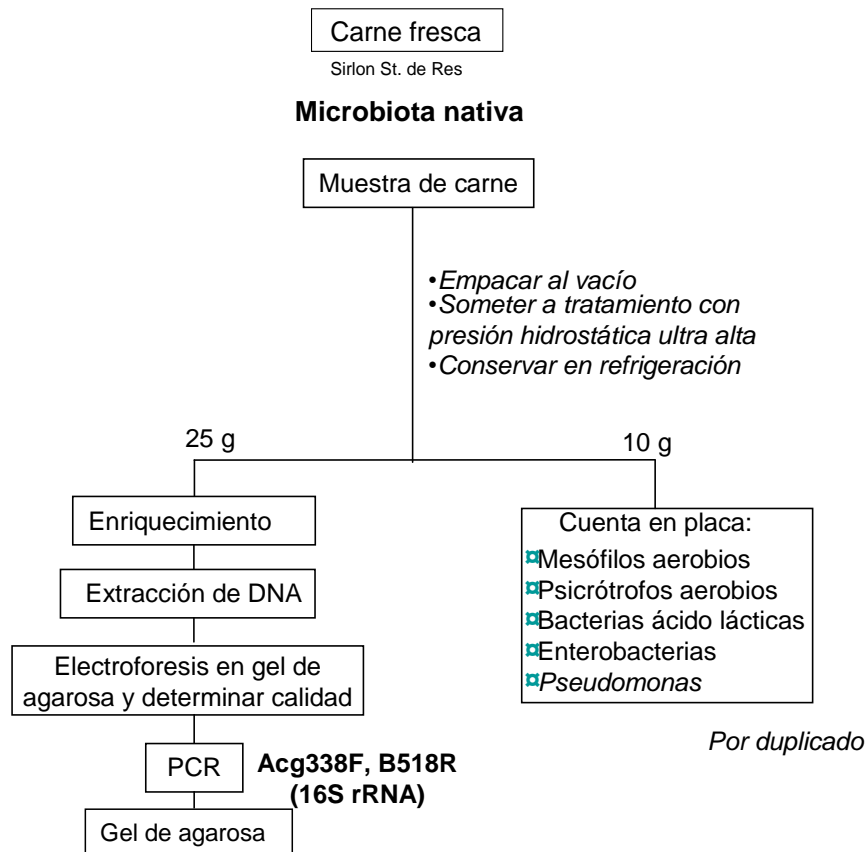
\*DNA ~50ng/µL

Para determinar la amplificación positiva del producto de PCR para *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y para el fragmento del gen 16S región V3 se elaboró un gel de agarosa al 2% (de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.3.3.3 *Electroforesis horizontal*), efectuando una electroforesis a 70 V durante 60 minutos.

La obtención de una banda de peso molecular similar al esperado para el par de oligos utilizado se considera prueba positiva y la ausencia de banda se considera como negativa.

## 6.4 Efecto de los tratamientos sobre la microbiota nativa

Se trabajó siguiendo el esquema representado en la figura 10 con el fin de evaluar las modificaciones en las cuentas de la microbiota nativa (método tradicional) como resultado del efecto de los tratamientos; así como estandarizar la PCR con la cual se obtendrán los amplificados a separar en DGGE para el estudio de la modificación en la estructura de la comunidad microbiana (método molecular).



**Figura 10.** Esquema de trabajo para evaluar el efecto de la PHUA sobre la microbiota nativa de la carne. Los oligos para la PCR tienen como blanco la región V3 del gen 16S rRNA de bacterias.

### 6.4.1 Método tradicional

#### 6.4.1.1 Cuenta en placa

Para el estudio de las modificaciones en las cuentas de la microbiota nativa se utilizó la misma técnica descrita en el apartado 6.3.2.1 *Procesamiento de las muestra de carne para cuenta en placa*.

Se evaluaron mesófilos aerobios y psicrótrofos aerobios, ambos en Agar Cuenta Estándar (BD•Difco; EE. UU.), enterobacterias en Agar Bilis Rojo Violeta (BD•Difco; EE.

---

UU.), bacterias ácido lácticas (BAL) en Agar MRS (BD•Difco; EE. UU.) y *Pseudomonas* spp. en Agar F para *Pseudomonas* (BD•Difco; EE. UU.). Y se incubaron de la siguiente manera: Mesófilos aerobios 24 h, 37° C; Psicrótrofos aerobios 10 días, 5° C; enterobacterias 24 h, 37° C; BAL 24 h, 30° C; *Pseudomonas* 24 h, 37° C realizando la observación correspondiente y permitiendo transcurrir 18 h más a temperatura ambiente para una segunda observación.

En Agar Cuenta Estándar se cuantifican todas las colonias en un intervalo de confianza de 30 a 300 UFC. En Agar Bilis Rojo Violeta, un medio recomendado para llevar a cabo la detección y enumeración de coliformes, las colonias que fermentan la lactosa acidificarán el medio con lo cual el indicador (rojo neutro) vira a rojo, de modo que se consideran las colonias rojas a púrpuras. El Agar MRS permite el desarrollo de lactobacilos y otras BAL, el magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos, además de que el citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias gram-negativas. De esta manera, se cuentan las colonias que generalmente son pequeñas, blanco-grisáceas presentes en un intervalo de confianza de 25 a 250 UFC y que corresponderían a las BAL. El agar F para *Pseudomonas* es un medio utilizado para el aislamiento, la detección y la diferenciación de especies de *Pseudomonas* spp. que producen fluoresceína (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens* o *P. putida*) por lo que después del periodo de incubación se lleva a cabo la cuenta examinando las colonias bajo la luz UV (260 nm). Las colonias positivas se observan color amarillo o amarillo-verdoso fluorescente<sup>47</sup>.

Al igual que en la evaluación de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*, los resultados de las muestras F se consideran como el inóculo inicia.

#### **6.4.1.2 Identificación utilizando el sistema Vitek® 2**

##### **6.4.1.2.1 Muestras y aislamiento**

Se seleccionaron 24 colonias recuperadas de las placas inoculadas para la cuantificación de los diferentes grupos microbianos estudiados para evaluar la microbiota nativa. En la tabla 11 se enlistan las etiquetas de estas colonias y su origen.

---

<sup>47</sup> Información sobre los detalles de los medios de cultivo extraída de: [www.britanialab.com.ar/](http://www.britanialab.com.ar/) y <http://www.mcd.com.mx/> (15 mayo, 2013)

**Tabla 11. Colonias seleccionadas para aislamiento**

<b>Aislado</b>	<b>Origen</b>	<b>Aislado</b>	<b>Origen</b>
<b>μ1</b>	*STD S <sub>13</sub>	<b>μ13</b>	*STD Sμ <sub>2</sub>
<b>μ2</b>	*STD S <sub>13</sub>	<b>μ14</b>	*STD μ <sub>22</sub>
<b>μ3</b>	STD S <sub>23</sub>	<b>μ15</b>	*STD Sμ <sub>12</sub>
<b>μ4</b>	*STD S <sub>13</sub>	<b>μ16</b>	*STD Sμ <sub>2</sub>
<b>μ5</b>	STD S <sub>13</sub>	<b>μ17</b>	STD Sμ <sub>02</sub>
<b>μ6</b>	STD S <sub>23</sub>	<b>μ18</b>	*STD S <sub>12</sub>
<b>μ7</b>	STD μ <sub>02</sub>	<b>μ19</b>	*STD S <sub>03</sub>
<b>μ8</b>	STD μ <sub>02</sub>	<b>μ20</b>	*STD S <sub>12</sub>
<b>μ9</b>	STD S <sub>03</sub>	<b>μ21</b>	*STD S <sub>12</sub>
<b>μ10</b>	MRS S <sub>03</sub>	<b>μ22</b>	*STD S <sub>12</sub>
<b>μ11</b>	BRVA S <sub>03</sub>	<b>μ23</b>	STD S <sub>21</sub>
<b>μ12</b>	Ps S <sub>03</sub>	<b>μ24</b>	Ps S <sub>03</sub>

\*STD representa medio de cultivo Agar Cuenta Estándar utilizado para evaluar psicrotrofos, STD Agar Cuenta Estándar empleado para mesófilos, BRVA corresponde al Agar Bilis Rojo Violeta y Ps al Agar F para *Pseudomonas*.

Trabajando de forma individual para cada colonia se llevó a cabo lo siguiente para obtener aislados:

La colonia seleccionada se recuperó con palillo de madera estéril y se inoculó en un vial con 4.5 mL de BHI. Se incubó a 37° C durante 24 hrs y del cultivo se realizó una tinción de Gram para determinar la pureza del cultivo. Para las cepas puras, a partir de este BHI se sembró una placa de Agar Nutritivo (BD•Difco; EE. UU.) por medio de estría por cuadrante radial y se incubó 24 horas a 37° C. Se observó la morfología macroscópica de las colonias aisladas y se seleccionó una de ellas para obtener un frotis para realizar tinción de Gram y para resembrar en vial con 4.5 mL de BHI. Igualmente, a partir del medio sólido (Agar Nutritivo, AN), se realizó la prueba de la catalasa colocando una pequeña fracción de la colonia recuperada con un palillo de madera estéril. Se adicionó una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se consideró prueba positiva la presencia de burbujeo (catalasa +) y como prueba negativa la ausencia de burbujeo (catalasa -).

Al haber detectado más de una morfología en el frotis realizado, se retomó la última placa de AN y se picó una de las colonias aisladas correspondiente a la morfología macroscópica descrita para la colonia seleccionada. Ésta se resembró por medio de estría en cuadrante radial en una nueva placa de AN y se repitió el proceso ya descrito para hasta obtener un aislamiento exitoso. En caso de conseguirlo, del cultivo puro del vial con BHI se recuperaron 1 200 μL y se resuspendieron en microtubos con 300 μL de glicerol para su conservación en ultracongelación a -66° C.

---

Los aislados exitosos se conservaron en glicerol como ya se ha descrito, sin embargo, previo al trabajo con el equipo Vitek® 2 se reactivaron del mismo modo descrito para reactivar cepas puras (apartado 6.2.1). Del vial en que se reactivaron se transfirieron a Agar Soya Trypticaseína, TSA, (BD•Difco; EE. UU.) sembrando por estría por cuadrante radial, incubando 24 h a 37° C y corroborando la pureza del aislado por medio de una tinción de Gram.

#### **6.4.1.2.2 Identificación de los aislados**

Se reactivaron las cepas seleccionadas conservadas en glicerol procediendo de la misma manera que se ha descrito en el apartado 6.2.1 *Reactivación de cepas puras*. Después de la incubación a 37° C por 24 h, se inocularon las cepas en medio TSA incubando 24 h a 37° C.

Trabajando de forma independiente para cada muestra, se tomó una asada de crecimiento y se ajustó el inóculo entre 0.5 a 0.6 en la escala de Mc Farland ( $1.5 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>), con solución salina al 0.45%. Habiendo hecho el ajuste del inóculo se procedió a programar la identificación utilizando el sistema Vitek® 2 (Vitek 2 Laboratory Data Management, bioMérieux; EE. UU.). Este sistema automatizado permite la identificación de bacterias a partir de su crecimiento y respuesta a pruebas bioquímicas y de resistencia a antibióticos (si es el caso particular) como ya se ha descrito<sup>48</sup>. Para bacterias gram-negativas se utilizaron tarjetas de identificación de “*Enterobacteriaceae* y gram-negativos no fermentadores de glucosa” (BioMérieux, Inc.; EE. UU.). Para la identificación de bacterias gram-positivas se trabajó de la misma manera pero utilizando tarjetas para identificación de “Enterococos, estreptococos y un determinado grupo de gram-positivos” (BioMérieux, Inc.; EE. UU.).

### **6.4.2 Método molecular**

#### **6.4.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa región V3, gen 16S rRNA**

Para el caso de la PCR para el estudio de las modificaciones de la microbiota nativa, el blanco de la amplificación es un fragmento de la región V3 del gen 16S del rRNA. Los oligonucleótidos utilizados se describen en las tablas 12 y 13 se describen las condiciones del programa de amplificación.

---

<sup>48</sup> 2.5.2 Identificación de bacterias: Sistema Vitek® 2

**Tabla 12. Oligos utilizados para la evaluación de las modificaciones en la microbiota nativa**

<b>Oligo</b>	<b>Secuencia del oligo</b>	<b>Referencia</b>
<b>Agc338f *</b>	5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG -3'	Ampe <i>et al.</i> , 1999
<b>B518R</b>	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3' (233bp)	

\*El oligo Agc338f lleva una cola de GC's en el extremo 5':

5'CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G

**Tabla 13. Condiciones de la reacción de PCR para Agc338f-B518R**

<b>1 ciclo</b>	
Desnat. inicial	94°C 5 m
<b>20 ciclos</b>	
Desnaturalización	94°C 1 m
Alineamiento	65°C 1 m
Extensión	72°C 3 m
<b>10 ciclos</b>	
<b>Desnaturalización</b>	94°C 1 m
<b>Alineamiento</b>	55°C 1 m
<b>Extensión</b>	72°C 3 m
<b>1 ciclo</b>	
<b>Ext. Final</b>	72°C 3 m
<b>Enfriamiento</b>	4° C

**Tabla 14. Concentración de reactivos utilizados en la reacción de PCR para Agc338f-B518R**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración del reactivo</b>	<b>Concentración del reactivo en tubo de reacción</b>	<b>µL</b>
<b>Buffer de la enzima</b>	10x	1x	5
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	2.5 mM	5
<b>Albúmina Sérica Bovina</b>		400 ng/µL	5
<b>dNTP's</b>	10 mM	0.2 mM	1
<b>Oligo F</b>		10 pmol	1
<b>Oligo R</b>		10 pmol	1
<b>Taq polimerasa</b>	5 U/µL		1
<b>DNA*</b>	variable		10
<b>H<sub>2</sub>O desionizada estéril</b>			cbp 50

\*DNA 50 a 90 ng/µL

Para los primeros ensayos se utilizaron solamente los componentes básicos para una PCR (buffer de la enzima, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, oligo F, oligo R, Taq polimerasa y DNA); posteriormente se evaluó el uso de Albúmina Sérica Bovina (ASB) y se optó por utilizar glicerol y tween como en el caso de la PCR para bacterias patógenas, incluyendo el uso de agua desionizada (tabla 14).



Se elaboró un gel de agarosa al 2% (de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.3.3.3 *Electroforesis horizontal*), corriendo una electroforesis a 70 V durante 60 minutos para determinar la amplificación positiva del peso del fragmento esperado.

## 6.5 Efecto de los tratamientos en el pH

La determinación del pH se llevó a cabo con los triplicados de la evaluación del efecto de 345 MPa sobre *L. monocytogenes* y con una de las repeticiones del efecto de 345 MPa sobre *S. Typhimurium*. Por lo cual, para cada muestra se registraron 4 valores de pH.

Las muestras utilizadas fueron los controles negativos de inoculación que se trabajaron para el enriquecimiento celular. Del homogenizado de carne con SSI se transfirieron de 15 a 25 mL a un vaso de precipitados, procurando evitar fibras de carne. A este volumen de homogenizado se le determinó el pH potenciométricamente (Jenway 3020 pHmeter, Reino Unido).

## 6.6 Efecto de los tratamientos en el color de la carne fresca

La evaluación del color se llevó a cabo mediante medición espectrofotométrica utilizando un colorímetro Minolta (Minolta, Spectrophotometer, CM-3600d; Konica Minolta Sensing, Inc., EE. UU.). Se efectuó la determinación de los valores del sistema CIEL\*a\*b\*, con incidencia de luz solar o luz de día (D65) sobre las muestras, ya que ésta se considera un cuerpo opaco (carne roja fresca). Las condiciones del análisis colorimétrico se refieren en la tabla 15.

**Tabla 15. Condiciones de análisis en la evaluación instrumental del color**

<b>Características</b>	<b>Condición</b>
<b>No. de disparos o flashes</b>	1
<b>Estándar</b>	Nulo
<b>Energía UV</b>	Incluida
<b>Componente especular</b>	Excluido
<b>Área de visión</b>	Pequeña
<b>Iluminante</b>	D65 (luz de día, natural 6504K)
<b>Detector</b>	10°
<b>Sistema de reporte del color</b>	CIE L* a* b*
<b>No. de mediciones por muestra</b>	11

La calibración del equipo se realizó con ayuda de un negro y un blanco suministrados por el proveedor.

---

Las muestras (sin inocular) F, R, VR, VPF y VPR por triplicado fueron procesadas como ya se ha mencionado de acuerdo al tratamiento que les corresponde. Después del tratamiento, las muestras se extrajeron del empaque y fueron fragmentadas en cortes de 1 cm<sup>3</sup> en condiciones asépticas, evitando zonas con grasa intramuscular y se envolvieron con película autoadherente (Kleen Pack, Kimberly-Clark de México) evitando la formación de burbujas de aire.

Por muestra de carne se evaluaron 11 segmentos, recuperados de entre las 3 réplicas. Se evaluó el color utilizando el sistema *CIE L\*a\*b\**, donde **L\*** corresponde a la claridad o luminosidad, **a\*** representa la desviación del punto acromático correspondiente al tono de luminosidad hacia el rojo (**a\*** con valor positivo para rojo y con valor negativo verde) y **b\*** la desviación hacia el amarillo (valor positivo para color amarillo y con valor negativo azul). Con estos valores se determinó el  $\Delta E^*$  dado que representa el *valor del cambio total del color* que es la evolución conjunta de los 3 parámetros del color [Jung *et al.*, 2003; Ercolini *et al.*, 2006].

$\Delta E^*$  se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta E^* = [ (L^* - L^*_{Ref})^2 + (a^* - a^*_{Ref})^2 + (b^* - b^*_{Ref})^2 ]^{1/2}$$

Los valores de referencia corresponden a la carne fresca (muestra F).

---

## 7. Resultados y discusión

### 7.1 Efecto de la PHUA en la eliminación de bacterias patógenas

#### 7.1.1 Efecto de la PHUA sobre *Salmonella* Typhimurium

##### 7.1.1.1 Cuantificación de la inactivación

##### 7.1.1.1.1 Estandarización del inóculo de *S. Typhimurium*

Para efectuar las pruebas de reto se estandarizó el inóculo por medio de cuenta en placa (tabla 16) para seleccionar aquellas diluciones que fueran adecuadas para trabajar con una concentración alta de células ( $\alpha$ ,  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>) y una concentración baja ( $\beta$ ,  $10^1$  UFC mL<sup>-1</sup>).

**Tabla 16. Estandarización del inóculo, *Salmonella* Typhimurium**

Dilución	Log UFC mL <sup>-1</sup>
10 <sup>-1</sup>	5.74
10 <sup>-2</sup>	4.92
10 <sup>-3</sup>	3.96
10 <sup>-4</sup>	3.08
10 <sup>-5</sup>	2.18
10 <sup>-6</sup>	1.00

De acuerdo con la NOM-034-SSA1-1993<sup>49</sup>, la NOM-194-SSA1-2004<sup>50</sup> y NOM-213-SSA1-2002<sup>51</sup>, *Salmonella* spp. debe estar ausente al analizar muestras de 30, 25 y 30 g de carne, respectivamente. Teniendo esta consideración se planteó el uso de una concentración baja de inóculo para el ensayo, para así determinar el efecto de la PHUA sobre una posible contaminación accidental con el patógeno. El ensayo con concentración alta de inóculo se realizó para cuantificar la supervivencia y poder apreciar con mayor nitidez el efecto de la inactivación sobre los patógenos en la carne al aplicar los diferentes procesos y el tratamiento completo.

Para poder llevar esto a cabo, el inóculo se estandarizó de manera tal que la concentración más alta ( $\alpha$ ) correspondiera a  $5 \log_{10}$  y la de menor concentración ( $\beta$ ) a  $3 \log_{10}$ <sup>52</sup>.

---

<sup>49</sup> NOM-034-SSA1-1993. BIENES Y SERVICIOS. PRODUCTOS DE LA CARNE. CARNE MOLIDA Y CARNE MOLIDA MOLDEADA. ENVASADAS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.

<sup>50</sup> NOM-194-SSA1-2004. PRODUCTOS Y SERVICIOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS EN LOS ESTABLECIMIENTOS DEDICADOS AL SACRIFICIO Y FAENADO DE ANIMALES PARA EL ABASTO, ALMACENAMIENTO, TRANSPORTE Y EXPENDIO. ESPECIFICACIONES SANITARIAS DE PRODUCTOS.

<sup>51</sup> NOM-213-SSA1-2002. PRODUCTOS Y SERVICIOS. PRODUCTOS CÁRNICOS PROCESADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS. MÉTODOS DE PRUEBA.

<sup>52</sup>  $\alpha$  corresponde a  $10^5$  UFC/mL y  $\beta$  a  $10^3$  UFC/mL.

### 7.1.1.1.2 Evaluación y selección de método de inoculación: micropipeta contra jeringa hipodérmica

La evaluación del método de inoculación fue un punto importante, de ello depende la inoculación eficiente con la concentración celular estandarizada. Durante los primeros ensayos de inoculación con micropipeta, utilizando protocolos previamente aplicados en el laboratorio, no se lograron buenos resultados ya que no se recuperaban cuentas de colonias equivalentes a lo inoculado (inóculo  $\alpha$ ). De esta manera se consultó literatura que versara al respecto, siendo la inoculación con micropipeta, inyección con jeringa hipodérmica y el sumergir la muestra en una suspensión bacteriana las técnicas más utilizadas [Ray *et al.*, 2010]. Considerando que la tercer técnica no permite inocular una concentración conocida de microorganismo de forma confiable, se procedió a analizar la eficacia de las otras dos.

Manteniendo la proporción de 100  $\mu\text{L}$  de cultivo por 20 g de carne, el volumen de inóculo utilizado en las muestras de carne (10 g de carne) para cuenta en placa fue de 50  $\mu\text{L}$ , inoculando **5.74  $\log_{10}$  UFC  $\text{g}^{-1}$** . Igualmente, se utilizó esta concentración de UFC pero adicionando solución salina isotónica (SSI) buscando tener una mejor dispersión de las células al inocular las muestras de carne. De este modo, se trabajó con las muestras: P<sub>1</sub> y J<sub>1</sub>, trabajando directamente con los 50  $\mu\text{L}$ ; P<sub>2</sub> y J<sub>2</sub>, 50  $\mu\text{L}$  de inóculo adicionando 450  $\mu\text{L}$  de SSI y J<sub>3</sub>, 50  $\mu\text{L}$  de inóculo y 50  $\mu\text{L}$  de SSI, donde P corresponde al uso de micropipeta y J al uso de jeringa.

**Tabla 17. Resultados de cuenta en placa, métodos de inoculación artificial de carne**

Dilución	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
Muestra	Log UFC g <sup>-1</sup>	Log UFC g <sup>-1</sup>
P <sub>1</sub>	5.20	5.38
P <sub>2</sub>	5.18	5.20
J <sub>1</sub>	4.78	4.60
J <sub>2</sub>	5.08	5.23
J <sub>3</sub>	5.20	4.95

P, micropipeta; J, jeringa  
P<sub>1</sub>, J<sub>1</sub>: 50  $\mu\text{L}$  de inóculo  
P<sub>2</sub>, J<sub>2</sub>: 50  $\mu\text{L}$  de inóculo+450  $\mu\text{L}$  SSI  
J<sub>3</sub>: 50  $\mu\text{L}$  de inóculo+50  $\mu\text{L}$  de SSI  
Inóculo inicial 5.74 log UFC mL<sup>-1</sup>

Los resultados de cuenta en placa para los métodos de inoculación evaluados están representados en la tabla 17, donde se aprecia que el método P<sub>1</sub> (micropipeta utilizando 50

---

$\mu\text{L}$  de inóculo) mostró buenos resultados para recuperar buena proporción de las UFC inoculadas, además de no generar residuos biológico infecciosos que requieran tratamiento especial como el caso de las jeringas hipodérmicas. Las variaciones entre los métodos utilizados son pequeñas, por lo que esto último es una ventaja para la definición del método más adecuado. Así mismo, muestra que no se requiere resuspender el inóculo para mejorar la dispersión sobre la muestra. De tal manera que  $P_1$  (inoculación con micropipeta) fue el método seleccionado para efectuar la inoculación superficial de la carne para las pruebas de reto.

#### **7.1.1.1.3 Efecto de la PHUA y los procesos asociados en la inactivación de *S. Typhimurium***

Ya que se han tenido reportes favorables sobre la aplicación de presiones moderadas para retardar el crecimiento microbiano mejorando el color y la capacidad de retención de agua de la carne [Carlez *et al.*, 1994; Jung *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2011] se optó por iniciar el estudio con 172 MPa. Esto con el propósito de determinar si hay disminución importante en las cuentas de gram-negativos como *S. Typhimurium*, que además representa a los patógenos, y determinar si esta presión es viable para inactivar gram-positivas (*L. monocytogenes*) que son más resistentes.

Cabe mencionar que para procesar la muestra por medio de PHUA es necesario empacarla al vacío previamente (lo que involucra una modificación en la disponibilidad de  $\text{O}_2$  dentro del empaque), igualmente, ya que se pretende determinar su utilidad para incrementar la vida de anaquel en refrigeración, la baja temperatura (aproximadamente de  $4^\circ\text{C}$ ) también forma parte de los procesos asociados. Es por ello que también se evaluó el efecto individual de estos procesos sobre la inactivación de las bacterias.

Posteriormente se hizo la evaluación utilizando una presión mayor, 345 MPa, la cual se considera como el umbral para conseguir buena inactivación de mesófilos aerobios sin modificar de forma significativa parámetros de calidad como el color de la carne [Sánchez-Basurto *et al.*, 2011].

Los resultados de la cuenta en placa para *S. Typhimurium* obtenidos de ambas evaluaciones se presentan en la tabla 18, donde se indican las UFC recuperadas de las muestras (*Supervivencia*) y la diferencia entre las UFC inoculadas y las recuperadas (*Inactivación*, determinada como  $\Delta \log \text{UFC g}^{-1}$ ).

**Tabla 18. Efecto de la aplicación de diferentes combinaciones de procesos (vacío, presurización con 172 MPa o 345 MPa y refrigeración) en la cuenta de *S. Typhimurium* inoculada en cuentas altas y bajas en muestras de carne fresca (Sirloin)**

Muestra	Inóculo	Supervivencia log UFC g <sup>-1</sup>		Inactivación Δ log UFC g <sup>-1</sup>	
		172 MPa	345 MPa	172 MPa	345 MPa
R	α	5.48 ± 0.17	5.87 ± 0.02	0.18 ± 0.04	0.03 ± 0.01
	β	1.93 ± 0.33	2.70 ± 0.37	0.52 ± 0.41	0.45 ± 0.41
VR	α	5.55 ± 0.24	5.77 ± 0.25	0.25 ± 0.23	0.49 ± 0.15
	β	2.39 ± 0.32	2.61 ± 0.22	0.69 ± 0.10	0.66 ± 0.39
VPF	α	5.30 ± 0.47	5.46 ± 0.20	0.49 ± 0.16	0.79 ± 0.22
	β	2.69 ± 0.53	2.68 ± 0.46	0.39 ± 0.22	0.59 ± 0.04
VPR	α	5.30 ± 0.19	5.13 ± 0.28	0.50 ± 0.29	0.99 ± 0.38
	β	2.67 ± 0.50	2.44 ± 0.38	0.41 ± 0.23	0.83 ± 0.14

Inóculo recuperado, corresponde a la cuenta obtenida en la muestra evaluada.

La letra que etiqueta la muestra representa el proceso al que fue sometida.

F corresponde a carne fresca. Inóculo α = cuenta alta, β = cuenta baja.

R Refrigeración durante 5 días a 4° C.

VPF (Vacío, Presurización, Fresca). Representa el efecto inmediato de la presión en la inactivación del patógeno.

PHUA. Presión Hidrostática Ultra Alta, 172 MPa, 1 minuto, temperatura ambiente (20° C).

Promedio del inóculo inicial para 172 MPa: 5.57±0.13, 2.68±0.54 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> para α y β respectivamente y para 345 MPa: 6.04±0.16, 2.92±0.10 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> para α y β respectivamente.

La Inactivación, determinada como diferencia de unidades logarítmicas (Δ log UFC g<sup>-1</sup>), corresponde a la diferencia entre las UFC g<sup>-1</sup> iniciales inoculadas (obtenido de las muestras F) y las cuentas obtenidas para la muestra problema (R, VR, VPF o VPR). ± DS de tres réplicas.

Las muestras designadas como F (*carne fresca*) no fueron sometidas a ningún tratamiento y fueron consideradas para determinar la modificación de las cuentas de *S. Typhimurium* al inocular la concentración conocida y posteriormente hacer la recuperación del inóculo, siendo así el control de las UFC g<sup>-1</sup> iniciales.

Las muestras R (*carne refrigerada*) se consideraron para determinar el efecto de la refrigeración sobre las cuentas microbianas y apreciar si se generaba alguna modificación en las UFC inoculadas. Puede notarse que la refrigeración tiene un efecto bacteriostático (no produce la muerte de las bacterias pero detiene el crecimiento) sobre *S. Typhimurium* pues el número de ésta no aumentó de forma considerable durante el almacenamiento.

Las muestras VR (*carne empacada al vacío y refrigerada*) se utilizaron con el fin de contrastar el efecto que pudiera tener el vacío en el desarrollo de *Salmonella* (o las demás bacterias), habiendo determinado previamente el efecto bacteriostático de la refrigeración. En comparación con R, al empacar al vacío y refrigerar se obtiene una ligera disminución en el crecimiento de este patógeno (tabla 18).

---

Así mismo, el efecto del vacío sobre *S. Typhimurium* muestra congruencia entre los resultados obtenidos tanto para la muestra usada para evaluar 172 MPa así como para evaluar 345 MPa, de modo que la respuesta es reproducible. El vacío tiene contribución en la disminución de las cuentas y este efecto gira en torno a la modificación de la presión del aire dentro del empaque reduciendo con ello la disponibilidad de oxígeno, con esto también disminuye la concentración de CO<sub>2</sub>. Con este tratamiento se retarda el crecimiento de bacterias anaerobias facultativas como *S. Typhimurium*, aunque no las inhibe totalmente. Igualmente, las condiciones que se generan con este tratamiento favorecen el desarrollo de bacterias ácido lácticas que pueden contribuir con el efecto y retardar la recuperación de las cuentas de *S. Typhimurium* [Streinkraus, 1983; Daeschel, 1989].

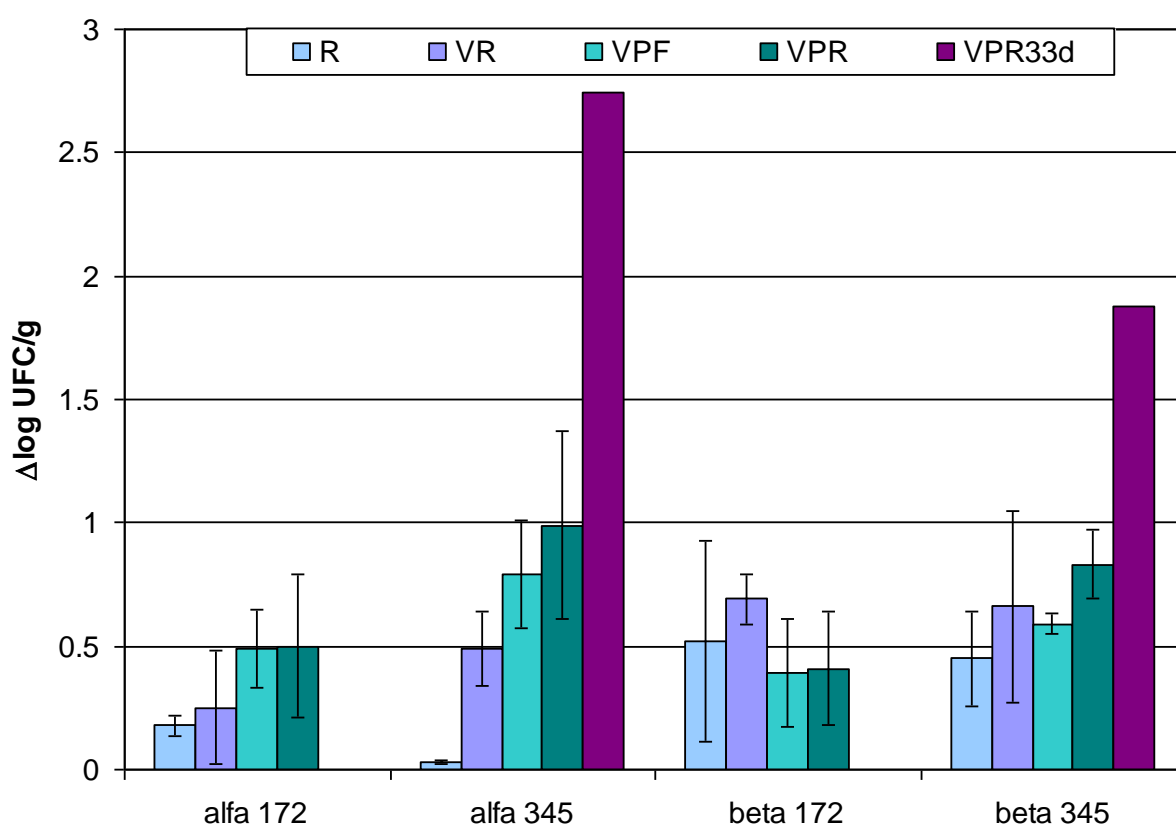
VPF representa las muestras de *carne empacada al vacío, presurizada, fresca* (sin periodo de refrigeración) y en ellas se aprecia el efecto de la PHUA (junto con el vacío) sobre el inóculo de forma inmediata sobre *Salmonella* (o *Listeria monocytogenes* o microbiota nativa, según el caso), sin permitir el periodo de recuperación que podría proporcionar la conservación en refrigeración. Si bien, la razón para refrigerar es disminuir la actividad metabólica de los microorganismos y con ello la velocidad de crecimiento [Varnam & Sutherland, 1995; Lawrie, 1998; Warriss, 2003], esta misma baja en la tasa metabólica haría poco plausible la recuperación del daño subletal de las células susceptibles o lo retardaría [Ritz *et al.*, 2006]. Sin embargo, es importante tener la consideración de lo que ocurre después del periodo de refrigeración a 4° C durante 5 días y que corresponde a las muestras VPR (*empacadas al vacío, presurizadas y refrigeradas*) ya que éstas son las condiciones a las que sería sometido el producto al comercializarse o al mantenerse en refrigeración en el hogar. Así mismo, la carne refrigerada o empacada al vacío y refrigerada se considera *carne fresca* hasta el día 5 o 7 de conservación [Warriss, 2003; USDA<sup>53</sup>].

Con los resultados obtenidos se aprecia buena inactivación de *S. Typhimurium* al someter al tratamiento VPF (muestras de carne empacadas al vacío y presurizadas) y la refrigeración de estas muestras (VPR) permitió disminuir las cuentas. Cabe destacar que se observa que esta bacteria es afectada por todos los tratamientos involucrados en la conservación por medio de PHUA (empacado al vacío, presurizado y refrigerado)

---

<sup>53</sup> USDA/FSIS, 2010: [www.fsis.usda.gov/es/Refrigeracion/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/es/Refrigeracion/index.asp)

Igualmente, se debe mencionar que durante los ensayos de la última repetición empleada para evaluar 345 MPa se trabajó una muestra adicional que permaneció en refrigeración 33 días (VPR33d). Para el inóculo  $\alpha$  de esta corrida se obtuvo un valor estimado de  $3.18 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ , que representa una disminución de  $2.57 \log_{10}$  (figura 11). Y para el inóculo  $\beta$  no se detectaron UFC, siendo un valor estimado de disminución de  $1.88 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$  ( $\leq 10 \text{ UFC g}^{-1}$ ). Lo que reafirma la idea de que la refrigeración contribuye tanto a impedir el crecimiento (efecto bacteriostático) y a disminuir las cuentas de esta bacteria (efecto biocida). Posiblemente, si parte de la población sufrió daño subletal durante la presurización, las condiciones de refrigeración impidieron su recuperación metabólica para reparar el daño con sus subsecuente muerte.



**Figura 11.** Efecto de los tratamientos en la inactivación de *Salmonella Typhimurium* con 172 y 345 MPa de presión durante 1 minuto a temperatura ambiente. R Refrigeración, VR Vacío y Refrigeración, VPF Vacío y Presión de carne fresca, VPR Vacío, Presión y Refrigeración, VPR33d Vacío, Presión y Refrigeración durante 33 días.  $\Delta \log \text{ UFC g}^{-1}$ , la diferencia entre el inóculo inicial (muestra fresca inoculada artificialmente) y lo recuperado después del tratamiento.  $\alpha$  cuenta alta de  $10^6 \text{ UFC g}^{-1}$  y  $\beta$  cuenta baja de  $10^3 \text{ UFC g}^{-1}$ .  $\pm$  DS como resultado de 3 réplicas. VPR<sub>33d</sub> no tuvo réplicas.

Para efectuar la comparación de los efectos de las diferentes condiciones evaluadas sobre *S. Typhimurium*, en la figura 11 se grafican las diferencias de unidades logarítmicas de  $\text{UFC g}^{-1}$  alcanzadas para evaluar 172 MPa y los valores obtenidos al evaluar 345 MPa. La diferencia de unidades logarítmicas ( $\Delta \log \text{ UFC g}^{-1}$ ), corresponde a la diferencia entre



---

las UFC g<sup>-1</sup> iniciales inoculadas (obtenido de las muestras F) y las cuentas obtenidas para la muestra problema (R, VR, VPF o VPR) como se indica en la tabla 18.

Se aprecian diferencias de UFC g<sup>-1</sup> importantes en las muestras VPF y VPR, tanto para el inóculo  $\alpha$  así como para  $\beta$  con 345 MPa, que corresponden a las muestras que recibieron el tratamiento de PHUA y PHUA junto con refrigeración. Para VPF $_{\alpha}$  una diferencia de 0.79 unidades logarítmicas y para VPF $_{\beta}$  0.59 log<sub>10</sub>. Si bien, la mayor diferencia se consigue al mantener en refrigeración, con lo que se alcanza cerca de 1 log<sub>10</sub> para ambos inóculos (figura 11). De tal manera que se aprecia el efecto en conjunto de los procesos de empacado al vacío, la presión hidrostática ultra alta y la refrigeración que permitiría prolongar la vida de anaquel del producto. Y aunque con 172 MPa también se consigue una disminución, ésta sólo se aprecia para el inóculo  $\alpha$  y resultan más relevantes los resultados al emplear 345 MPa.

Estos primeros datos son interesantes pues se ha reportado que a mayor presión se consigue una mayor inactivación bacteriana [Fonberg-Broczek *et al.*, 2005]. Resulta atractivo evaluar la presión de 345 MPa sobre las bacterias gram-positivas, que resisten mejor este tratamiento, como *L. monocytogenes*.

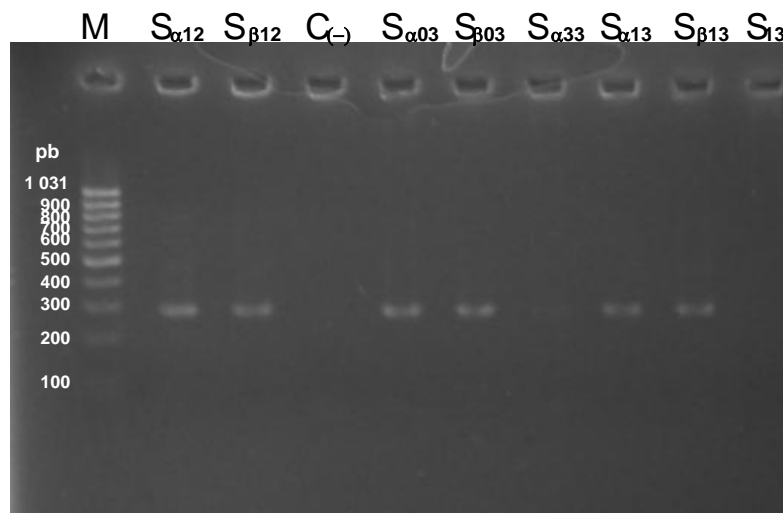
#### **7.1.1.2 Detección de *S. Typhimurium* mediante una reacción de PCR con oligos específicos**

Con respecto a la detección molecular del DNA obtenido de las muestras inoculadas artificialmente se obtuvieron los fragmentos de DNA de aproximadamente 300 pb esperados para la PCR realizada (el juego de oligos para *Salmonella* spp. *Itsf* e *Itsr*, genera un producto de amplificación de 312 pb [Chiu *et al.*, 2005]).

La detección por medio de PCR se planteó para descartar la presencia de *Salmonella* spp. que pueda encontrarse por debajo de los límites de detección del método de cuenta en placa, particularmente para las muestras que son control negativo de la inoculación, determinando así su ausencia.

Así mismo, aunque previamente a la extracción de DNA se efectúa un enriquecimiento celular, resulta posible apreciar ciertas diferencias en la concentración de células en la cosecha y en la concentración de DNA obtenido. Esto puede relacionarse con la cantidad de células que permanecieron viables después del tratamiento y que gracias al enriquecimiento pudieron recuperarse del daño subletal y aumentar su número.

En la figura 12 se observa un ejemplo de gel de agarosa donde se ha separado por electroforesis el fragmento de DNA amplificado por medio de PCR. Para las muestras evaluadas los resultados son positivos para todas las muestras inoculadas artificialmente. No se detectaron positivos en las muestras no inoculadas ni fragmentos de masa molecular diferente al esperado (aproximadamente 300 pb).



**Figura 12.** Ejemplo de gel de agarosa con el producto de PCR obtenido utilizando oligos específicos para *Salmonella* spp. (Itsf, lysr, [Chiu *et al.*, 2005]). El carril inicial (M) corresponde al marcador de masa molecular y C<sub>(-)</sub> corresponde al control negativo para la PCR.  $\alpha$  Inóculo inicial de cuenta alta;  $\beta$  inóculo inicial de cuenta baja. 12 corresponde a la muestra R, réplica 2; 03 corresponde a muestra F, réplica 3; 13 corresponde a R, réplica 3; 33 corresponde a VPF, réplica 3. Condiciones: gel de agarosa al 2%, 70V, 60 min. Fragmento esperado de 312 pb.

En ninguna de las muestras que fueron control negativo de inoculación se detectó la presencia de *Salmonella* ssp. (ni en el caso del empleo del método tradicional ni tampoco con el método molecular) tanto para las muestras utilizadas en la evaluación de 172 MPa y en las muestras utilizadas para evaluar 345 MPa.

Este procedimiento se llevó a cabo con el fin de estandarizar la técnica a partir de la cual se derivará un procedimiento para una PCR semicuantitativa y como control de calidad de la carne.

### 7.1.2 Efecto de la PHUA sobre *Listeria monocytogenes*

#### 7.1.2.1 Cuantificación de la inactivación

##### 7.1.2.1.1 Estandarización del inóculo de *L. monocytogenes*

Para efectuar las pruebas de reto con *L. monocytogenes* se estandarizó el inóculo para seleccionar aquellas diluciones que fueran adecuadas para trabajar con una concentración alta de células ( $\alpha$ ) y una concentración baja ( $\beta$ ), como en el caso de *S. Typhimurium*. Así

mismo, ya que para *L. monocytogenes* la legislación sanitaria indica que debe estar ausente en las muestras de alimento evaluadas, se optó por considerar los mismos valores de concentración usados para *Salmonella*, para de esta manera poder apreciar los efectos de la PHUA sobre una concentración baja y una alta de bacterias.

Los resultados correspondientes se muestran en la tabla 19.

**Tabla 19. Estandarización del inóculo, *Listeria monocytogenes***

dilución	Log UFC mL <sup>-1</sup>
10 <sup>-1</sup>	6.19
10 <sup>-2</sup>	5.12
10 <sup>-3</sup>	4.16
10 <sup>-4</sup>	3.36
10 <sup>-5</sup>	2.00

Las concentraciones de trabajo fueron:  $\alpha$ , 6 log<sub>10</sub> y  $\beta$ , 3 log<sub>10</sub>.

#### 7.1.2.1.2 Efecto de la PHUA y los procesos asociados en la inactivación de *L. monocytogenes*

Ya que la presión de 172 MPa no mostró un efecto importante en la disminución de las cuentas de *S. Typhimurium* y se espera que *L. monocytogenes* sea menos susceptible a la presión, se efectuó la evaluación con 345 MPa. Los resultados obtenidos están reportados en la tabla 20.

**Tabla 20. Efecto de la aplicación de diferentes combinaciones de procesos (345 MPa, vacío y refrigeración) en la cuenta de *L. monocytogenes* inoculada en cuentas altas y bajas en muestras de carne fresca (Sirloin)**

Muestra	Inóculo	Inóculo recuperado Log UFC g <sup>-1</sup>	$\Delta$ log UFC g <sup>-1</sup>
R	$\alpha$	5.89 ± 0.06	-0.04 ± 0.03
	$\beta$	2.98 ± 0.15	0.05 ± 0.10
VR	$\alpha$	5.80 ± 0.09	0.05 ± 0.08
	$\beta$	2.78 ± 0.17	0.24 ± 0.13
VPF	$\alpha$	5.64 ± 0.04	0.20 ± 0.03
	$\beta$	2.88 ± 0.07	0.14 ± 0.06
VPR	$\alpha$	5.71 ± 0.11	0.13 ± 0.09
	$\beta$	2.90 ± 0.15	0.12 ± 0.08

La letra que etiqueta la muestra representa el proceso al que fue sometida.

F corresponde a carne fresca. Inóculo  $\alpha$  = cuenta alta,  $\beta$  = cuenta baja.

R refrigeración durante 5 días a 4° C.

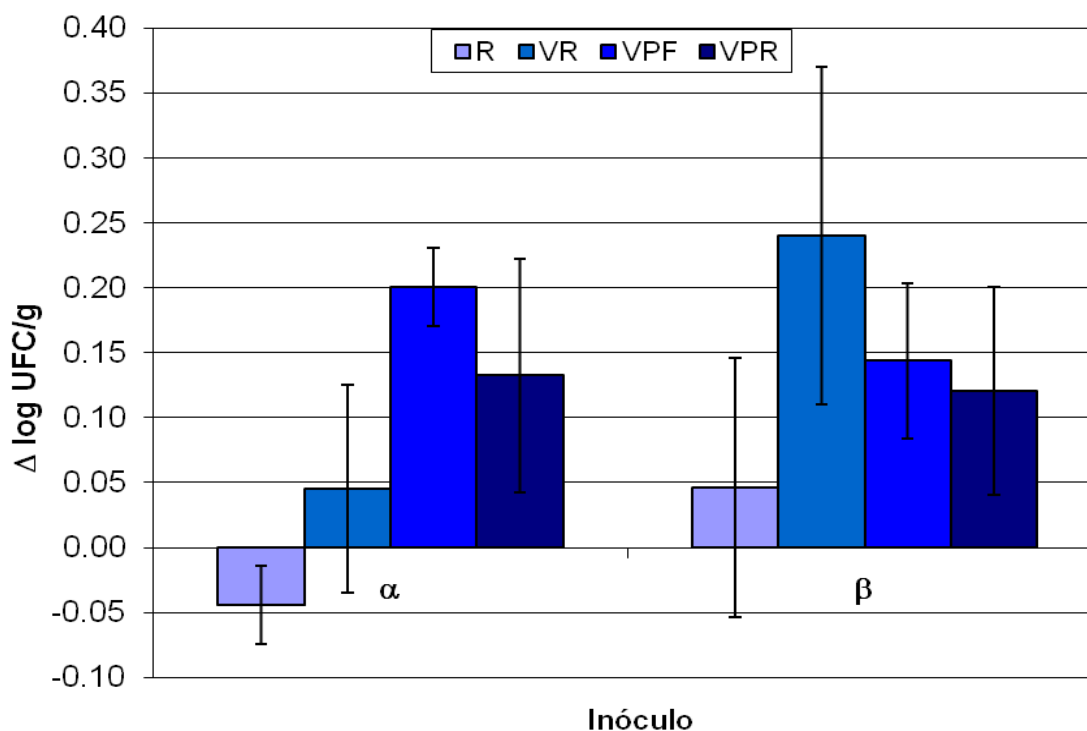
PHUA. 345 MPa, 1 minuto, temperatura ambiente.

Inóculo inicial: 6.32±0.04 y 3.51±0.09 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> para  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente.

$\Delta$  log UFC g<sup>-1</sup>. Diferencia entre la cuenta obtenida para la muestra F y la muestra de trabajo.

± DS resultado de 3 réplicas.

En estos resultados puede apreciarse que la disminución en las cuentas sólo se alcanza como efecto inmediato de la presurización (VPF) ya que las cuentas se recuperan, en cierta medida, después del periodo de refrigeración posterior al presurizado (VPR). Esto se corrobora al apreciar la figura 13 donde se representan gráficamente los valores para la disminución de unidades logarítmicas de las UFC g<sup>-1</sup>, siendo la máxima disminución de 0.20 unidades log<sub>10</sub> para VPF<sub>α</sub>.



**Figura 13.** Efecto de los tratamientos en la inactivación de *Listeria monocytogenes* con 345 MPa de presión durante 1 minuto a temperatura ambiente.  $\Delta \log \text{UFC/g}$ , la diferencia entre el inóculo inicial (muestra fresca inoculada artificialmente) y lo recuperado después del tratamiento,  $\pm \text{DS}$  como resultado de 3 réplicas.

Además, aunque *L. monocytogenes* esté sujeta a estrés por el efecto de la presurización o las demás condiciones que involucra este procesamiento, el estrés generado por las bajas temperaturas no es tan marcado como en el caso de los mesófilos y puede mantener un desarrollo considerable; por esta razón, es uno de los patógenos psicrótrofos más importantes en alimentos mínimamente procesados [Farkas, 2001]. Esta bacteria gram-positiva que posee muchas características que semejan las de las BAL, ya que puede desarrollarse en condiciones microaerófilas e incluso anaerobias y puede crecer a temperaturas entre -1.5 y 45° C y en un rango de pH entre 4.3 y 9.1 [Rossi *et al.*, 2008], al parecer estas características son las que le permiten mantenerse bajo las condiciones de proceso implicadas en la conservación con PHUA en refrigeración y por lo

---

cual, a nivel estadístico, no hay diferencia significativa ( $P > 0.05$ <sup>54</sup>) en el efecto de disminución de unidades logarítmicas conseguidas entre los diferentes procesos empleados (R, VR, VPF, VPR).

#### **7.1.2.2 Detección de *Listeria monocytogenes* mediante una reacción de PCR con oligos específicos**

En la imagen que se presenta a continuación, figura 14 (donde los controles negativos de inoculación son aquellos cuya etiqueta carece de  $\alpha$  o  $\beta$ ), son un ejemplo de los amplificadores obtenidos de la PCR con oligos específicos para *L. monocytogenes* (listeriolisina O [Join-Lambert *et al.*, 2005]).

En las muestras evaluadas los resultados son positivos para todas las muestras inoculadas artificialmente (presencia de banda con peso aproximado de 200 pb). No se detectaron fragmentos de masa molecular diferente al esperado, sin embargo, se detectaron positivos a la presencia de *L. monocytogenes* en controles negativos de la inoculación. Esto contrasta con datos obtenidos por el método tradicional donde solamente 2 muestras de control negativo mostraron crecimiento ( $L_{01}$ ,  $L_1$  que corresponden a las muestras F y VPR de la primera evaluación). Al parecer todos los lotes de carne utilizados para la evaluación de la PHUA sobre *L. monocytogenes* estaban contaminados con esta bacteria. Esto se suma a lo reportado por Rubio y col. [2013] que detectaron por medio de PCR con oligos específicos la presencia de esta bacteria en carne comercializada en México; en otros países se ha observado que la contaminación con esta bacteria puede deberse a la manipulación por parte de los trabajadores, el contacto con la maquinaria y herramientas o con otras superficies de trabajo [Kerr *et al.*, 1993; Chmielewski & Frank, 2003; Allan *et al.*, 2004].

---

<sup>54</sup> Análisis estadístico ANOVA, utilizando el programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS 10.0 para Windows).



almacenamiento en refrigeración a 4° C, razón por la cual es posible que las UFC sean mayores en VPR que en VPF.

Los efectos de la presurización con 345 MPa sobre las cuentas de las bacterias patógenas evaluadas en este trabajo se describen en la tabla 21 en términos de diferencias de unidades logarítmicas ( $\Delta \log_{10}$ ) de UFC g<sup>-1</sup>. Esta diferencia considera la cuenta obtenida para la muestra F y la obtenida de la muestra de trabajo y se utilizó para poder apreciar las diferencias en la inactivación.

**Tabla 21. Comparación del efecto de los diferentes tratamientos (R, VR, VPF, VPR; presión de 345 MPa) en la disminución de las cuentas de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes***

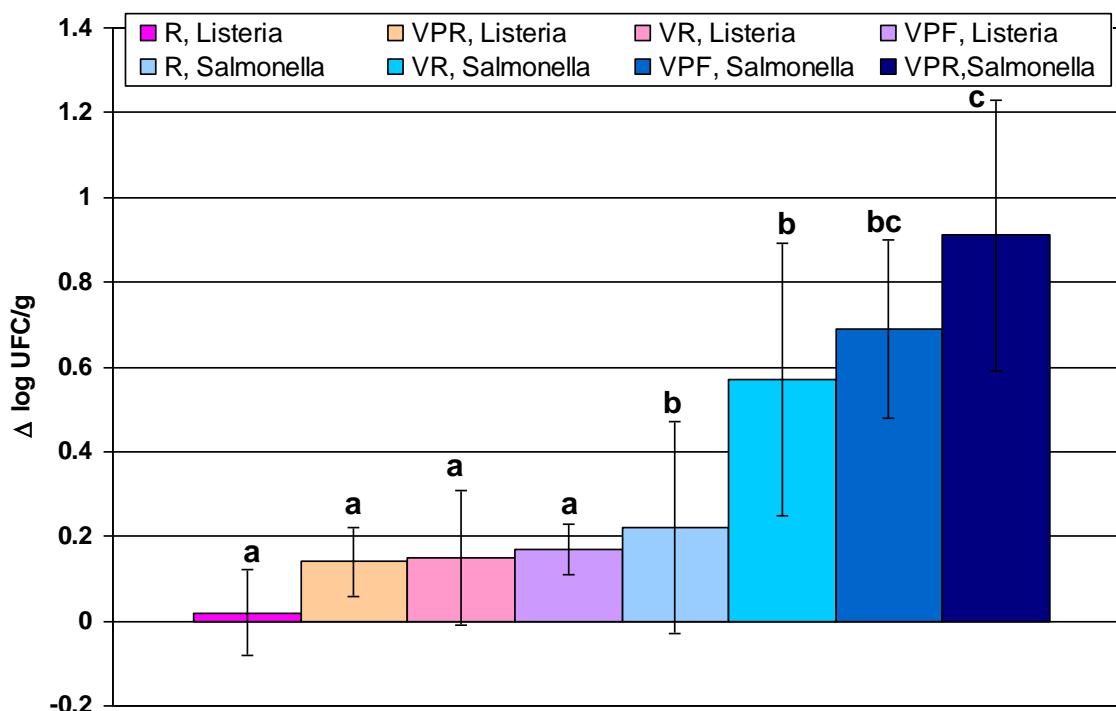
Tratamiento	Patógeno	$\Delta \log \text{ UFC g}^{-1}$
R	<i>Listeria</i>	0.02 ± 0.10 <sup>a</sup>
VPR	<i>Listeria</i>	0.14 ± 0.08 <sup>a</sup>
VR	<i>Listeria</i>	0.15 ± 0.16 <sup>a</sup>
VPF	<i>Listeria</i>	0.17 ± 0.06 <sup>a</sup>
R	<i>Salmonella</i>	0.22 ± 0.25 <sup>b</sup>
VR	<i>Salmonella</i>	0.57 ± 0.32 <sup>b</sup>
VPF	<i>Salmonella</i>	0.69 ± 0.21 <sup>bc</sup>
VPR	<i>Salmonella</i>	0.91 ± 0.32 <sup>c</sup>

<sup>abc</sup> Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) entre Tratamiento\*Microorganismo. R Refrigeración (5 días a 4° C), VR Vacío y Refrigeración, VPF Vacío y Presión de carne fresca, VPR Vacío, Presión y Refrigeración. ± SD de 6 réplicas (3 réplicas  $\alpha$ +3 réplicas  $\beta$ ).

Hay diferencia significativa en la disminución de las cuentas de patógenos como efecto de la PHUA (P<0.05) y *S. Typhimurium* resulta ser más lábil a los procesos involucrados en la conservación a través de PHUA (empacar al vacío, presión ultra alta, refrigeración) a diferencia de *L. monocytogenes* que muestra mayor resistencia (VPF tiene el mejor efecto para esta última). Así, VPR resulta ser el tratamiento que contribuye a disminuir de manera más significativa las cuentas de *S. Typhimurium*, seguido de VPF (figura 15).

Se observa entonces la susceptibilidad de las bacterias gram-negativas ante la PHUA en comparación con las bacterias gram-positivas [Shigehisa *et al.*, 1991; Smelt, 1998; Hugas *et al.*, 2002]. Principalmente por el sitio en que la presurización tiene mayor impacto; las estructuras más afectadas por el cambio de presión son las membranas celulares, su permeabilidad se ve afectada seriamente [Téllez-Luis *et al.*, 2001; Hugas *et al.*, 2002; Heinz *et al.*, 2009]. La presurización contribuye a la desorganización de los lípidos que componen la membrana externa y la membrana interna de las gram-negativas, cuya pared celular es menos gruesa que las gram-positivas y que por tanto opone menor

resistencia a la presión; así, *S. Typhimurium* es más lábil al daño ocasionado por la presión en comparación con *L. monocytogenes*.



**Figura 15.** Efecto de los tratamientos en la inactivación de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* con 345 MPa de presión durante 1 minuto a temperatura ambiente.  $\Delta \log \text{UFC/g}$ , la diferencia entre el inóculo inicial (muestra fresca inoculada artificialmente) y lo recuperado después del tratamiento. <sup>abc</sup> Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre Tratamiento\*Microorganismo. R Refrigeración, VR Vacío y Refrigeración, VPF Vacío y Presión de carne fresca, VPR Vacío, Presión y Refrigeración.  $\pm$  SD de 6 réplicas.

### 7.3 Efecto de la PHUA sobre la microbiota nativa de la carne fresca

#### 7.3.1 Efecto de los tratamientos en el pH de la carne

Se consideró también, como parte del estudio de la microbiota nativa de la carne y los efectos de la presurización sobre ésta, el evaluar las posibles modificaciones del pH ya que puede estar asociado a la modificación de la microbiota nativa (principalmente por el desarrollo de BAL) o a la presurización *per se* (tabla 22).

En la tabla 22 se puede apreciar que no hay modificaciones entre las muestras. Y del análisis estadístico, no hay diferencia significativa entre el pH por efecto de la carne sometida a los diferentes tratamientos ( $P > 0.05$ ), por lo que se puede considerar que éste no se ve afectado por los tratamientos involucrados en el proceso de conservación con PHUA (empacado al vacío, presurización y, para periodos más largos de preservación, refrigeración).



---

**Tabla 22. Modificación del pH en diferentes muestras**

<b>Muestra</b>	<b>pH</b>
<b>F</b>	5.4 ±0.2
<b>R</b>	5.4 ±0.2
<b>VR</b>	5.3 ±0.3
<b>VPF</b>	5.4 ±0.2
<b>VPR</b>	5.4 ±0.2

± DS resultado de 4 réplicas.  
(P>0.05)

El pH de la carne originalmente es de 7 pero se modifica hasta un pH de 5.5 a 5.7 después del *rigor mortis* [Ingram & Simonsen, 1980; Rosset, 1994; Adams & Moss, 1997; Board, 1998; Jackson *et al.*, 2001]. Por lo tanto, se puede decir que los valores de pH de las muestras de carne se encuentran dentro de estos parámetros y no hubo modificación por efecto de los diferentes procesos involucrados en la conservación con PHUA.

### **7.3.2 Evaluación de la microbiota nativa por medio de Método tradicional**

#### **7.3.2.1 Cuantificación de la inactivación de la microbiota nativa**

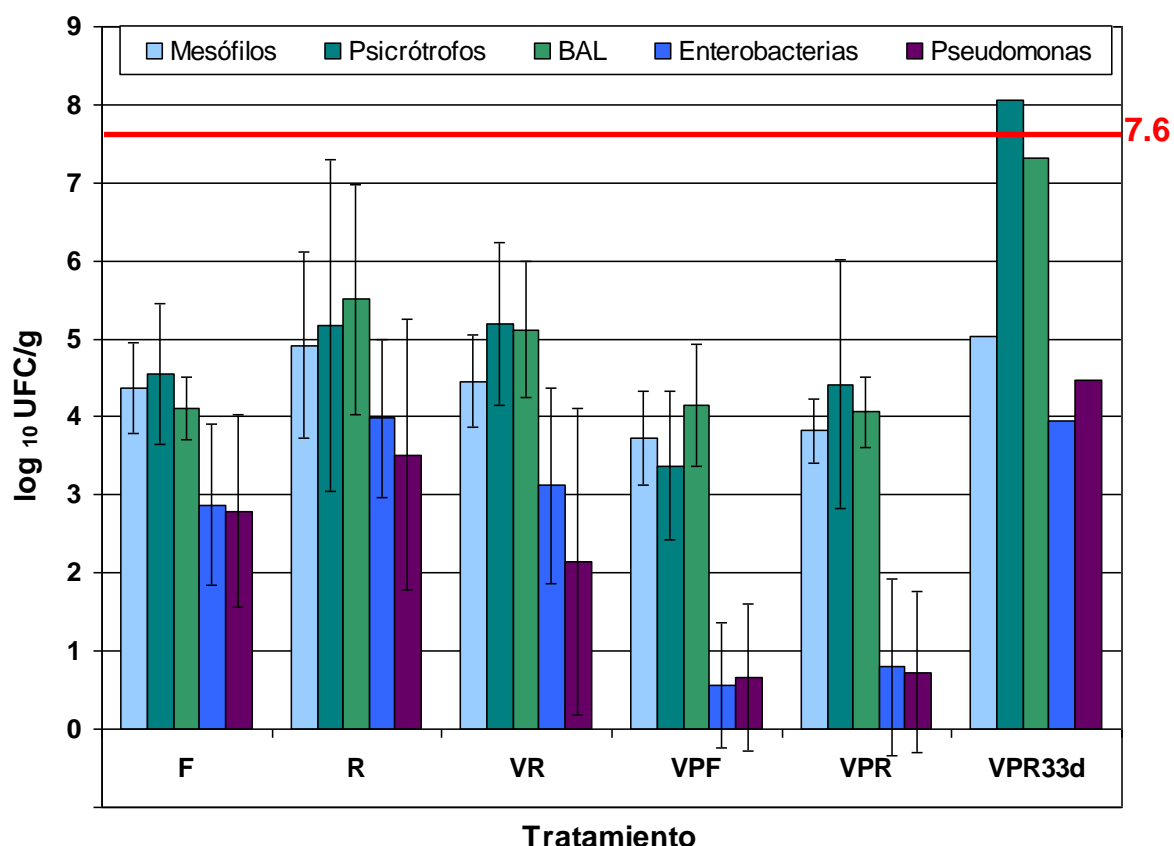
Para evaluar el efecto de la PHUA (345 MPa) sobre la microbiota nativa se planteó el estudiar la modificación de las cuentas de 5 grupos microbianos: mesófilos aerobios, psicrótrofos aerobios, enterobacteria, bacterias ácido lácticas y *Pseudomonas spp.*

En la tabla 23 se describen las cuentas obtenidas para estos grupos que fueron recuperados de las muestras sometidas a los diferentes tratamientos, siendo las cuentas de la carne fresca (F) las cuentas iniciales de estas bacterias. De esta manera, las modificaciones de las UFC g<sup>-1</sup> obtenidas con los diferentes procesamientos se contrastan con F. Así mismo, estos resultados están representados en la figura 16, donde puede notarse el efecto de cada tratamiento en particular sobre los grupos microbianos evaluados. Igualmente, puede observarse el comportamiento que siguen los microorganismos como respuesta a cada proceso, apreciando también qué grupos microbianos predominan al ser favorecidos por las condiciones de tratamiento.

**Tabla 23. Resultado de cuenta en placa para diferentes grupos microbianos para muestras de carne sometidas a diferentes combinaciones de procesos, evaluando 345 MPa**

Muestra	Mesófilos	Psicrótrofos	BAL	Enterobacterias	Pseudomonas
F	4.37 ± 0.58	4.54 ± 0.90	4.11 ± 0.40	2.88 ± 1.03	2.80 ± 1.23
R	4.92 ± 1.19	5.17 ± 2.13	5.50 ± 1.47	3.99 ± 1.01	3.52 ± 1.74
VR	4.46 ± 0.59	5.20 ± 1.04	5.12 ± 0.87	3.12 ± 1.26	2.14 ± 1.96
VPF	3.73 ± 0.60	3.37 ± 0.95	4.15 ± 0.78	0.57 ± 0.80	0.67 ± 0.94
VPR	3.82 ± 0.41	4.42 ± 1.59	4.06 ± 0.45	0.80 ± 1.13	0.73 ± 1.03

Los valores están expresados en  $\log_{10}$  UFC  $g^{-1} \pm DS$ .



**Figura 16.** Modificaciones de la microbiota nativa en muestras de carne sometidas a diferentes procesos,  $\pm DS$  resultado de 3 réplicas. F corresponde a las cuentas iniciales, carne fresca sin ningún tratamiento; R refrigeración a 4° C durante 5 días; VR muestra de carne empacada al vacío y refrigerada a 4° C durante 5 días; VPF carne fresca empacada al vacío y sometida a presión; VPR carne fresca empacada al vacío, sometida a presión y refrigerada a 4° C durante 5 días; VPR33d fue solamente una muestra que fue refrigerada durante 33 días. 7.6 es el límite de mesófilos aerobios de acuerdo a la NOM-034-SSA1-1993, utilizada como parámetro de calidad microbiana.

En las muestras de carne fresca (F) y en las muestras de carne refrigerada (R) los psicrótrofos aerobios son el grupo predominante, aunque las BAL también proliferan por encima de los demás.

---

En todos los casos la refrigeración (R) limita hasta cierto punto el crecimiento microbiano pero aún así está presente, los 5 grupos evaluados muestran un incremento en las cuentas ( $\geq 0.55 \log_{10}$ ); así, la refrigeración solamente retarda el desarrollo. Bajo estas condiciones particularmente se aprecia que las BAL son afectadas en menor medida (sus cuentas disminuyen en menor proporción) y esto puede deberse a que este grupo se ve favorecido bajo las condiciones creadas al empacar al vacío y al almacenarse en refrigeración<sup>55</sup> ya que se ha reportado que aumentan su número [Nychas & Drosinos, 1999; Tuboly, 2009]. Los psicrótrofos aerobios, cuya temperatura de crecimiento oscila entre 0 a 35° C [Tortora *et al.*, 2004] también encuentran condiciones adecuadas de crecimiento, si bien, es posible que las BAL estén contribuyendo con las cuentas de este último grupo. Estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura, ya que si la carne se ha manejado en condiciones higiénicas se ha observado que especies psicrótrofas son las que posteriormente podrían causar alteración, al igual que BAL [Ingram & Simonsen, 1980; Rosset, 1994; Warriss, 2003], géneros como *Pseudomonas*, *Brochothrix thermospactha* y *Carnobacterium*, por ejemplo [Ercolini *et al.*, 2006].

Se debe mencionar que aunque *Pseudomonas* spp. se encuentre en bajo número en la muestra de carne fresca, hay que considerar que la cuantificación en Agar F para *Pseudomonas* incluye sólo a 3 especies (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* dan positivo a la producción de fluoresceína) y los demás grupos evaluados incluyen a varios géneros. De manera que *Pseudomonas* spp. tiene una presencia importante en la carne al compararse con otros géneros bacterianos, de hecho, es considerado el principal género asociado a la descomposición de la carne y fuerte presencia como psicrótrofos [Nychas & Drosinos, 1999; Warriss, 2003].

Por otro lado, el efecto del vacío (VR) es más notorio en el descenso de las cuentas de mesófilos y de *Pseudomonas* spp. Particularmente, en el caso de *Pseudomonas* esto se debe a que se trata de un aerobio estricto. En cuanto a las enterobacterias, éstas son aerobias facultativas, no obstante, se ha observado que al modificar la atmósfera del empaque y disminuir el oxígeno en éste, su número disminuye [Ercolini *et al.*, 2006].

Es importante recalcar que el mayor decremento en las cuentas se obtiene de forma inmediata como efecto de la presurización para todos los grupos microbianos evaluados.

---

<sup>55</sup> se les considera microaerófilas y aunque la mayoría se clasifican como mesófilas hay algunas que pueden crecer a 4 ° C.

---

En VPF (correspondiente a las muestras empacadas al vacío, presurizadas y evaluadas inmediatamente) se observa de forma marcada esta disminución de UFC g<sup>-1</sup>, ya que para las muestras presurizadas y puestas en refrigeración durante 5 días (VPR) se obtuvieron ligeros aumentos (figura 16), no tan notorios como en las muestras que solamente se refrigeraron (R). Es probable que las células que sufrieron daño subletal por efecto de la presión puedan recuperarse durante este periodo aunque por la disminución de la tasa metabólica a 4°C o por el efecto del daño ocasionado por la presurización el crecimiento sea moderado.

De tal manera que la mayor disminución en el número de UFC g<sup>-1</sup> se consigue con el tratamiento de PHUA (VPF, VPR) para enterobacterias y para *Pseudomonas* spp. y a diferencia de la refrigeración o el empacar al vacío y refrigerar, la PHUA tiene un efecto importante en la inactivación de estos microorganismos.

Hay que mencionar que las BAL fueron las que mostraron mayor resistencia al tratamiento con PHUA, posiblemente por su condición de bacterias gram-positivas (como el caso de *L. monocytogenes*); siendo que la refrigeración, el vacío y la presurización no las afecta de forma relevante, es uno de los grupos predominantes en las muestras VPR (figura 16). Además, la presencia de estas bacterias podría considerarse no del todo negativa ya que tienen potencial para producir sustancias que contribuyen a ejercer actividad antimicrobiana contra otras bacterias, principalmente los ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético), bacteriocinas, CO<sub>2</sub> y peróxido de hidrógeno [Streinkraus, 1983; Daeschel, 1989].

Los resultados anteriores son consistentes con los resultados del análisis estadístico (tabla 24). La disminución de las cuentas de los diferentes grupos microbianos mostró diferencia altamente significativa para los tratamientos con PHUA (VPF, VPR) y el efecto en la disminución de las cuentas entre diferentes grupos microbianos también mostró diferencia altamente significativa (ambos con P<0.01), siendo las enterobacterias y *Pseudomonas* spp., de los grupos evaluados, los de mayor diferencia de unidades logarítmicas (fueron las más afectadas por el tratamiento con PHUA). El grupo microbiano menos afectado por los tratamientos corresponde a las BAL.

**Tabla 24. Comparación del efecto de los diferentes tratamientos (R, VR, VPF, VPR; presión de 345 MPa) en la disminución de unidades logarítmicas de bacterias (UFC g<sup>-1</sup>)**

Tratamiento	$\Delta \log \text{ UFC g}^{-1}$	Grupo microbiano	$\Delta \log \text{ UFC g}^{-1}$
R	$-0.88 \pm 1.02^a$	BAL	$-0.60 \pm 0.96^a$
VR	$-0.20 \pm 0.84^b$	Psicrótrofos	$0.002 \pm 1.29^{ab}$
VPR	$0.91 \pm 1.17^c$	Mesófilos	$0.16 \pm 0.65^{bc}$
VPF	$1.25 \pm 0.96^c$	Enterobacterias	$0.76 \pm 1.57^{cd}$
		<i>Pseudomonas</i> spp.	$1.03 \pm 1.36^d$

<sup>abcd</sup> Letras diferentes indican diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ). Tratamientos: R Refrigeración, VR Vacío y Refrigeración, VPF Vacío y Presión de carne fresca, VPR Vacío, Presión y Refrigeración.

De acuerdo a la NOM-034-SSA1-1993<sup>56</sup> (utilizada para comparar la calidad microbiana obtenida con la PHUA) el límite de mesófilos aerobios es de 7.60 log<sub>10</sub> (figura 16), de manera que para todas las muestras analizadas el valor se mantiene por debajo del límite de tolerancia, particularmente aquellas que fueron presurizadas, incluso en la muestra refrigerada durante 33 días. Los demás grupos microbianos se mantienen también dentro de este parámetro al día 5 (y 33) de refrigeración, con excepción de los psicrótrofos aerobios, por lo que se puede decir que la carne mantiene una buena calidad microbiana de acuerdo a esta normatividad. Así mismo, si se dice que la carne se considera alterada cuando el número de bacterias alcanza el orden de 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> [Rosset, 1994], las muestras presurizadas se podrían considerar como de buena calidad (figura 16).

### **7.3.2.2 Obtención e identificación de cepas aisladas de diferentes muestras de carne por medio del sistema Vitek® 2**

De las colonias registradas en la tabla 11<sup>57</sup>, los aislados que se obtuvieron de forma satisfactoria corresponden a los enlistados en la tabla 25, donde además se puede apreciar que predominan las bacterias gram-positivas con respecto a las gram-negativas (9:7). Así mismo, los resultados obtenidos de la identificación de estos aislados utilizando el sistema Vitek® 2 se representan en la tabla 26.

<sup>56</sup> NOM-034-SSA1-1993. BIENES Y SERVICIOS. PRODUCTOS DE LA CARNE. CARNE MOLIDA Y CARNE MOLIDA MOLDEADA. ENVASADAS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.

<sup>57</sup> Sección 6.4.1.2.1 *Muestras y aislamiento*, donde se indica la procedencia de 24 colonias aisladas de diferentes muestras de carne sometidas a diferentes tratamientos.

**Tabla 25. Colonias seleccionadas para aislamiento e identificación utilizando el sistema Vitek® 2**

Aislado	Origen	Morfología y Gram	catalasa	Aislado	Origen	Morfología y Gram	catalasa
$\mu$ 1A	*STD S <sub>13</sub>	Bacilos G-	+	$\mu$ 11B	BRVA S <sub>03</sub>	Bacilos G-	+
$\mu$ 3.1	STD S <sub>23</sub>	Cocos G+	+	$\mu$ 13	*STD S $\mu$ <sub>2</sub>	Bacilos G-	+
$\mu$ 3.2	STD S <sub>23</sub>	Cocos G+	+	$\mu$ 15	*STD S $\mu$ <sub>12</sub>	Bacilos G-	+
$\mu$ 5	STD S <sub>13</sub>	Cocos G+	-	$\mu$ 16	*STD S $\mu$ <sub>2</sub>	Bacilos G+	+
$\mu$ 6	STD S <sub>23</sub>	Bacilos G-	+	$\mu$ 20.1	*STD S <sub>12</sub>	Bacilos G-	+
$\mu$ 9.1	STD S <sub>03</sub>	Bacilos G-	+	$\mu$ 20.2	*STD S <sub>12</sub>	Cocos G+	+
$\mu$ 9.2	STD S <sub>03</sub>	Cocos G+	+	$\mu$ 23	STD S <sub>21</sub>	Cocos G+	+
$\mu$ 10	MRS S <sub>03</sub>	Cocos G+	+	$\mu$ 24	Ps S <sub>03</sub>	Cocos G+	+

\*STD representa medio de cultivo Agar Cuenta Estándar utilizado para evaluar psicrótrofos, STD Agar Cuenta Estándar empleado para mesófilos, BRVA corresponde al Agar Bilis Rojo Violeta y Ps al Agar F para *Pseudomonas*.

**Tabla 26. Identificación por medio del sistema Vitek® 2 de aislados obtenidos de muestras de carne sometidas a diferentes procesos (refrigeración, empacado al vacío, presurización)**

Aislado	Tipo de muestra	Probabilidad de identidad (%)		Identidad
<b>Gram-positivas</b>				
$\mu$ 3.1	VR	94.68	MB	<i>Staphylococcus warneri</i>
$\mu$ 3.2	VR	93.00	MB	<i>Staphylococcus hominis</i>
$\mu$ 5	R	95.00	MB	<i>Streptococcus pluranimalium</i>
$\mu$ 9.2	F	87.04	A	<i>Staphylococcus intermedius</i>
$\mu$ 10	F	99.00	E	<i>Enterococcus faecium</i>
$\mu$ 16	VPR	NI		NI
$\mu$ 20.2	R	99.00	E	<i>Kokuria kristinae</i>
$\mu$ 23	VR	94.31	MB	<i>Alloicoccus otitis</i>
$\mu$ 24	F	99.00	E	<i>Kokuria varians</i>
<b>Gram-negativas lactosa</b>				
$\mu$ 1A	R	-	99.00 E	Grupo <i>Salmonella</i>
$\mu$ 6	VR	-	99.00 E	Grupo <i>Salmonella</i>
$\mu$ 9.1	F	+	99.00 E	<i>Moellerella wisconsensis</i>
$\mu$ 11B	F	-	99.00 E	<i>Pantoea agglomerans</i>
$\mu$ 13	VPF	+	98.23 E	<i>Moellerella wisconsensis</i>
$\mu$ 15	R	+	99.00 E	<i>Moellerella wisconsensis</i>
$\mu$ 20.1	R	-	33.83 D	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
			33.08 D	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
			33.08 D	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

F. Carne fresca, no fue sometida a ningún proceso.

R. Carne refrigerada a 4° C durante 5 días.

VR. Carne empacada al vacío y refrigerada a 4° C durante 5 días.

VPF. Carne empacada al vacío y presurizada.

VPR. Carne empacada al vacío, presurizada y refrigerada a 4° C durante 5 días.

NI. No identificado

Identificación: E Excelente, MB Muy Buena, A Aceptable, D Deficiente.

---

Estos resultados muestran congruencia respecto a la posible procedencia de estos microorganismos. Por ejemplo, dentro de las bacterias gram-positivas, *Staphylococcus* sp. ha sido reportado en carne, destacándose la presencia de las especies *S. intermedius*, *S. warneri*, *S. hominis* [Nel *et al.*, 2004; Shale *et al.*, 2005; Ercolini *et al.*, 2006; Al-Tarazi *et al.*, 2009; Ray *et al.*, 2010; Esquivel, 2011; Pennacchia *et al.*, 2011]. Su presencia puede deberse a la contaminación por el agua empleada durante su manipulación, por los operarios o utensilios de trabajo ya sea durante su almacenamiento o distribución [Al-Tarazi *et al.*, 2009] o incluso por el manejo de carne de otras especies animales que podrían portar la contaminación [Sierra *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2006; Al Bulushi *et al.*, 2010].

El género *Streptococcus* también ha sido reportado en carne [Nychas & Drosinos, 1999; Ellis & Goodacre, 2006]. *S. pluranimalium* en particular ha sido reportado en muestras de ganado bovino, caprino y en algunos animales domésticos, por lo que su presencia en carne fresca resulta plausible. No ha sido aislado de humanos ni se ha reportado como patógeno [Devriese *et al.*, 1999].

*Enterococcus faecium* ha sido reportado en carne de res, en cerdo y pollo, posiblemente por contaminación durante el faenado o la manipulación en el comercio [Franz *et al.*, 2010; Aslam *et al.*, 2012] y el género *Enterococcus* ya ha sido reportado antes en carne [Nychas & Drosinos, 1999; Ellis & Goodacre, 2006]. Especies de este género son comensales del tracto gastrointestinal del ser humano y otros mamíferos, es común en el medio ambiente (suelo, agua, plantas) y como BAL es importante en alimentos por causar su descomposición o por contribuir con las fermentaciones [Franz *et al.*, 2010; Hammerum *et al.*, 2012].

El género *Kokuria* pertenece a la familia *Micrococaceae* y está entre los micrococos que también han sido reportados en carne roja [Ingram & Simonsen, 1980; Rosset, 1994; Jackson *et al.*, 2001; Warris, 2003; Esquivel, 2011]. Este género incluye bacterias detectadas en este trabajo, *K. kristinae* y *K. varians*, ambas anaerobias facultativas que han sido aisladas también de piel humana y de otros mamíferos, así como de la naturaleza (agua, suelo), carnes rojas y carne de pollo y ambas son consideradas posibles patógenos oportunistas en humanos [Stackebrandt *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 2005; Savini *et al.*, 2010].

En cuanto a *Alloiococcus otitis*, es la única especie del género *Alloiococcus* y su aislamiento fue reportado a partir del fluido de oído medio de pacientes infantiles con otitis

---

crónica y se describen fenotípicamente como *Streptococcus* pero pertenece a la familia *Carnobacterium*, siendo parte de las BAL [Aguirre & Collins, 1992]. Este resultado bien puede estar indicando contaminación por parte del personal que manipula el producto para su comercialización, o bien, una respuesta bioquímica muy similar a otra BAL o algún estreptococo con el que comparta rasgos fenotípicos.

Ahora, considerando los resultados obtenidos en la identificación de bacterias gram-negativas, *Salmonella* spp. tiene alta incidencia de detección en carne, incluso se ha asociado con un alto índice de infecciones vinculada al consumo de alimentos contaminados como carne y productos cárnicos [Norrung & Buncic, 2008]. Este estudio también muestra su presencia, obteniéndose dos aislamientos de este grupo microbiano.

*Moellerella wisconsensis* se trata de una bacteria aerobia facultativa que originalmente fue aislada de muestras fecales humanas pero también se ha aislado de muestras ambientales, agua sin clorar, alimentos y en animales [Hickman-Brenner *et al*, 1984; Sandfort *et al.*, 2002]. Aunque su papel como patógeno no está claro, ha sido aislado en algunas ocasiones de pacientes con diarrea, colecistitis y peritonitis [Wittke *et al*, 1985; Ohanessian *et al.*, 1987; Stock *et al.*, 2003] pero se considera que su prevalencia en casos clínicos es raro [Stock *et al.*, 2003]. Por tanto, aunque no se ha detectado en muestras de carne fresca puede asociarse a contaminación ambiental o incluso fecal.

Sobre *Pantoea agglomerans* [Gavini *et al*, 1989], se ha reportado asociada a plantas, sin ser parásito [Andrews & Harris, 2000; Lindow & Brandl, 2003; Grimont & Grimont, 2005] aunque hay cepas que se han detectado como patógenos de plantas o comensales de éstas [Montier & Lindow, 2005]. Así mismo, se ha aislado de muestras de suelo, agua y sedimentos [Brown & Leff, 1999; Francis *et al.*, 2000] y algunas cepas han sido asociadas a infecciones y septicemias como un patógeno oportunista en el hombre, sin embargo, su posición como patógeno tampoco está bien definido pues se sospecha, al igual que con *M. wisconsensis*, que su identificación en muestras clínicas ha sido errónea [Stock *et al.*, 2003; O'Hara & Miller, 2003; O'Hara, 2006; Rezzonico *et al.*, 2009]. Igualmente, se ha descrito como parte de la microbiota aerobia facultativa que contribuye a la descomposición de la carne [Nychas & Drosinos, 1999], por lo que su presencia no resulta inconsistente y puede proceder del ambiente.

*Pseudomonas fluorescens* ha sido detectada en carne [Mellor *et al.*, 2010; Chiang *et*



---

*al.*, 2012]. Además, el género *Pseudomonas* se considera como el principal género psicrótrofo asociado a la descomposición de la carne [Nychas & Drosinos, 1999; Warriss, 2003] y el aislado  $\mu 20$  fue obtenido de las placas para cuenta de psicrótrofos. De modo que su recuperación de carne refrigerada no resultaría del todo incongruente, sin embargo, se sugieren más pruebas para descartar que la identidad de este aislado se corresponda con *Acinetobacter Iwoffii* o con *Sphingomonas paucimobilis* ya que, por ejemplo, la presencia en carne de *A. Iwoffii* no estaría fuera de lugar ya que este género se considera como parte de la microbiota que puede causar alteraciones en carne [Ingram & Simonsen, 1980; Rosset, 1994; Warriss, 2003].

*A. Iwoffii* se ha detectado en suministro de agua para beber y en agua purificada así como en otros ambientes acuáticos y sedimentos psicrótrofos [Breuil *et al.*, 1975; Guardabassi *et al.*, 1999; Penna *et al.*, 2002], no estaría tampoco fuera de lugar su presencia en este producto ya que este género se considera como parte de la microbiota que puede causar alteraciones en carne [Ingram & Simonsen, 1980; Rosset, 1994; Nychas & Drosinos, 1999; Warriss, 2003].

Así, *A. Iwoffii* tiene presencia en el ambiente al igual que *Sphingomonas paucimobilis* que ha mostrado ser característica de suelos y es muy utilizada en biorremediación tanto de agua como de suelo [Leys *et al.*, 2003]. En el caso particular de *S. paucimobilis*, con anterioridad había sido erróneamente asignado al género *Pseudomonas* [Holmes *et al.*, 1977; White *et al.*, 1996], por lo que es posible que muchas de las pruebas bioquímicas de éstas sean semejantes. Brightwell y col. [2006] reportaron el aislamiento de *S. paucimobilis* de una cinta transportadora (marca Intralox™) en una sala de deshuese de cordero, siendo el primer reporte de su aislamiento asociado a la carne roja. Así mismo, los resultados de catalasa y lactosa son congruentes con lo reportado en la literatura, por lo que la identificación por medio del Vitek® 2 no resulta inconsistente pero se requiere profundizar en la identificación por medio de otras pruebas bioquímicas o moleculares adicionales.

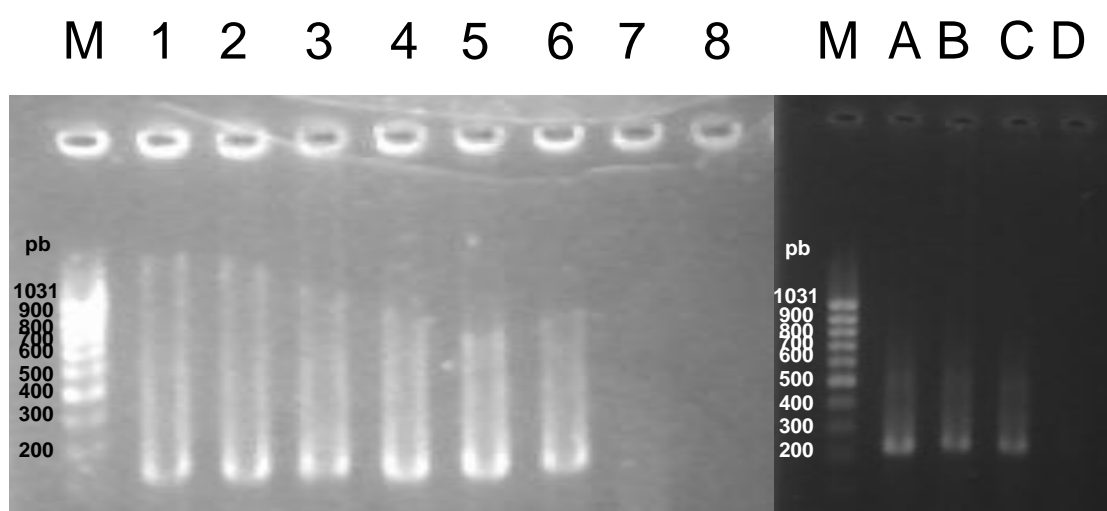
Como se aprecia, muchas de estas especies bacterianas son comunes en el ambiente o como parte de la microbiota humana, de modo que la contaminación con éstas pudo darse en cualquiera de las etapas de procesamiento de la carne, desde los utensilios empleados para el faenado, la manipulación de los diferentes operarios o solamente por el contacto con el medio ambiente. Sería oportuno realizar un análisis más profundo

particularmente para los casos de *A. otitis* (carne empacada al vacío y en refrigeración), *M. wisconsensis* (en carne fresca, carne refrigerada y carne presurizada) y *P. agglomerans* (en carne fresca) para quienes sería el primer reporte de su presencia en este producto.

### 7.3.3 Evaluación de la microbiota nativa por medio de PCR-DGGE

#### 7.3.3.1 PCR gen 16S rRNA, región V3

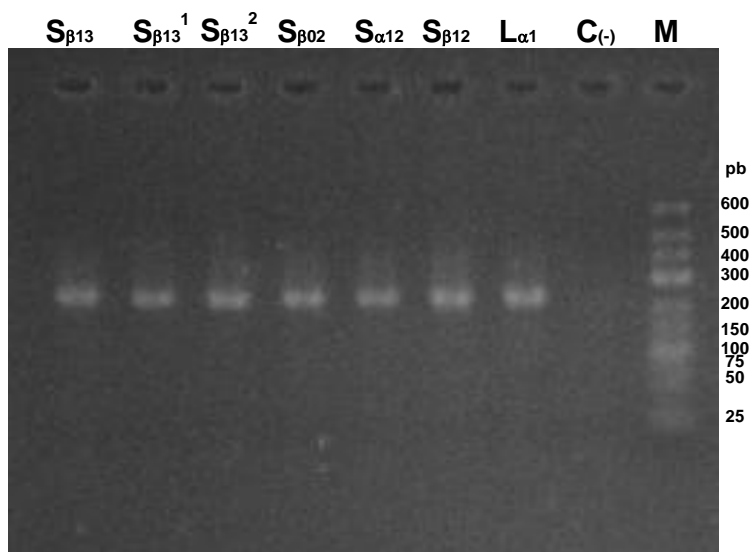
Se realizaron los primeros ensayos en la estandarización de la PCR para obtener amplificación de un fragmento de la región V3 del gen 16S rRNA, utilizando los oligos Agc 338r (específico para Bacteria) y el B115R (universal) [Ampe, 1999]. Los fragmentos obtenidos con las primeras condiciones evaluadas se representan en la figura 17.



**Figura 17.** Gel de agarosa para PCR de V3, 16S rRNA. M corresponde al marcador de masa molecular, las muestras 1 a 5 corresponden a los controles negativos trabajados para las muestras utilizadas al evaluar 172 MPa, 7 es un control negativo de PCR y el carril 8 no va cargado. Para esta PCR se utilizó agua destilada estéril. Para los demás carriles se utilizó la misma muestra de DNA, C<sub>0</sub>, pero se modificó la mezcla de reacción: A. Tween 20+Glicerol+Agua desionizada estéril, B. Albúmina Sérica Bovina+Agua desionizada, C. Agua desionizada, D. control negativo de PCR. El gel claro fue al 2% y el oscuro al 1.5%, ambos corrieron a 70 V, 60 min. Fragmento esperado de 233 pb para el juego de oligos Agc338f, B518R.

Para esta primera evaluación se probaron diferentes componentes para la mezcla de reacción (tabla 14) ya que con los reactivos básicos de la PCR se obtuvo un barrido del fragmento, aunque éste se localiza en el peso molecular esperado (cerca de 233 pb [Ampe *et al.*, 1999]). Por este motivo se probaron otros reactivos que permitieran una mejor separación del fragmento con el objetivo de utilizarlos para proceder con los ensayos para el DGGE (tween 20 y glicerol, como en la PCR utilizada para *Salmonella* y *Listeria*) e igualmente se utilizó menor cantidad de DNA, entre 1.2 a 15.83 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  (figura 18). El tween 20 es un detergente iónico y contribuye a estabilizar la Taq evitando la formación de estructuras secundarias, aumentando con ello el rendimiento de la reacción; así mismo, el

glicerol actúa como un viscosígeno, lo cual permite un mejor avance del producto de PCR durante la electroforesis [Espinosa-Asuar, 2007].



**Figura 18.** Gel de agarosa para PCR de V3, 16S rRNA. M corresponde al marcador de masa molecular y C(-) al control negativo para la reacción de PCR. S<sub>β13</sub> equivale a 15.83 ng μL<sup>-1</sup>; S<sub>β02</sub> a 5.55 ng μL<sup>-1</sup>; S<sub>α12</sub> a 8.50 ng μL<sup>-1</sup>; S<sub>β12</sub> a 10.12 ng μL<sup>-1</sup> y L<sub>α1</sub> a 1.2 ng μL<sup>-1</sup>. Condiciones: gel de agarosa al 2%, 70 V, 60 min. Fragmento esperado de 233 pb.

**Tabla 27. DNA seleccionado para efectuar PCR-DGGE**

DNA	DNA
S <sub>01</sub>	μTe
S <sub>11</sub>	C <sub>0</sub>
S <sub>31</sub>	C <sub>1</sub>
S <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>
S <sub>μ02</sub>	C <sub>3</sub>
S <sub>μ12</sub>	M
S <sub>μ22</sub>	<i>Enterobacter</i>
S <sub>μ32</sub>	<i>Escherichia coli</i>
S <sub>μ2</sub>	<i>Klebsiella</i>
S <sub>μ42</sub>	<i>Listeria</i>
μ <sub>42</sub>	<i>Morganella</i>
S <sub>μ03</sub>	<i>Pseudomonas</i>
S <sub>μ13</sub>	<i>Salmonella</i>
S <sub>μ23</sub>	<i>Serratia</i>
S <sub>μ33</sub>	6-A'
S <sub>μ3</sub>	33

La letra S representa a las muestras que se corrieron a la par del trabajo con *Salmonella* Typhimurium con 345 MPa, pero que corresponden a los controles negativos de inoculación. S<sub>μ</sub> representa DNA obtenido de muestras trabajadas a la par de *Salmonella* pero que fueron manejadas solamente para microbiota nativa. μTe corresponde a una única muestra que al parecer sólo contenía BAL. Los números representan el tratamiento y la réplica (respectivamente) de la cual proceden donde 0 corresponde a carne fresca, 1 a refrigerada, 2 a carne empacada a vacío y refrigerada, 3 carne empaca al vacío y presurizada (345 MPa). S<sub>1,2,3</sub> corresponden a las muestras que se empacaron al vacío, se presurizaron y se refrigeraron 5 días a 4° C. C<sub>0,1,2,3</sub> y M corresponden a muestras control negativo utilizadas para evaluar 172 MPa de presión, donde M representa la muestra empacada a vacío, presurizada y refrigerada. Las bacterias utilizadas como marcadores, incluyendo 6-A' y 33 (presuntas BAL<sup>58</sup>) proceden de la colección del laboratorio 324 del conjunto E de la Facultad de Química/UNAM.

<sup>58</sup> Secuenciación pendiente.

---

Habiendo obtenido amplicones que pueden considerarse de buena calidad y concentración, en la tabla 27 se enlistan las muestras de DNA elegidas para la PCR-DGGE a efectuar en trabajos futuros para complementar el monitoreo de la modificación de la microbiota nativa como respuesta a los diferentes tratamientos evaluados.

## **7.4 Efecto de los tratamientos en el color de la carne fresca**

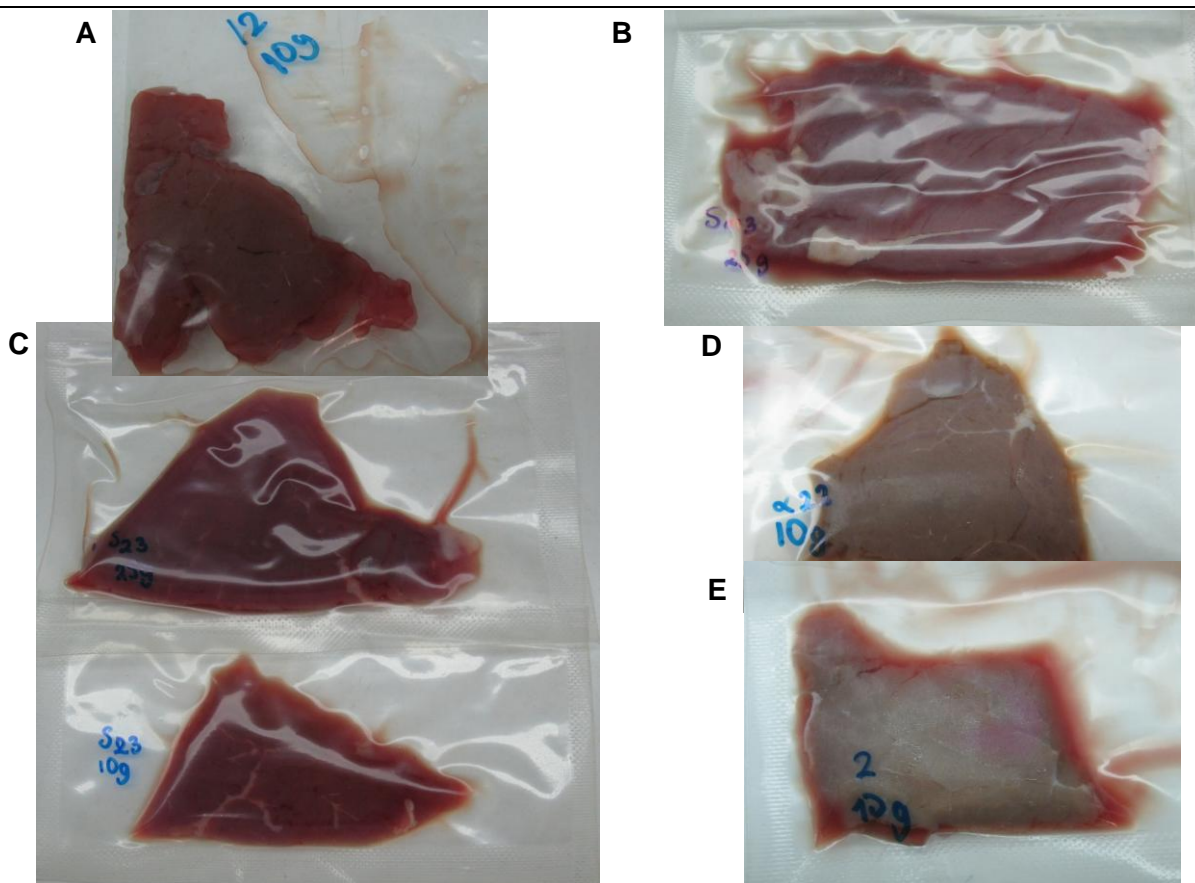
### **7.4.1 Registro fotográfico**

Los resultados obtenidos también proporcionaron información sobre la modificación de la coloración de la carne, importante ya que tanto el empacado al vacío, la PHUA y la refrigeración por tiempo prolongado tienen efecto sobre la coloración de ésta [Varnam & Sutherland, 1995; Hugas *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2003; Grébol, 2004; Ercolini *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2003; Picouet *et al.*, 2008]. El cambio en el color se debe principalmente a los cambios en el estado de oxidación de la mioglobina presente en la carne (como se aprecia en la figura 1).

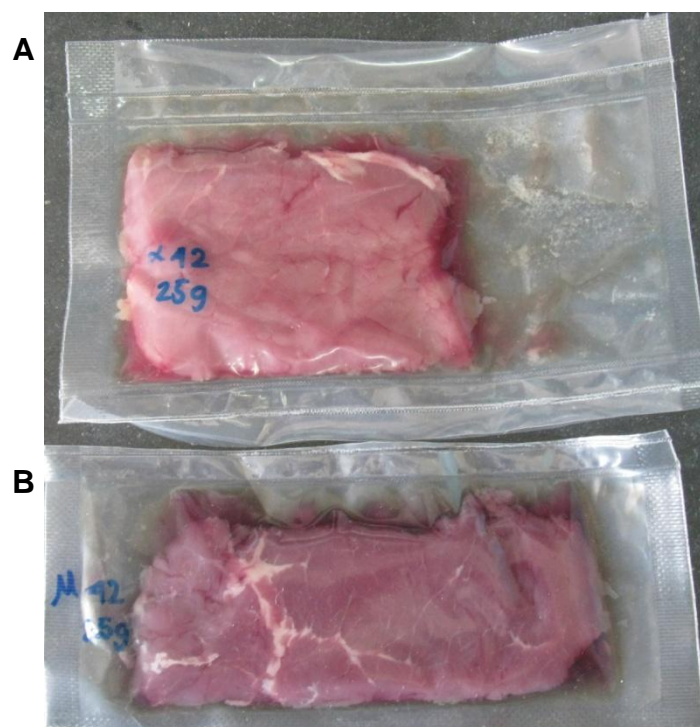
En términos generales, basándose únicamente en la apariencia visual, la coloración de la carne se ve modificada mayormente en el caso de ser sometida a refrigeración y en menor medida como resultado de la aplicación inmediata de presión hidrostática ultra alta, aunque el vacío también posee efecto importante (figura 19).

Al disminuir la disponibilidad de O<sub>2</sub> al empacar al vacío, se forma metamioglobina, lo cual proporciona una tonalidad color pardo a la carne [Varnam & Sutherland, 1995; Grébol, 2004] y se acumula exudado por la pérdida de agua de la misma, lo cual también se aprecia en las muestras. Igualmente, el vacío fomenta la formación paulatina de deoximioglobina (la forma reducida de la mioglobina), que proporciona una coloración purpúrea a la carne. La oximioglobina desaparece casi en su totalidad (forma oxidada de la mioglobina responsable del color rojo cereza), como se aprecia en las figuras 19 y 20.

También hay un efecto de la presión sobre la coloración y se debe en cierta medida a la desnaturalización de la mioglobina que del estado ferroso pasa al férrico, contribuyendo a la formación de metamioglobina (color castaño o pardo) [Varnam & Sutherland, 1995].



**Figura 19.** Efecto de los tratamientos evaluados en el color de la carne. A. Carne fresca, B. carne fresca empacada al vacío y presurizada, C. carne fresca empacada al vacío, D. carne empacada al vacío y refrigerada 5 d a 4° C, E. carne empacada al vacío, presurizada y refrigerada 5 días a 4° C

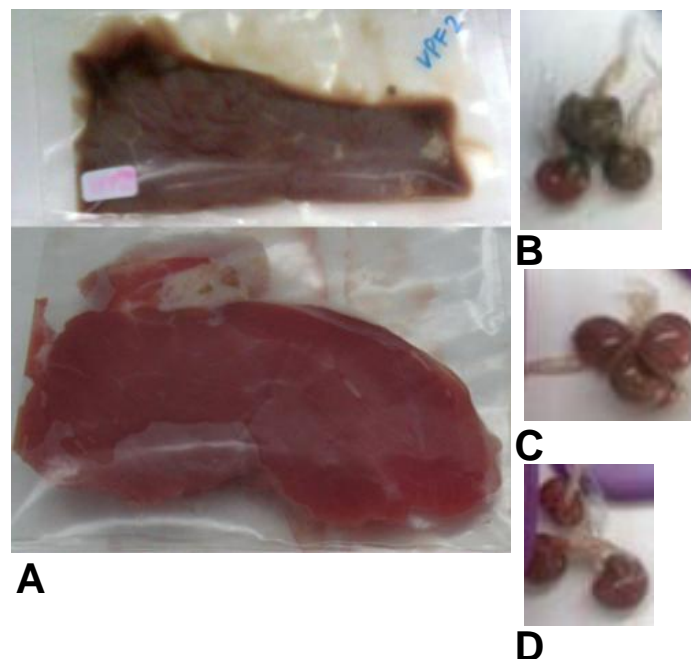


**Figura 20.** Ejemplo del aspecto de algunas muestras de carne sometidas al tratamiento con PHUA. A. Muestra de carne inoculada con *Salmonella* Typhimurium empacada al vacío, presurizada y refrigerada durante 42 días a 4° C; B. muestra de carne sin inocular empacada al vacío, presurizada y refrigerada durante 33 días (VPR<sub>33d</sub>).

La muestra VPR<sub>33d</sub> (muestra sin inocular artificialmente, figura 20B) a diferencia de la VPR inoculada con *S. Typhimurium* refrigerada durante 42 días (figura 20A), muestra un color ligeramente purpúreo y también un exudado dentro del empaque que de coloración verdosa. Es muy probable que en esta última muestra se encuentren presentes bacterias con capacidad proteolítica (de hecho, es una muestra con destacada presencia de *Pseudomonas* spp.). Es posible que al degradar las proteínas de la carne se libere sulfuro de hidrógeno que al reaccionar con la mioglobina del tejido forma sulfomioglobina que es un pigmento verdoso. Igualmente, las BAL al formar peróxido de hidrógeno [Streinkraus, 1983; Daeschel, 1989] estarían contribuyendo en esta modificación del color de forma importante, particularmente porque resultan ser parte de la microbiota predominante en la muestra VPR<sub>33d</sub> (figura 16).

#### 7.4.2 Análisis colorimétrico

En la figura 21 se muestra el aspecto de las muestras de carne utilizadas para la evaluación colorimétrica.



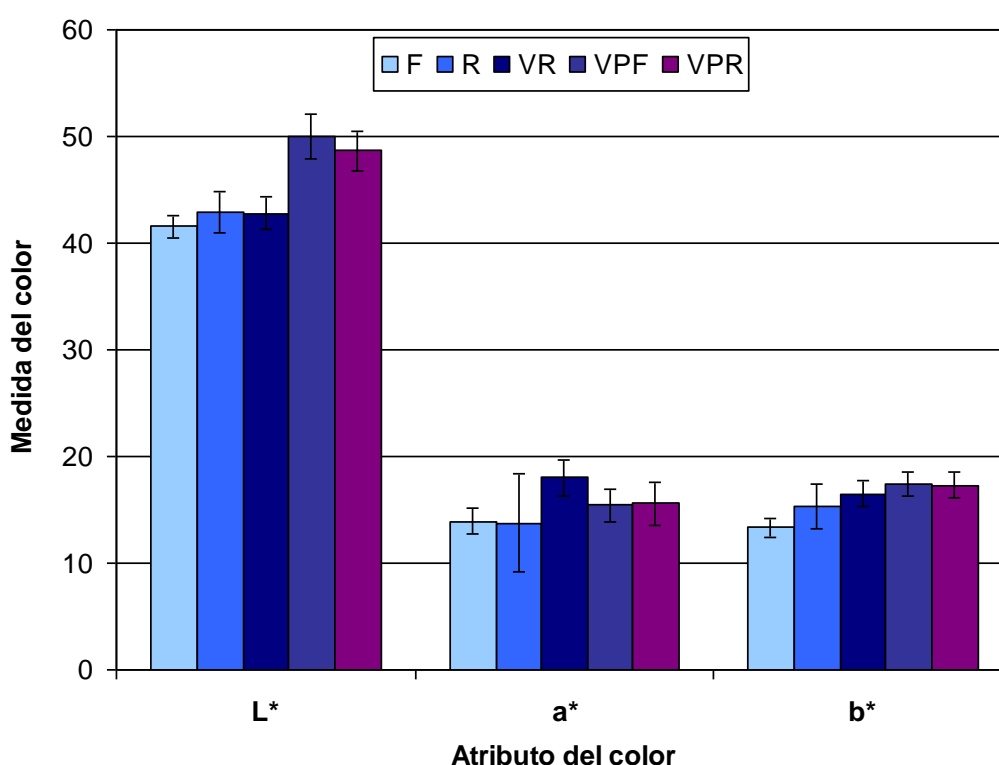
**Figura 21.** Aspecto de las muestras de carnes utilizadas para el análisis colorimétrico. A. Muestras sin refrigerar, en la parte superior carne fresca, empacada al vacío y presurizada (muestra VPF) y en la parte inferior carne fresca (muestra F); B. Muestra de carne refrigerada (muestra R); C. corresponde a muestra empacada al vacío, presurizada y refrigerada (VPR) y D. muestra empacada al vacío y refrigerada. Todas las muestras refrigeradas permanecieron 5 días a 4° C

Los datos de la modificación de los parámetros del color evaluados con el sistema CIE  $L^*a^*b^*$  y el resultado del cálculo de  $\Delta E^*$  están registrados en la tabla 28 y la figura 22.

**Tabla 28. Modificación de los parámetros de color del sistema CIE  $L^*a^*b^*$  y valor del cambio total del color**

Muestra	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$
F	41.53 ± 1.09	13.95 ± 1.21	13.36 ± 0.91	---
R	42.88 ± 1.98	13.78 ± 4.63	15.29 ± 2.11	2.36
VR	42.82 ± 1.48	18.00 ± 1.66	16.52 ± 1.15	5.30
VPF	50.12 ± 2.03	15.63 ± 1.65	17.63 ± 1.29	9.74
VPR	48.64 ± 1.91	15.58 ± 2.08	17.31 ± 1.20	8.30

±DS resultado de 11 mediciones.



**Figura 22.** Modificación de los parámetros del color evaluados con el sistema CIE  $L^*a^*b^*$  por efecto de los tratamientos: refrigeración (R), vacío y refrigeración (VR), vacío y presurización sin refrigeración (VPF) y vacío, presurización y refrigeración (VPR), comparados con la carne fresca (F) como control. La refrigeración fue a 4° C durante 5 días. ± DS de 11 réplicas.

El parámetro  $L^*$  representa la claridad o luminosidad (adquiere valores de 0 a 100 que va del oscuro al claro, con valores mayores a 60 corresponde a muestras claras y con valores inferiores a muestras oscuras [Escamilla, 2006]). Este valor dependerá de factores tales como el pH, la capacidad de retención de agua, humedad, integridad muscular y del grado de oxidación de los hemopigmentos (deoximioglobina, metamioglobina, oximioglobina, etc.) [Padilla, 2010].

---

Siendo que la muestra control corresponde a la carne fresca a la cual no se le aplicó ningún proceso (F), ésta mostró visualmente un agradable color rojo cereza intenso, con buena luminosidad, exhibiendo un valor  $L^*$  de 41.53. De forma comparativa, este valor aumentó para las demás muestras, particularmente para VPF y VPR, las muestras presurizadas (345 MPa). Por lo que podrían ser consideradas las muestras más claras o luminosas. Cabe mencionar que este parámetro del color es el que más se ve reflejado en la percepción visual del producto [Padilla, 2010]. Así mismo, los valores obtenidos están entre los valores reportados para muestras frescas de milanesa, cuete, filete y sirloin [Padilla, 2010].

Los valores de  $a^*$  están relacionados con la coloración roja de la carne, un valor mayor se ha vinculado con un mayor contenido de mioglobina [Pérez-Álvarez *et al.*, 1998]. Los valores resultantes son similares entre las muestras F y R, así como entre VPF y VPR (tabla 28), lo que podría indicar que la refrigeración no tiene un efecto radicalmente importante sobre este parámetro. Y aunque en las muestras presurizadas el valor obtenido es superior al de F (el control), para la muestra empacada al vacío éste valor es mayor. De tal manera que el vacío en que se empacaron estas tres muestras tiene un efecto importante, probablemente relacionado con el estado de oxidación de la mioglobina. Como ya se ha mencionado, al eliminar el  $O_2$  del empaque se disminuye la posibilidad de que la oximioglobina presente se oxide para formar metamioglobina, lo que representaría un cambio de color del rojo brillante hacia rosa y luego a pardo [Varnam & Sutherland, 1995]. O bien, la contribución del vacío podría relacionarse con la paulatina formación de deoximioglobina (al reducirse la oximioglobina), que proporcionaría una coloración roja purpúrea.

Otros valores de  $a^*$  que se han reportado van de 6.76 para cuete y 12.48 para chambarete, el cual fue considerado de mayor coloración roja percibiéndose incluso de forma visual por un panel de jueces [Padilla, 2010].

El parámetro  $b^*$ , como ya se ha mencionado, se relaciona con la coloración amarilla. Se ha reportado que para sirloin el valor  $b^*$  es de 12.19; el aumento de este valor podría indicar una ligera tonalidad hacia el marrón o hacia el pardo como ocurre con la milanesa, cuyo  $b^*$  es de 15.33 [Padilla, 2010].



Los valores  $b^*$  obtenidos (tabla 28) son muy similares entre todas las muestras aunque los mayores se obtienen para las muestras presurizadas (VPF, VPR; 345 MPa). En ambos casos, la presurización podría tener efecto al desnaturalizar la mioglobina formando metamioglobina (hemopigmento de color pardo) [Varnam & Sutherland, 1995]. Aunque podría descartarse la desnaturalización de la actina y la miosina que proporcionarían opacidad a las muestras puesto que se observó mayor luminosidad en éstas. Igualmente, podría descartarse la formación del pigmento purpúreo ya que el valor  $b^*$  se perfila hacia el amarillo, que de forma conjunta con  $a^*$  indicaría una coloración del rosado hacia el pardo y que bien podría relacionarse con la oxidación de oximioglobina o deoximioglobina a metamioglobina, tal vez por la actividad metabólica de la microbiota nativa. De hecho, podría ser que la tendencia hacia el rosa y ligero tono pardo de las muestras presurizadas sea la causante de un valor de luminosidad alto en éstas.

Así que se aprecia levemente una pérdida original del color, aumenta la luminosidad pero hay una modificación en la tonalidad roja que pasa a rosa (similar en cierta medida a la carne cocida ligeramente).

Los resultados indican que hay diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en el análisis de varianza del cambio total del color ( $\Delta E^*$ ) por efecto de los diferentes tratamientos (tabla 29).

**Tabla 29. Comparación del cambio total del color ( $\Delta E^*$ ) por efecto de los tratamientos evaluados**

Tratamiento	$\Delta E^*$
VR	$5.63 \pm 2.07^a$
R	$5.95 \pm 2.09^a$
VPR	$8.55 \pm 1.79^b$
VPF	$9.87 \pm 2.41^b$

<sup>ab</sup> Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre el cambio global del color. Tratamientos: R Refrigeración, VR Vacío y Refrigeración, VPF Vacío y Presión de carne fresca, VPR Vacío, Presión y Refrigeración.

Al parecer, el mayor efecto en la modificación global del color se dio con VPF al igual que con VPR, por lo que el tratamiento de la carne para conservar por medio de PHUA genera modificaciones en la coloración del producto, de forma contrastante con respecto al empacado al vacío y la refrigeración *per se*.

Si bien, para el caso de  $\Delta E^*$ , siendo el valor para la muestra VPR el mayor, se puede considerar que se mantiene en límites aceptable comparando con valores de  $\sim 9$  reportado

---

para carne fresca empacada con aire y refrigerada durante 14 días a 5° C [Ercolini *et al.*, 2006]. Un valor  $\Delta E^*$  de 10 ya es considerado significativo [Jung *et al.*, 2003]. Un rápido aumento de este valor implica un vire marcado de rojo a café o pardo, en este caso el cambio de rojo es hacia el rosado. Se podría sugerir que con estos valores de  $\Delta E^*$  la presurización a 345 MPa durante 1 minuto a temperatura ambiente no tiene un efecto marcado en la modificación de la coloración de la carne fresca en cuanto a la apreciación visual del consumidor (ante un panel de jueces [Padilla, 2010]) pero sí a nivel instrumental.

---

## 8. Conclusiones

- La evidencia estadística sugiere que no hay diferencia significativa en la disminución de las cuentas de *S. Typhimurium* usando 172 MPa o 345 MPa ( $P>0.05$ ), sin embargo, los resultados de cuenta en placa indican que la aplicación de 345 MPa tiene mejor inactivación. Es posible que 3 repeticiones no sean suficientes para obtener una evaluación estadística adecuada.
- La PHUA parece tener efecto en la disminución de las cuentas de *L. monocytogenes* únicamente después de la aplicación del tratamiento pero no hay diferencia significativa ( $P>0.05$ ) entre los tratamientos evaluados para disminuir las cuentas de esta bacteria. Durante el periodo de refrigeración después de la presurización las cuentas se recuperaron aunque sin llegar a los niveles de las muestras refrigeradas que no fueron presurizadas.
- La mejor inactivación de patógenos se alcanzó con *Salmonella* Typhimurium al recibir el tratamiento VPR (empacado al Vacío, Presurizado y Refrigeración 5 días a 4° C), con diferencia altamente significativa ( $P<0.01$ ) respecto a los demás tratamientos (refrigeración, empacado al vacío y refrigeración) y respecto a *L. monocytogenes*.
- *S. Typhimurium* resulta más lábil a los tratamientos con respecto a *L. monocytogenes*, de hecho, resulta posible que el efecto conseguido con VPR sea el efecto conjunto de los procesos involucrados en la preservación con PHUA. Así, la PHUA permite inactivar patógenos, aunque con diferencias en la disminución de las cuentas.
- La PHUA tiene mayor efecto sobre *Pseudomonas* spp. de forma altamente significativa ( $P<0.01$ ), y en cierta medida sobre enterobacterias, en ambos se observó el mayor efecto en la disminución de las cuentas microbianas.
- Las BAL son las que mostraron ser más resistentes al procesamiento (empacado al Vacío, Presurización y Refrigeración). Igualmente, son el grupo microbiano predominante en las muestras procesadas con PHUA, que además nutrieron las cuentas de psicrótrofos aerobios.

- 
- Las bacterias gram-negativas se muestran más susceptibles al tratamiento con PHUA, utilizando 345 MPa de presión durante 1 minuto, a diferencia de las bacterias gram-positivas, como bien se observa con *S. Typhimurium*, *Pseudomonas* spp. y enterobacterias, a diferencia de *L. monocytogenes* y BAL.
  - El tratamiento con PHUA (345MPa, 1 minuto, temperatura ambiente) disminuye la carga microbiana inicial de forma importante, por lo cual, durante el periodo de refrigeración ésta se mantiene por debajo de los valores alcanzados en muestras sin este procesamiento. Por lo tanto, mantiene mejor calidad microbiana respecto a la carne refrigerada e incluso que la carne empacada al vacío y refrigerada.
  - El uso de 345 MPa de presión aplicada 1 minuto a temperatura ambiente no tuvo efectos significativos ( $P > 0.05$ ) sobre modificaciones del pH de la carne respecto a las muestras que fueron sometidas a los demás tratamientos e incluso respecto a la carne fresca.
  - La presurización tiene efecto significativo ( $P < 0.05$ ) en la variación total del color analizado instrumentalmente, aunque visualmente parece no ser del todo importante y no sería fácilmente detectable a simple vista por el consumidor.
  - De esta manera, la PHUA (345 MPa, 1 minuto, temperatura ambiente) se perfila como un método adecuado para descontaminar carne fresca, particularmente si se esperan cuentas bajas de bacterias o si se trata de gram-negativas. Se consideraría como un tipo de método de *pasteurización* para prolongar el tiempo de vida de anaquel en refrigeración de la carne fresca. Comparativamente resulta más eficiente que la refrigeración. Así, podría utilizarse como parte de la Tecnología de Obstáculos (o de barreras).

---

## 9. Perspectivas

Para continuar con este proyecto, es relevante el poder incrementar las réplicas utilizadas para cuenta en placa con el fin de llevar a cabo un análisis estadístico más confiable; también es importante extender el análisis por más de 5 días para determinar el tiempo de vida útil del producto.

Al haber estandarizado las PCRs con oligos específicos y mejorado el manejo de esta técnica molecular, podría efectuarse PCR semicuantitativa (con RNA) o RT-qPCR (a partir de cDNA) para contrastar los resultados obtenidos con las técnicas clásicas de microbiología. Igualmente, con la PCR con oligos para la región V3 del gen 16S rRNA ya estandarizada, se espera poder llevar a cabo los ensayos necesarios para montar y efectuar la DGGE. Esto con el propósito de determinar las modificaciones en la estructura de la comunidad microbiana presente en la carne por efecto de los tratamientos de PHUA y los demás procesos que se ven involucrados en este tratamiento. De ser posible, las bandas que resulten interesantes en los patrones que se obtengan en la DGGE (sea por su rareza o por ser repetitivas), serán recuperadas para secuenciar el fragmento y poder identificar a la bacteria a la que pertenece. Estos resultados también podría contrastarse con los resultados brindados por el Vitek® 2.

Finalmente, los aislados obtenidos que se consideran relevantes por ser la primera vez que se reportan en carne, bien podrían ser utilizados también para efectuar su secuenciación y determinar si se corresponde con la especie asignada con el sistema Vitek® 2.

---

## 10. Bibliohemerografía

- [1] Adams, M. R. & Moss, M. O. (1997) *Microbiología de los Alimentos*. Editorial Acribia, España. Pp. 129, 142-147.
- [2] Aguirre, M. & Collins, M. D. (1992) Phylogenetic Analysis of *Alloiococcus otitis* gen. nov., sp. nov., an Organism from Human Ear Fluid. *Int J System Bacteriol.* **42**(1):79-83.
- [3] Al Bulushi, I. M., Pook, S. E., Barlow, R., Deeth, H. C. & Dykes, G. A. (2010) Speciation of Gram-positove bacteria in fresh and ambient-stored subtropical marine fish. *Int J Food Microbiol.* **138**:32-38.
- [4] Allan, J. T., Yan, Z. & Komacki, J. L. (2004) Surface material, temperatura, and soil effects on the survival of selected foodborne pathogens in presence of condensate. *J Food Prot.* **67**:2666-2670.
- [5] Al-Tarazi, Y. H., Alberta, M. A. & Alaboudi, A. R. (2009) Biotyping and enterotoxigenicity of Staphylococci isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. *Food Research Int.* **42**:374-379.
- [6] Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C. & Guyot, J. P. (1999) Polyphasic study of spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, fermented maize dough, demonstrates tradicional fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(12):5464-5473.
- [7] Andrews, J. H. & Harris, R. F. (2000) The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Ann Rev Phytopathol.* **38**:145-180.
- [8] Aslam, M., Diarra, M. S., Checkley, S., Bohaychuk, V. & Masson, L. (2012) Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Int J Food Microbiol.* **156**:222-230.
- [9] Aymerich, T., Picouet, P. A. & Monfort, J. M. (2008) Decontamination technologies for meat products. *Meat Sci.* **78**:114-129.
- [10] Board, R. G. (1998) *Introducción a la Microbiología Moderna de los Alimentos*. Editorial Acribia, España. Pp. 23, 24, 35, 36.
- [11] Breuil, C., Novitsky, T. J. & Kushner, D. J. (1975) Characteristics of a facultatively psychrophilic *Acinetobacter* species isolated from river sediments. *Can J Microbiol.* **21**(12):2103-2108.
- [12] Brightwell, G., Boerema, J., Mills, J., Mowat, E. & Pulford, D. (2006) Identifying the bacterial community on the surface of Intralox belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. *Int J Food Microbiol.* **109**(1-2):47-53.
- [13] Brown, B. J. & Leff, L. G. (1999) Comparison of fatty acid methyl ester analysis with the use of API 20E and NFT strips for identification of aquatic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **62**(2):2183-2185.

- 
- [14] Carlez, A., Rosec, J.-P., Richard, N. & Cheftel, J.-C. (1994) Bacterial Growth During Chilled Storage on Pressure-Treated Minced Meat. *Food Sci Technol.* **27**(1):48-54.
- [15] Cerf, O.; Dousset, X. & Brossard. (1994) Destrucción de los microorganismos: Pasteurización y Esterilización Térmica. En: "Microbiología Alimentaria. Vol I. Aspectos Microbiológicos de la Seguridad y Calidad Alimentaria." Eds: Bourgeois, C. M., Mescle, J. F. & Zucca, J. Editorial Acribia, España. Pp. 322, 324, 336, 337, 339-341.
- [16] Chan, J. T. Y., Omana, D. A. & Betti, M. (2011) Application of high pressure processing to improve the functional properties of pale, soft, and exudative (PSE)-like turkey meat. *Inn Food Sci Emerg Technol.* **12**:216-225.
- [17] Cheftel, J. C. (1995) High Pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci. Technol. Int.* **1**:75-90.
- [18] Chiang, Y. C., Tsen, H. Y., Chang, Y. H., Lin, C. K., Chen, C. Y. & Pai., W. Y. (2012) Multiplex PCR and a chromogenic DNA macroarray for the detection of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. and *Pseudomonas fluorescens* in milk and meat samples. *J Microbiol Methods.* **88**(1):110-116.
- [19] Chiu, T. H., Chen, T. R., Hwang, W. Z. & Tsen, H. Y. (2005) Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for detection of *Salmonella* spp. In food. *Int. J. Food. Microbiol.* **97**:259-265.
- [20] Chmielewski, R. A. N. & Frank, J. F. (2003) Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr Rev Food Sci Food Safety.* **2**:22-32.
- [21] Daeschel, M. A. (1989) Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Biotechnol.* **43**(1):164-167.
- [22] Devriese, L. A., Vandamme, P., Collins, M. D., Alvarez, N., Pot, B., Homme, J., Butaye, P. & Haesebrouck, F. (1999) *Streptococcus pluranimalium* sp. nov. From cattle and other animals. *Int J System Bacteriol.* **49**:1221-1226.
- [23] Ellis, D. I. & Goodacre, R. (2006) Quantitative detection and identification methods for microbial spoilage. In: "Food spoilage microorganisms." Eds. Blackburn, C. de W. Woodhead Publishing Limited, England. P. 6
- [24] Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P. & Villani, F. (2006) Changes in the Spoilage-Related Microbiota of Beef during Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(7):4663-4671.
- [25] Escamilla, M. V. (2006) Evaluación Instrumental de color en alimentos mexicanos tradicionales y de alto consumo. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México, D. F.
- [26] Escriu, R. & Mor-Mur, M. (2009) Role of quantity and quality of fat in meat models inoculated with *Listeria innocua* or *Salmonella* Typhimurium treated by high pressure and refrigerated stored. *Food Microbiol.* **26**:834-840.

- 
- [27] Espinosa-Asuar, L. (2007) Las herramientas moleculares. Guía práctica sobre las técnicas de PCR. En: Ecología Molecular. Eds. Eguiarte, L., Souza, V. & Aguirre, X. Instituto de Ecología, UNAM. México. Pp. 517-539.
- [28] Esquivel, A. (2011) Determinación de los cambios que ocurren en las comunidades bacterianas durante la congelación de carne fresca. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de química. México, D. F.
- [29] Estrada, G. T., López, S. C., Zamarripa, A. B., Thompson, M. R., Gutiérrez, C. L., Mancera, M. A. & Escobar, G. A. (2004) Prevalence of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in street-vended food open markets (tianguis) and general hygienic and trading practices in Mexico City. *Epidemiol Infect.* **132**:1181-1184.
- [30] Farber, J. M. & Peterkin, P. I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* **55**:476-511.
- [31] Farkas, J. (2001) Métodos de conservación y conservantes: Métodos físicos. In: "Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras." Eds. Doyle, M. P.; Beuchant, L. R. & Montville, T. J. Editorial Acribia, España. Pp. 519, 522-526, 530-537.
- [32] Fonberg-Broczek, M., Windyga, B., Szczawinski, K., Szczawinska, M., Pietrzak, D. & Prestamo, G. (2005) High pressure processing for food safety. *A. Bioch. Pol.* **52**(3):721-724.
- [33] Francis, C. A., Obratsova, A. Y. & Tebbo, B. M. (2000) Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SPI. *Appl Environ Microbiol.* **66**(2): 543-548.
- [34] Franz, C. M. A. P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W. & Gálvez, A. (2010) Enterococci as probiotics and their implication in food safety. *Int J Food Microbiol.* **151**:125-140.
- [35] Frazier, W. C. & Westhoff, D. C. (1993) Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia, España. Pp. 217, 218, 222, 299, 300, 301.
- [36] Gavini, F., Mergaert, J., Benji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K. & De Ley, J. (1989) Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1988) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* **39**(3):337-345.
- [37] Giancoli, D. C. (1997) Física, Principios con Aplicaciones. 4° ed. Prentice Hall, México. Pp. 260, 297, 480, 481, 563.
- [38] Grèbol, N. E. (2004) Aplicaciones de las Altas Presiones. Resúmenes del XIV Congreso de Microbiología de los Alimentos, Girona, España. IRTA-Control de Tecnología de la Carne.
- [39] Grimont, P. A. D. & Grimont, F. (2005) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology : Volume Two : The Proteobacteria, Part B-The Gammaproteobacteria. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Springer.



- 
- [40] Gross, V., Carlson, G., Kwan, A. T., Smejkal, G., Freeman, E., Evanov, A. R. (2008a) Tissue fractionation by hydrostatic pressure cycling technology: the unified sample preparation technique for systems biology studies. *J Biomol Tech.* **19**:189-199.
- [41] Gross, V., Lazarev, A., Lawrence, N., Schumacher, R. (2008b) Isolation of mitochondria from cell cultures by PTC for proteomic analysis. *Biotechniques.* **45**:99-100.
- [42] Guardabassi, L., Dalsgaard, A. & Olsen, J. E. (1999) Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. *J Appl Microbiol.* **87**(5):659-667.
- [43] Hammerum, A. M. (2012) Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin Microbiol Infect.* **18**:619-625.
- [44] Heinz, V., Knoch, A. & Lickert, T. (2009) Product innovation by high pressure processing. *New Food.* **2**:43-47.
- [45] Herrero, A. M. & Romero de Avila, M. D. (2006) Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Rev. Med. Univ. Navarra.* **50**(4):71-74.
- [46] Hickman-Brenner, F. W., Huntley-Carter, G. P., Saitoh, Y., Steigerwalt, A. G., Farmer, J. J. III & Brenner Don, J. (1984) *Moellerella wisconsensis*, a new Genus and Species of Enterobacteriaceae found in human stool specimens. *J Clin Microbiol.* **19**:460-463.
- [47] Hicks, D. T., Pivarnik, L. F., McDermott, R., Richard, N., Hoover, D. G. & Kniel, K. (2009) Consumer Awareness and Willingness to Pay for High-Pressure Processing of Ready-to-Eat Food. *Food Science Education Research.* **8**(2):32-38.
- [48] Hugas, M., Garriga, M. & Monfort, J. M. (2002) New mild Technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Sci.* **62**:359-371.
- [49] HunterLab (2008a) CIE L\*a\*b\* Color Scale. Applications notes, Insight on Color. **8**(7):1-4. Formato electrónico: [http://www.hunterlab.com/appnotes/an07\\_96a.pdf](http://www.hunterlab.com/appnotes/an07_96a.pdf) (12 mayo, 2013).
- [50] HunterLab (2008b) CIE Standard Observer. Applications notes, Insight on Color. **19**(10):1-3. Formato electrónico: [http://www.hunterlab.com/appnotes/an10\\_07.pdf](http://www.hunterlab.com/appnotes/an10_07.pdf) (12 mayo, 2013).
- [51] HunterLab (2001) Principios Básicos de Medida y Percepción de Color (Basics of Color Perception and Measurement). In: Color Theory, recurso electrónico: <http://www.hunterlab.com/ColorEducation/ColorTheory>  
Formato electrónico: <http://www.hunterlab.com/pdf/color-s.pdf> (12 mayo, 2013).
- [52] Holmes, B., Owen, R. J., Evans, A., Malnick, H. & Willcox, W. R. (1977) *Pseudomonas paucimobilis*, a New Species Isolated from Human Clinical Specimens, the Hospital Environment, and Other Sources. *Int J System Bacteriol.* **27**(2):133-146.
- [53] Ingram, M. & Roberts, T. A. (1980) Radiación Ultravioleta y Radiación Ionizante. In: "Ecología Microbiana de los Alimentos. Vol I. Factores que afectan a la supervivencia

- 
- de los microorganismos en los alimentos.” Coord. Ed. Elliott, R. P. Editorial Acribia, España. Pp. 39-49, 53,
- [54] Ingram, M. & Simonsen, B. (1980) Meats and Meat Products. In: “Microbial ecology of food. Vol. II Food Commodities”. Coord. Ed. Elliott, R. P. Academic Press, USA. Pp. 340-349.
- [55] Jackson, T. C., Acuff, G. R. & Dickson, J. S. (2001) Carne de mamíferos, aves y pescado. In: “Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras.” Eds. Doyle, M. P.; Beuchant, L. R. & Montville, T. J. Editorial Acribia, España. Pp. 87, 88, 91, 92, 99, 100.
- [56] Jeyaletchumi, P., Margaret, S. P., Son, R., Ghazali, F. M., Cheah, Y. K., Nishibuchi, Y. & Malakar, P. K. (2010) Quantification of *Listeria monocytogenes* in salad vegetables by MPN-PCR. *Int Food Res J.* **17**:281-286.
- [57] Jofré, A., Aymerich, T., Bover-Cid, S. & Garriga M. (2010) Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic pressure treatments up to 900 MPa. *Intern. Microbiol.* **13**:105-112.
- [58] Johnston, R. W. & Tompkin, R. B. (1992) Meat and poultry products. In: “Compendium of methods for the Microbiological examination of food.” 3rd ed. Eds: Vanderzant, C. & Splittstoesser, D. F. American Public Health Association, USA. Pp. 821-823.
- [59] Join-Lambert, O. F., Ezine, S., Le Monnier, A., Jaubert, F., Okabe, M., Berche, P. & Kayal, S. (2005) *Listeria monocytogenes*-infected bone marrow myeloid cells promote bacterial invasion of central nervous system. *Cell. Microbiol.* **7**(2):167-180.
- [60] Jung, S., Ghoul, M. & de Lamballerie-Anton, M. (2003) Influence of high pressure on the color and microbial quality of beef meat. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **36**:625-631.
- [61] Kerr, K. G., Birkenhead, D., Seale, K., Major, J. & Hawkey, P. M. (1993) Prevalence of *Listeria* spp. on the hands of food workers. *J Food Prot.* **56**: 525-527.
- [62] Labadie, J. C. & Dousset, X. (1994) Flora alterante de los alimentos. In: “Microbiología Alimentaria. Vol I. Aspectos Microbiológicos de la Seguridad y Calidad Alimentaria.” Eds: Bourgeois, C. M., Mescle, J. F. & Zucca, J. Ed. Acribia, España. P. 157.
- [63] Lawrie, R. A. (1998) Lawrie’s Meat Science. 6th ed. Technomic Publishing Co., INC., UK. P. 59, 143-147, 162-168.
- [64] Le Corre, F. & Venaille, L. (1994) Tratamientos con radiaciones ionizantes. In: “Microbiología Alimentaria. Vol I. Aspectos Microbiológicos de la Seguridad y Calidad Alimentaria.” Eds: Bourgeois, C. M., Mescle, J. F. & Zucca, J. Editorial Acribia, España. Pp. 357, 359, 360, 364, 365.
- [65] Leys, N. M. E. J., Ryngaer, A., Bastiens, L., Verstraete, W., Top, E. M. & Springael, D. (2003) Occurrence and Phylogenetic Diversity of *Sphingomonas* Strains in Soil Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol.* **70**(4): 1944-1955.

- 
- [66] Li, M. Y., Zhou, G. H., Xu, X. L., Li, C. B. & Zhu, W. Y. (2006) Changes of bacterial diversity and main flora on chilled pork during storage using PCR-DGGE. *Food Microbiol.* **23**:607-611.
- [67] Lindow, S. E. & Brandl, M. T. (2003) Microbial of the Phyllosphere. *Appl Environ Microbiol.* **69**:1875-1883.
- [68] López-Alfonso, R.; Torres-Zapata, T. & Antolin-Giraldo, G. (2004) Tecnología de Envasado y Conservación de Alimentos. Laboratorio de Procesos Químicos de CARTIF. Boletín Informativo, Universidad de San Martín de Porres. **49**  
Formato electrónico:  
<http://www.usmp.edu.pe/publicaciones/boletin/fia/info49/articulos/Envasado%20y%20Conservacion%20de%20Alimentos%20%281%29.pdf> (30 mayo, 2011)
- [69] Ma, E. S. K., Wong, C. L. P., Lai, K. T. W., Chan, E. C. H., Yam, W. C. & Chan, A. C. W. (2005) *Kokuria kristinae* infection associated with acute cholecystitis. *BCM Infect Dis.* **5**:60-64.
- [70] Masson, P., Tonello, C. & Balny, C. (2001) High-pressure biotechnology in medicine and pharmaceutical science. *J Biomed Biotech.* **1**(2):85-88.
- [71] Mellor, G. E., Bentley, J. A. & Dykes, G. A. (2010) Evidence for a role of biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* in the spoilage of fresh aerobically stored chicken meat. *Food Microbiol.* **28**(5):1101-1104.
- [72] Montier, J.-M. & Lindow, S. E. (2005) Aggregates of resident bacteria facilitate survival of immigrant bacteria on leaf surfaces. *Microb Ecol.* **49**:343-352.
- [73] Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S. & Maniatis, T. (1985) Nearly all single base substitution in DNA fragments joined to GC-clam can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucl Acids Rev.* **13**:3131-3145.
- [74] Nel, S., Lues, J. F. R., Buys, E. M. & Venter, P. (2004) Bacterial population associated with meat from the deboninf room of a high throughput red meat abattoir. *Meat Sci.* **66**:667-674.
- [75] Norrung, B. & Buncic, S. (2008) Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Sci.* **78**:14-24.
- [76] Nychas, G.-J. E. & Drosinos, E. H. (1999) Spoilage of Meat. In: "Enciclopedia of Food Microbiology. Vol. II." Eds: Robinson, R. K., Batt, A. & Patel, P. H. Academic Press, UK. Pp. 1253-1256, 1260.
- [77] Ohanessian, J. H., Fourcade, N., Priolet, B., Richard, C., Bashour, G. & Dugelay, M. (1987) A propos d'une infection vésiculaire par *Moellerella wisconsensis*. *Méd Mal Infect.* **7**:414-416
- [78] O'Hara, C. M. (2006) Evaluation of Phoenix 100 ID/AST system and NID for identification of *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* and commonly isolated nonenteric Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* **44**:928-933.

- 
- [79] O'Hara, C. M. & Miller, J. M. (2003) Evaluation of the and comparison with the Vitek 2 ID-GNB assay for identification of members of the family *Enterobacteriaceae* and other nonenteric Gram-negative bacilli and comparison with the Vitek GNI+card. *J Clin Microbiol.* **41**:2096-2101.
- [80] Olson, J. C. & Nottingham, P.M. (1980) Temperatura. In: "Ecología Microbiana de los Alimentos. Vol I. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos." Coord. Ed. Elliott, R. P. Editorial Acribia, España. Pp 5-10, 13, 15, 17, 27, 28, 33, 34.
- [81] Padilla, R. A. L. (2010) Estudio de la Relación de las Características Sensoriales y de Color en Cortes de Bovino de Alto Precio y Alto Consumo. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México, D. F.
- [82] Park, Y. S., Lee, S. R. & Kim, Y. G. (2006) Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Kimchi by Multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR). *J. Microbiol.* **44**(1):92-97.
- [83] Penna, V. T., Martins, S. A. & Mazzola, P. G. (2002) Identification of bacteria in drinking and purified water during the monitoring of a typical water purification system. *BMC Public Health.* **15**:2-13.
- [84] Pennacchia, C., Ercolini, D. & Villani, F. (2011) Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiol.* **28**:84-93.
- [85] Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E. & Cartagena-Gracia, R. (1998) Caracterización de los parámetros de color de diferentes materias primas usadas en la industria cárnica. *Eurocarne.* **63**:115-122.
- [86] Picouet, P., Pérez-Juan, M. & Realini, C. E. (2008) High Hydrostatic Pressure technology on fresh beef and beef products. *Recerca I Tecnologia Agroalimentaries.* España. Formato electrónico: <http://prosafebeef.eu/> (30 mayo, 2011).
- [87] Raventós, M. (2005) Industria Alimentaria. Tecnologías Emergentes. Ediciones UPC, España. Pp. 25, 26, 77, 78.
- [88] Ray, A. N., Dikeman, M. E., Crow, B. A., Phebus, R. K., Grobbel, J. P. & Hollis, L. C. (2010) Microbial translocation of needle-free versus traditional needle injection-enhanced . *Meat Sci.* **84**(1):208-211.
- [89] Rezzonico, F., Smits, T. H. M., Montesinos, E., Frey, J. E. & Duffy, B. (2009) Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC Microbiol.* **9**: 204-222.
- [90] Ritz, M, Rilet, M. F., Jugiau, F., Rama, F. & Federighi, M. (2006) Inactivation of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* using high-pressure treatments: destruction or sublethal stress? *Lett. Appl. Microbiol.* **42**:357-362.
- [91] Rivalain, N., Roquain, J. & Demazeau, G. (2010) Development of high hydrostatic pressure in biosciences : Pressure effect on biological structures and potencial applications in Biotechnologies. *Biotech Adv* **28**(6):659-672.

- 
- [92] Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K. & Rasmussen, O. F. (1992) Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* **17**:37-45.
- [93] Rosset, R. (1994) Flora alterante de los alimentos: Otras carnes y productos cárnicos. In: "Microbiología Alimentaria. Vol I. Aspectos Microbiológicos de la Seguridad y Calidad Alimentaria." Eds: Bourgeois, C. M., Mescle, J. F. & Zucca, J. Editorial Acribia, España. Pp. 250-260.
- [94] Rossi, M. L., Paiva, A., Tornese, M., Chianelli, S. & Troncoso, A. (2008) Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. *Infectología al día*, U. de Buenos Aires. **25**(5):328-335.
- [95] Rubio, M. S., Martínez, J. F., Hernández, Bonilla, C., Méndez, R. D., Núñez, J. F., Echeverry, A. & Brashears, M. M. (2013) Detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* en carne de res en puntos de venta en México. *Rev Mex Cienc Pecu.* **4**(1):107-115.
- [96] Sanchez-Basurto, B. E., Ramírez-Gilly, M., Tecante, A. & Severiano-Peres, P. (2012) Effect of High Hydrostatic Pressure Treatment on the Preservation of Beef Meat. *Ind Eng Chem Res.* **51**:5932-5938.
- [97] Sandfort, R. F., Murray, W. & Janda, J. M. (2002) *Moellerella wisconsensis* isolated from the oral cavity of wild raccon (*Procyon lotor*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2**:197-199.
- [98] Sangronis, E.; Pothakamury, U.; Ramos, A. M.; Ibarz, A. & Barbosa, G. V. (1997) La alta presión hidrostática: Una alternativa en el procesamiento no térmico de los alimentos. *Alimentos.* **33**:32-43.
- [99] Sanz, C. (1976) Enciclopedia de la carne. 2° ed. Espasa-Cape, España. Pp. 424.428.
- [100] Savini, V., Catavitello, C., Masciarelli, G., Astolfi, D., Balbinot, A. & Bianco, A. (2010) Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*. *J Med Microbiol.* **59**:1395-402.
- [101] Seo, Y. C., Choi, W. Y., Kim, J. S., Yoon, C. S., Lim, H. W., Cho, J. S., Ahn, J.-h. & Lee, H. Y. (2011) Effect of ultra high pressure processing on immuno-modulatory activities of the fruits of *Rubus coreanus* Miquel. *Inn Food Sci Emerg Technol.* **12**: 207-215.
- [102] Shale, K., Lues, J. F. R., Venter, P. & Buys, E. M. (2005) The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. *Food Microbiol.* **22**: 433-438.
- [103] Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S. & Myers, R. M. (1989) Attachment of a 40-base pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Sci USA.* **86**:232-236.
- [104] Shigehisa, T., Ohmori, T., Saito, A., Taji, S. & Hayashi, R. (1991) Effects of High Hydrostatic Pressure on Characteristics of pork slurries and inactivation of

---

microorganisms associated with meat and meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **12**:207-216.

- [105] Sierra, M., González, M. E., García, M. C., García, M. L. & Moreno, B. (1995) Numerical Taxonomy of an 'atypical' population of Gram-positive cocci isolated from freshly dressed lamb carcasses. *Int J Food Microbiol.* **24**:263-273.
- [106] Smelt, J. P. P. M. (1998) Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *T. Food Sci. & Technol.* **9**:152-158.
- [107] Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O. & Schumann, P. (1995) Taxonomic Dissection of the Genus *Micrococcus*: *Kokuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int J System Bacteriol.* **45**(4):682-692.
- [108] Stock, I., Falsen, E. & Wiedemann, B. (2003) *Moellerella wisconsensis*: identification, natural antibiotic susceptibility and its dependency of the medium applied. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **45**:1-11.
- [109] Streinkraus, K. H. (1983) Lactic acid fermentation in the production of food from vegetables, cereals and legumes. *Antonie van Leeuwenhoek.* **49**:337-348.
- [110] Sun, X. D. & Holley, R. A. (2010) High Hydrostatic Pressure Effects on the Texture of Meat and Meat Products. *J. Food Sci.* **75**(1):17-23.
- [111] Tao, F., Shumacher, R. T., Lawrence, N. P., Gross, V., Smejkal, G., Lazarev, A. (2009) Pressure Biosciences Inc. Extraction of biomolecular complexes assisted by alternating hydrostatic pressure. United State Patent US 2009/0286301. <http://www.freepatentsonline.com/y2009/0286301.html> (13 mayo, 2013).
- [112] Téllez-Luis, S. J.; Ramírez, J. A.; Pérez-Lamela, C.; Vázquez, M. & Simal-Gándara, J. (2001) Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **3**(2):66-80.
- [113] Tortora, G. J.; Funke, B. R. & Case, C. L. (2004) *Microbiology, an Introduction*. 8<sup>th</sup> ed. Pearson Education, USA. Pp. 156, 157.
- [114] Tuboly, K. (2009) Effect of the Use of High Hydrostatic Pressure Technology on the Microbiology and other Quality Parameters of some selected foodstuff. PhD Thesis. Corvinus University of Budapest, Faculty of Food Science. Hungría, Budapest.
- [115] USDA. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. (2004) Requisite Scientific Parameters for Establishing the Equivalence of Alternative Methods of Pasteurization. Formato electrónico: [www.fsis.usda.gov/ophs/nacmcf/2004NACMCF-Pasteurization\\_082704.pdf](http://www.fsis.usda.gov/ophs/nacmcf/2004NACMCF-Pasteurization_082704.pdf) (4 mayo, 2013)
- [116] USDA. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. (2006) Requisite Scientific Parameters for Establishing the Equivalence of Alternative Methods of Pasteurization. *J Food Prot.* **69**(5):1190–1216.

- 
- [117] Varnam, A. H. & Sutherland, J. P. (1995) Meat and Meat Products. Technology, Chemistry and Microbiology. Chapman & Hall, Great Britain. Pp. 10, 11, 49, 50, 64, 75, 94, 97, 99, 104, 114, 167-171, 194, 195.
- [118] Warriss, P. D. (2003) Ciencia de la Carne. Editorial Acribia, España. Pp. 193-197, 199, 204, 205.
- [119] White, D. C., Sutton, S. D. & Ringelberg, D. B. (1996) The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. *Environ Biotech.* **7**:301-306
- [120] Wittke, J. W., Aleksic, S. & Wuthe, H. H. (1985) Isolation of *Moellerella wisconsensis* from an infected human gallbladder. *Eur J Clin Microbiol.* **3**:351-532.

## Anexo

### Análisis estadístico

ANOVA, utilizando el programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS 10.0 para Windows)

**Tabla 30. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la disminución de unidades logarítmicas de *Salmonella* Typhimurium considerando las dos variables implicadas: Presión (172 MPa y 345 MPa) y concentración (alta  $\alpha$  y baja  $\beta$ )**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tratamiento	0.99	3	0.33	4.18	8.59	26.41	NS
Presión	0.34	1	0.34	4.30	251.10	6 286.8	NS
Concentración	0.12	1	0.12	1.47	251.10	6 286.8	NS
Tratamiento * Presión	0.55	3	0.18	2.31	8.59	26.41	NS
Tratamiento * Concentración	0.69	3	0.23	2.90	8.59	26.41	NS
Presión * Concentración	0.03	1	0.03	0.35	251.10	6 286.8	NS
Tratamiento * Presión * Concentración	0.04	3	1.47	0.19	8.59	26.41	NS
Error	2.53	32	0.08				
Total	17.93	48					

NS No hay diferencia significativa ( $P>0.05$ )

No existe suficiente evidencia que sugiera diferencia estadísticamente significativa para determinar si el tratamiento con 345 MPa resulta más eficaz con respecto a 172 MPa para disminuir las cuentas de *S. Typhimurium* ( $P>0.05$ ). Igualmente, no hay evidencia suficiente que sugiera interacción entre las variables utilizadas. Para un mejor análisis se requiere ampliar el número de repeticiones.

**Tabla 31. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la disminución de unidades logarítmicas considerando las tres variables implicadas: Tratamiento (R, VR, VPF, VPR), microorganismo (*S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*) y concentración (alta  $\alpha$  y baja  $\beta$ )**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tratamiento	1.13	3	0.38	9.04	2.90	4.46	**
Microorganismo	2.80	1	2.80	67.48	4.15	7.50	**
Concentración	0.03	1	0.03	0.72	4.15	7.50	NS
Tratamiento*Microorganismo	0.47	3	0.16	3.77	2.90	4.46	*
Tratamiento*Concentración	0.33	3	0.11	2.63	2.90	4.46	NS
Microorganismo*Concentración	0.00	1	0.00	0.00	4.15	7.50	NS
Tratamiento*Microorganismo*Concentración	0.10	3	0.03	0.81	2.90	4.46	NS
Error	1.33	32	0.04				
Total	12.26	48					

\*Diferencia significativa ( $P<0.05$ )

\*\*Diferencia altamente significativa ( $P<0.01$ )

NS No hay diferencia significativa ( $P>0.05$ )



La evidencia indica que hay diferencia altamente significativa en el análisis de varianza en la variable Tratamiento y en la variable Microorganismo, así mismo, se aprecia diferencia significativa que indica interacción entre ambos factores (tratamiento\*microorganismo), por lo que se realizó la prueba de Duncan para identificar el Tratamiento y el Microorganismo donde se obtuvo una mayor disminución de unidades logarítmicas de UFC del patógeno por gramo de carne ( $\log \text{UFC g}^{-1}$ ).

**Tabla 32. Prueba de Duncan para la comparación del efecto de los diferentes tratamientos (R, VR, VPF, VPR, presión de 345 MPa) en la disminución de las cuentas de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes***

Tratamiento*Microorganismo	Clasificación con el paquete SPSS			Interpretación
	1	2	3	
R, <i>Listeria</i>	0.02			$0.02 \pm 0.10^a$
VPR, <i>Listeria</i>	0.14			$0.14 \pm 0.08^a$
VR, <i>Listeria</i>	0.15			$0.15 \pm 0.16^a$
VPF, <i>Listeria</i>	0.17			$0.17 \pm 0.06^a$
R, <i>Salmonella</i>	0.22			$0.22 \pm 0.25^b$
VR, <i>Salmonella</i>		0.57		$0.57 \pm 0.32^b$
VPF, <i>Salmonella</i>		0.69	0.69	$0.69 \pm 0.21^{bc}$
VPR, <i>Salmonella</i>			0.91	$0.91 \pm 0.32^c$

abc Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre Tratamiento\*Microorganismo. R Refrigeración, VR Vacío y Refrigeración, VPF Vacío y Presión de carne fresca, VPR Vacío, Presión y Refrigeración.

El paquete reportó 3 grupos. Para su identificación se asignó una letra diferente a cada grupo. Para identificar el tratamiento y la bacteria patógena con que se obtuvo la mayor disminución de unidades  $\log \text{UFC g}^{-1}$  se consideró el Tratamiento\*Microorganismo donde termina el último grupo, el cual corresponde a la letra c. Así se concluyó que el la mejor inactivación se alcanzó con *Salmonella Typhimurium* al recibir el tratamiento VPR (empacado al Vacío, Presurizado y Refrigerado 5 días a 4° C). También se aprecia que *S. Typhimurium* resulta más lábil a los tratamientos con respecto a *L. monocytogenes*. De hecho, resulta posible que el efecto conseguido con VPR sea el efecto en conjunto de los procesos involucrados en la preservación con PHUA.

Igualmente, se aprecia que no hay diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos evaluados para disminuir las cuentas de *L. monocytogenes*.

**Tabla 33. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la disminución de unidades logarítmicas considerando las dos variables implicadas: Tratamiento (R, VR, VPF, VPR) y grupo microbiano (Mesófilos, Psicrótrofos, BAL, Enterobacterias, *Pseudomonas* sp.)**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tratamiento	43.99	3	14.66	23.97	2.83	4.31	**
Microorganismo	19.95	4	4.99	8.15	2.62	3.83	**
Tratamiento*Microorganismo	12.07	12	1.01	1.64	2.00	2.66	NS
Error	24.47	40	0.61				
Total	104.88	60					

\*Diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

\*\*Diferencia altamente significativa ( $P < 0.01$ )

NS No hay diferencia significativa ( $P > 0.05$ )

R Refrigeración, VR Vacío y Refrigeración, VPF Vacío y Presión de carne fresca, VPR Vacío, Presión y Refrigeración.

La evidencia indica que hay diferencia altamente significativa en el análisis de varianza en las variables Tratamiento y Microorganismo (grupo microbiano), sin embargo, no hay diferencia significativa que indique interacción entre ambos factores (Tratamiento\*Microorganismo). Por ello se realizaron las pruebas de rangos múltiples (la prueba de Duncan) para determinar el Tratamiento con el que se obtuvo la mayor disminución de unidades log UFC  $g^{-1}$ , así como la correspondiente para determinar el grupo microbiano más afectado (con mayor disminución en las cuentas) por efecto de los tratamientos.

**Tabla 34. Prueba de Duncan para la comparación del efecto de los Tratamientos (R, VR, VPF, VPR) en la disminución de unidades logarítmicas de bacterias (UFC  $g^{-1}$ )**

Clasificación con el paquete SPSS				Interpretación
Tratamiento	Grupo			
	1	2	3	
R	-0.88			$-0.88 \pm 1.02^a$
VR		-0.20		$-0.20 \pm 0.84^b$
VPR			0.91	$0.91 \pm 1.17^c$
VPF			1.25	$1.25 \pm 0.96^c$

<sup>abc</sup> Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre Tratamientos.

R Refrigeración, VR Vacío y Refrigeración, VPF Vacío y Presión de carne fresca, VPR Vacío, Presión y Refrigeración.

El paquete reportó 3 grupos. Para su identificación se asignó una letra diferente a cada grupo. Para identificar el tratamiento con el cual se obtuvo la mayor disminución de unidades log UFC  $g^{-1}$  se consideró el Tratamiento donde termina el último grupo, el cual corresponde a la letra c. Así se concluyó que la mejor respuesta se obtuvo con VPF (empacar al Vacío y Presurizar sin periodo de almacenamiento y/o refrigeración). Igualmente, VPR (carne empacada al Vacío, Presurizada y Refrigerar 5 días a 4° C)

muestra buenos resultados (ya que no hay diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) con respecto a VPR). Por lo que la presión disminuye la carga microbiana inicial de forma importante, por lo cual, durante el periodo de refrigeración ésta se mantiene por debajo de los valores alcanzados en muestras sin presurizar.

**Tabla 35. Prueba de Duncan para la comparación del efecto en la disminución de unidades logarítmicas de bacterias (UFC  $g^{-1}$ ; Mesófilos, Psicrótrofos, BAL, Enterobacterias, *Pseudomonas* sp.)**

Clasificación con el paquete SPSS					Interpretación
Grupo microbiano	Grupo				
	1	2	3	4	
BAL	-0.60				$-0.60 \pm 0.96^a$
Psicrótrofos	0.002	0.002			$0.002 \pm 1.29^{ab}$
Mesófilos		0.16	0.16		$0.16 \pm 0.65^{bc}$
Enterobacterias			0.76	0.76	$0.76 \pm 1.57^{cd}$
<i>Pseudomonas</i> spp.				1.03	$1.03 \pm 1.36^d$

<sup>abcd</sup> Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos microbianos. BAL Bacterias ácido lácticas

El paquete reportó 4 grupos. Para su identificación se asignó una letra diferente a cada grupo registrado. Así, para identificar el grupo microbiano que resultó más afectado por los tratamientos, considerando la disminución de unidades log UFC  $g^{-1}$ , se consideró aquel donde termina el último grupo, el cual corresponde a la letra d. De tal manera que se concluyó que se corresponde con el grupo de *Pseudomonas* spp., y en cierta medida las Enterobacterias, mostraron el mayor efecto en la disminución de las cuentas microbianas.

Las BAL son las que mostraron ser más resistentes al procesamiento global (empacado al Vacío, Presurización y Refrigeración).

**Tabla 36. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el cambio total del color ( $\Delta E^*$ ) considerando la variable Tratamiento (R, VR, VPF, VPR)**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tratamiento	138.936	3	46.312	11.025	8.62	26.51	*
Repetición	51.535	10	5.153	1.227	2.70	4.25	NS
Error	126.023	30	4.201				
Total	2794.495	44					

\*Diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

NS No hay diferencia significativa ( $P > 0.05$ )

R Refrigeración, VR Vacío y Refrigeración, VPF Vacío y Presión de carne fresca, VPR Vacío, Presión y Refrigeración.

Los resultados indican que hay diferencia significativa en el análisis de varianza del cambio total del color por efecto de los diferentes tratamientos, sin que haya diferencia significativa

entre repeticiones. Se llevó a cabo la prueba de rango múltiple (de Duncan) para identificar el Tratamiento que generó el mayor cambio total del color (valor que considera la modificación de los parámetros CIE L\*a\*b\* en conjunto, tomando como valor de referencia la carne fresca).

**Tabla 37. Prueba de Duncan para la comparación del cambio total del color ( $\Delta E^*$ ) por efecto de los tratamientos evaluados**

Clasificación con el paquete SPSS			Interpretación
Tratamiento	Grupo		
	1	2	
VR	5.6309		5.63 $\pm$ 2.07 <sup>a</sup>
R	5.9555		5.95 $\pm$ 2.09 <sup>a</sup>
VPR		8.5591	8.55 $\pm$ 1.79 <sup>b</sup>
VPF		9.8727	9.87 $\pm$ 2.41 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas del color entre Tratamientos. R Refrigeración, VR Vacío y Refrigeración, VPF Vacío y Presión de carne fresca, VPR Vacío, Presión y Refrigeración.

El paquete reportó 2 grupos. Para su identificación se asignó una letra diferente a cada grupo y para identificar el tratamiento que dio lugar a un mayor cambio total del color se consideró el Tratamiento donde termina el último grupo, el cual corresponde a la letra b. Así se concluyó que el mayor efecto en la modificación global del color se dio con VPF al igual que con VPR.

**Tabla 38. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la modificación del pH considerando la variable Tratamiento (R, VR, VPF, VPR)**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tratamiento	0.02	4	0.006	1.024	5.91	14.37	NS
Repetición	0.85	3	0.282	48.213	8.74	27.05	NS
Error	0.07	12	0.006				
Total	580.79	20					

NS No hay diferencia significativa ( $P > 0.05$ )

R Refrigeración, VR Vacío y Refrigeración, VPF Vacío y Presión de carne fresca, VPR Vacío, Presión y Refrigeración.

Los resultados indican que no hay diferencia significativa en el análisis de varianza del cambio total del pH por efecto de los diferentes tratamientos.