

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos



**ACTIVIDAD AMINOPETIDÁSICA LIGADA A
MEMBRANA DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS:
PRUEBA DE LA P-NITROANILINA PARA LA
ESTIMACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE CARNE
PICADA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Luis Ángel López Tomás

Bajo la dirección de los Doctores:

Juan Antonio Ordóñez Pereda
Gonzalo García de Fernando Minguillón

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2684-4

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



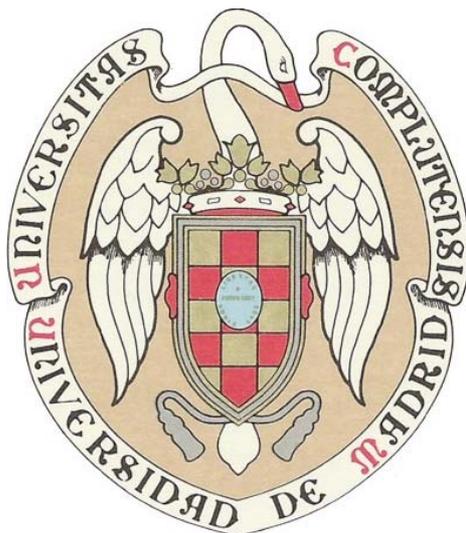
**ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA LIGADA A
MEMBRANA DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.
PRUEBA DE LA P-NITROANILINA PARA LA
ESTIMACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA
DE CARNE PICADA.**

TESIS DOCTORAL

LUIS ANGEL LOPEZ TOMAS

MADRID, 2003

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



**ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA LIGADA A
MEMBRANA DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.
PRUEBA DE LA P-NITROANILINA PARA LA
ESTIMACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA
DE CARNE PICADA.**

Memoria presentada por
Luis Ángel López Tomás
para optar al grado de Doctor
Madrid, noviembre de 2003

*“ Nunca la bandera arriada,
nunca la última empresa ”*

Sir Ernest Shackleton

*A Mayte,
que siempre apoya cualquier
proyecto en el que me embarco.*

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

A los Coroneles Veterinarios D. Rafael Montero Castillo y D. José Tormo Iguacel (†) que impulsaron inicialmente la colaboración entre el entonces denominado Departamento de Nutrición y Bromatología III de la Facultad de Veterinaria y el Centro Militar de Veterinaria, haciendo posible la realización de este trabajo.

A la Dirección del Centro Militar de Veterinaria desde 1993 hasta la fecha, con un especial recuerdo al Coronel Veterinario D. Eduardo Mateos Martínez (†), por su favorable acogida y la facilitación del uso de materiales y equipos.

A los Drs. D. Gonzalo García de Fernando Minguillón y D. Juan Antonio Ordóñez Pereda por su dedicación y apoyo en la dirección y realización de este trabajo, y especialmente, por su buena disposición y paciencia ante las inevitables interrupciones que se han producido al compatibilizarlo con el quehacer diario y alguna que otra misión especial.

A la Dra. Dña. Carmen Pin Arias por su ayuda en el enfoque y tratamiento estadístico de los resultados.

A la Dra. Dña. Manuela Fernández Álvarez por su ayuda en la recopilación de documentación.

A todo el personal de la hemeroteca de la Facultad de Veterinaria, especialmente a Dña. Mar Sanz Luengo, por su profesionalidad, interés e inestimable ayuda, que ha hecho posible la recopilación de una gran cantidad de documentación.

A Dña. Pilar Cuellar Rodríguez por su ayuda en la preparación de innumerables medios de cultivo y placas de Petri.

A todos mis compañeros del Centro Militar de Veterinaria, especialmente a los del Servicio de Bromatología e Higiene de los Alimentos por su estímulo y disposición.

A mi familia, en especial a mi esposa Mayte y a mi hija Lidia, cuyo estímulo ha sido decisivo para superar las dificultades de este trabajo y que han permitido que les quitase parte del tiempo que les correspondía

Finalmente, agradecer la labor de muchas personas que desde el anonimato, han colaborado de un modo u otro en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

1. <u>INTRODUCCIÓN.</u>	1
1.1. ALTERACIÓN DE LA CARNE.	2
1.1.1. MICROORGANISMOS RESPONSABLES DE LA ALTERACIÓN DE LA CARNE EN REFRIGERACIÓN.	4
1.1.1.a. <i>Pseudomonas</i> .	5
1.1.1.b. <i>Acinetobacter / Moraxella</i> .	8
1.1.1.c. <i>Alcaligenes</i> .	9
1.1.1.d. <i>Shewanella putrefaciens</i> .	10
1.1.1.e. <i>Aeromonas</i> .	11
1.1.1.f. <i>Flavobacterium</i> .	11
1.1.1.g. <i>Xanthomonas</i> .	12
1.1.1.h. <i>Enterobacteriaceae</i> .	12
1.1.1.i. <i>Brochotrix thermosphacta</i> .	13
1.1.1.j. Bacterias lácticas.	14
1.1.1.k. <i>Micrococaceae</i> .	16
1.1.1.l. Otros géneros.	17
1.1.2. EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA Y PROCESOS DE ALTERACIÓN.	18
1.1.2.a Alteración de la carne en aerobiosis.	19
1.1.2.b Alteración de la carne en anaerobiosis.	21
1.1.2.c Procesos de adhesión bacteriana a la superficie cárnica.	22
1.1.3. LA CARNE PICADA.	25
1.1.3.a. Carne picada adicionada de proteína de soja	30
1.2. AMINOPEPTIDASAS DE ORIGEN BACTERIANO.	32
1.2.1. NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN.	32
1.2.2. AMINOPEPTIDASAS EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.	32
1.2.3. AMINOPEPTIDASAS EN BACTERIAS GRAM POSITIVAS.	35
1.2.4. LOCALIZACIÓN DE LAS AMINOPEPTIDASAS.	37
1.2.5. APLICACIONES DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA BACTERIANA.	39
1.2.6. SUSTRATOS PARA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA.	39
1.2.7. BIOSÍNTESIS Y REGULACIÓN DE ENZIMAS AMINOPEPTIDÁSICAS.	42
1.3. AMINOPEPTIDASAS DE ORIGEN CÁRNICO	44
1.4. MÉTODOS RÁPIDOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	50
1.4.1 MÉTODOS BASADOS EN LA AUTOMATIZACIÓN DE MÉTODOS CONVENCIONALES.	51

1.4.2	MÉTODOS BASADOS EN FENÓMENOS FÍSICOS.	52
1.4.2.a.	Impedimetría.	52
1.4.2.b.	Microcalorimetría	55
1.4.2.c.	Turbidimetría / Nefelometría	56
1.4.2.d	Radiometría.	57
1.4.2.e	Citometría de flujo.	57
1.4.2.f	Otros métodos basados en fenómenos físicos.	58
1.4.3.	MÉTODOS BASADOS EN MEMBRANAS FILTRANTES.	59
1.4.3.a	Epifluorescencia directa sobre filtro (DEFT).	59
1.4.3.b	Membrana filtrante hidrofóbica cuadrículada (HGMF).	61
1.4.4.	MÉTODOS BASADOS EN LOS ÁCIDOS NUCLEICOS.	62
1.4.4.a	Hibridación.	62
1.4.4.b	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	63
1.4.5.	MÉTODOS BASADOS EN REACCIONES ANTÍGENO-ANTICUERPO.	64
1.4.6.	MÉTODOS BASADOS EN REACCIONES BIOQUÍMICAS Y ENZIMÁTICAS.	65
1.4.6.a	Pruebas miniaturizadas de identificación.	65
1.4.6.b	Medida del ATP /Bioluminiscencia.	66
1.4.6.c	Prueba del Límulus.	68
1.4.6.d	Prueba de la catalasa.	69
1.4.6.e	Prueba de la p-nitroanilina.	70
1.5.	JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS.	71
2.	<u>MATERIAL Y MÉTODOS.</u>	75
2.1.	MATERIAL BIOLÓGICO.	76
2.1.1.	MUESTRAS DE CARNE.	76
2.1.1.a.	Muestras destinadas a ser picadas en el laboratorio.	76
2.1.1.b.	Muestras adquiridas previamente picadas.	77
2.1.2.	ESPECIES BACTERIANAS.	77
2.2.	MATERIAL DE LABORATORIO.	79
2.3.	REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.	82
2.4.	PROCEDIMIENTOS GENERALES.	82
2.4.1.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE CARNE PICADA CON BAJA CARGA BACTERIANA.	82
2.4.2.	RECuento DE MICROORGANISMOS PSICROTROFOS VIABLES.	83
2.4.3.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA A PARTIR DE UNA SUSPENSIÓN ACUOSA MEDIANTE LA PRUEBA DE LA P-NITROANILINA.	85

2.4.4.	CONTROL DE CALIDAD DE LA LECTURA ESPECTROFOTOMÉTRICA.	87
2.5.	PROTOSCOLOS ESPECIFICOS DE TRABAJO.	89
2.5.1	INVESTIGACIÓN, EN PRESENCIA DE CARNE, DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA DE MUESTRAS CON BAJA O NULA CARGA BACTERIANA.	89
2.5.2.	ESTABLECIMIENTO DE LA RELACIÓN ENTRE CARGA BACTERIANA Y ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN.	91
2.5.3.	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE RECUPERACIÓN	93
2.5.4.	EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL LAVADO DEL SEDIMENTO EN LA RECUPERACIÓN Y LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA.	96
2.5.5.	ESTABLECIMIENTO DE LA CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA Y EL RECUENTO DE MICROORGANISMOS PSICROTROFOS VIABLES EN CARNE PICADA CONTAMINADA EXPERIMENTALMENTE.	98
2.5.6.	PROCESADO DE MUESTRAS COMERCIALES DE CARNE PICADA.	99
2.5.7.	INVESTIGACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL pH Y DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO BACTERIANO EN LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA.	99
2.6.	METODOLOGÍA ESTADÍSTICA	101
3.	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	103
3.1.	ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA, EN PRESENCIA DE CARNE, DE MUESTRAS CON BAJA O NULA CARGA BACTERIANA.	104
3.2.	RELACIÓN ENTRE CARGA BACTERIANA Y ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS MEDIANTE CENTRIFUGACION.	109
3.3.	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE RECUPERACIÓN	112
3.4.	INFLUENCIA DEL LAVADO DEL SEDIMENTO EN LA RECUPERACIÓN Y LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA	121
3.5.	CORRELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA Y EL RECUENTO DE MICROORGANISMOS PSICROTROFOS VIABLES EN CARNE PICADA CONTAMINADA EXPERIMENTALMENTE. DIFERENCIAS INTERESPECÍFICAS.	128
3.6.	ESTIMACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA EN MUESTRAS COMERCIALES DE CARNE PICADA.	142
3.7.	INFLUENCIA DEL pH Y DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO BACTERIANO EN LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA.	146
3.7.1.	EVALUACIÓN DEL ÍNDICE DE ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA ESPECÍFICA (AAE) A DIFERENTES VALORES DE pH	148

3.7.2. EVALUACIÓN DEL ÍNDICE DE AAE A DIFERENTES TEMPERATURAS.	151
3.7.3. EVALUACIÓN DEL ÍNDICE DE AAE POR ESPECIES	154
3.8. CARACTERÍSTICAS DE LA PRUEBA DE LA P-NITROANILINA PARA LA ESTIMACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA EN CARNE PICADA CONSERVADA EN AEROBIOSIS Y REFRIGERACIÓN.	157
3.8.1. CORRELACIÓN Y LINEALIDAD	158
3.8.2 . SENSIBILIDAD	158
3.8.3. EXACTITUD Y PRECISIÓN	159
3.8.4. INCERTIDUMBRE DE LA LECTURA ESPECTROFOTOMÉTRICA	162
3.8.5. COMPARACIÓN DE LA PRUEBA DE LA P-NITROANILINA CON OTROS MÉTODOS RÁPIDOS DE ESTIMACIÓN DE CARGA BACTERIANA EN ALIMENTOS.	163
4. <u>CONCLUSIONES</u>	168
5. <u>RESUMEN</u>	171
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	174

1. INTRODUCCIÓN

En esta introducción se han revisado los aspectos fundamentales en los que se basa la presente investigación.

Esta dividida en cuatro apartados principales. En el primero se estudian los aspectos relacionados con la alteración de la carne, los microorganismos en ella implicados y su evolución en diferentes condiciones de almacenamiento, haciendo especial referencia a las particularidades de la carne picada.

En el segundo y tercer apartados se hace una revisión acerca de las aminopeptidasas de origen bacteriano y cárnico, respectivamente. Finalmente, en el cuarto apartado se analizan los principales métodos rápidos, disponibles actualmente, para la detección y cuantificación de microorganismos en alimentos.

1.1. ALTERACIÓN DE LA CARNE

La carne, al igual que otros alimentos frescos de origen animal como la leche o el pescado, es susceptible de una rápida alteración de origen microbiano debido a su elevado contenido en agua, su riqueza en nutrientes y la disponibilidad de los mismos.

El concepto de alteración, *a priori* intuitivamente sencillo, no resulta del todo fácil de establecer, ya que implica algunos aspectos subjetivos (Gill 1986). La alteración no se puede considerar como un concepto absoluto, sino como una condición relativa resultado de muchos cambios en la carne que hacen al producto inaceptable para el consumidor, dependiendo de su agudeza y sensibilidad (Kraft 1992). No obstante, la aparición de malos olores, los cambios de color y la limosidad superficial se pueden considerar signos objetivos de alteración (Ayres 1960, Ingram y Dainty 1971, Gill y Newton 1982). El número de bacterias a partir del cual comienzan a ser evidentes la aparición de estos signos se encuentra en torno a valores iguales o superiores a 3×10^7 ufc/cm² (Shaw 1972).

Las causas de alteración de la carne pueden ser tanto de naturaleza físico-química como microbiológica. Sin restar importancia a otros agentes, la proliferación bacteriana,

por las características químicas y biológicas de la carne, va a ser la causa principal de la alteración. Ésta dependerá del tipo y cantidad de la microbiota contaminante inicial, y por supuesto, de las condiciones de almacenamiento.

Durante años se creyó que los tejidos de los animales sanos contenían una microbiota intrínseca (Reith 1926, Ingram 1972) que explicaba fenómenos tales como el “hueso hediondo”. No obstante, el concepto que prevalece actualmente en los distintos textos (Banwart 1989, Varnam y Sutherland 1995), basados en parte en los trabajos de Gill (1979, 1980), es que la carne de los animales sanos esta, esencialmente, exenta de microorganismos. Algunas experiencias realizadas con cobayas (Gill y Penney 1979) han demostrado que el sistema inmunitario sigue funcionando durante una o más horas después de la muerte del animal y que es capaz de inactivar bacterias que acceden a la carne durante el sacrificio.

Al contrario de lo expuesto anteriormente, las fuentes de contaminación exógena son múltiples y determinantes. Las canales se contaminan durante el sacrificio y el faenado, especialmente en las fases del desollado, evisceración y escaldado (James y James 2002) y, posteriormente, en las operaciones de despique hasta llegar al fileteado o picado.

La piel y las vísceras constituyen los mayores reservorios de microorganismos a partir de los cuales se produce la contaminación inicial (Newton y col. 1978, Stringer y col 1969, Nottingham y col. 1974). El agua de lavado (Newton y col. 1978), así como el utillaje, las superficies de trabajo, el personal manipulador y sus vestimentas (Speirs y col. 1995, Córdoba y col. 1998), o los paramentos de las instalaciones de faenado, constituyen fuentes adicionales que incrementan y conforman la microbiota inicial contaminante de la carne. James y col. (1999) realizaron una revisión sobre las fuentes habituales de contaminación en el matadero, así como las medidas de prevención.

Debido a las múltiples fuentes de contaminación cabe entender que la carne presentará una microbiota inicial heterogénea (Dainty y col. 1983). Szazados (1991) presentó los resultados de un exhaustivo trabajo realizado sobre un total de 39.874 muestras de carne de un matadero húngaro en la ciudad de Pecs, en las que se realizaron

análisis microbiológicos entre los años 1974 y 1989. Los resultados se clasificaron por tipo de animal, tipo de sacrificio (normal o de emergencia), enfermedades aparecidas y bacterias detectadas. La evolución y posible selección de esta microbiota inicial, dependerá de las condiciones de almacenamiento posteriores.

La refrigeración constituye el proceso tecnológico más generalizado para retardar la alteración de la carne (Jay 1996); por lo tanto, los microorganismos capaces de desarrollarse a bajas temperaturas serán los responsables principales de la alteración de la misma.

A continuación se van a exponer las características de los microorganismos implicados con más frecuencia en la alteración de la carne. En apartados posteriores se tratarán las interacciones que se producen entre ellos o con el sustrato, así como la evolución de la microbiota contaminante bajo diferentes condiciones.

1.1.1. MICROORGANISMOS RESPONSABLES DE LA ALTERACIÓN DE LA CARNE EN REFRIGERACIÓN

La refrigeración actúa seleccionando, de entre toda la microbiota contaminante, a los microorganismos capaces de desarrollarse a bajas temperaturas. Algunos investigadores atribuyen a Forster, en 1887, el descubrimiento del crecimiento de bacterias a temperaturas próximas a 0 °C (Herbert 1981, Suhren 1989). Ingraham y Stokes (1959) consideran que -10 °C es la temperatura mínima a la que se puede producir crecimiento bacteriano.

Generalmente se acepta que, por cada aproximadamente 10 °C que aumenta la temperatura, se duplica la tasa de crecimiento bacteriano esperado (Gill 1986a). Sin embargo, a temperaturas de refrigeración inferiores a 8 °C, el efecto es más acusado, de tal forma que el tiempo que puede almacenarse una carne refrigerada se reduce a la mitad por cada 2 ó 3 °C que se eleva la temperatura. En el rango habitual de temperaturas de refrigeración de la carne, comprendido entre -1,5 y 5 °C, puede haber una variación en la tasa de crecimiento bacteriano de hasta ocho veces (James y James 2002). Obviamente, las temperaturas de refrigeración menores son las que más alargan

la vida útil de la carne, pero recuérdese que en ningún caso se frena totalmente el desarrollo microbiano hasta alcanzar los $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dependiendo de la temperatura límite de crecimiento y de las temperaturas óptimas de desarrollo, la terminología a aplicar a los microorganismos que crecen a bajas temperaturas ha sido motivo de polémica durante décadas (Ingraham y Stokes 1959, Eddy 1960, Morita 1975, Olson y Mocquot 1980, Suhren 1989, Kraft 1992). El término psicrófilo se aplicó inicialmente a los microorganismos capaces de crecer a temperaturas próximas a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, indicando este término, en cierto modo, que un microorganismo crece mejor a temperaturas de refrigeración que a temperaturas más elevadas. Posteriormente, en 1976, la Federación Internacional de Lechería adoptó el término de psicrotrofo y lo definió como un microorganismo que crece a $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menos independientemente de su temperatura óptima de crecimiento. Según Olson y Mocquot (1980), los psicrófilos y los psicrotrofos tienen el mismo intervalo mínimo de temperatura, comprendido entre $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, diferenciándose en sus temperaturas óptimas de crecimiento que se encuentran entre 25 y $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ para los psicrotrofos y entre 12 y $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ para los psicrófilos.

A continuación se describen los microorganismos de mayor relevancia en la alteración de la carne refrigerada. Como se verá, se especifican las temperaturas a las que pueden desarrollarse y las temperaturas óptimas de crecimiento. Estos datos permiten clasificarlos dentro de un grupo u otro, si bien, independientemente de la terminología, resulta evidente que ambos tipos de microorganismos integrarán la microbiota responsable de la alteración de la carne en refrigeración.

1.1.1.a. *Pseudomonas*

Puede decirse que los microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas* son los principales responsables de la alteración de la carne mantenida en refrigeración (Ayres 1960, Splittstoesser 1976, Molin y Ternström 1982, 1986, Molin y col. 1986, Gill 1986, Kraft 1986, 1992, Greer 1989, Lebert y col. 1998, Steihauserova 2000). De hecho, es frecuente observar que son otras las bacterias que predominan (*Acinetobacter*, *Moraxella*, *Shewanella putrefaciens* o *Brochotrix termosphaeta*) cuando las condiciones

dificultan el desarrollo de las pseudomonas; por ejemplo: el envasado al vacío o las atmósferas modificadas (Greer 1989).

Las pseudomonas son bacilos gram negativos, no esporógenos, móviles mediante flagelos polares monotricos o multitricos. Son aerobios estrictos (Palleroni 1989). Pueden o no formar pigmentos y producen oxidasas. El tiempo de duplicación en refrigeración es muy rápido, entre 7,6 y 8,2 horas a 7 °C y 2 horas a 15 °C (Mano 1997). Su crecimiento no se ve afectado a los valores de pH habituales de la carne (Gill y Newton 1982). Utilizan preferentemente la glucosa y una vez agotada ésta en el medio, utilizan la mayor parte de los aminoácidos, siendo entonces su crecimiento tan rápido como cuando crecen a expensas de la glucosa (Newton y Gill 1979).

Para simplificar la clasificación de las pseudomonas y reducir el número de especies, muchos autores han recurrido desde hace tiempo a diferentes esquemas, tomando como referencia diferentes características de estos microorganismos (Shewan y col. 1960, Hendrie y Shewan 1966, Stainer y col. 1966). Basándose en los métodos de los últimos autores citados, Shaw y Latty, en 1982, con el propósito de determinar los diferentes tipos de pseudomonas existentes en la carne, realizaron un estudio de taxonomía numérica de 110 pseudomonas aisladas a partir de carne de vacuno y de cerdo almacenado a 1 °C. Comprobaron que la mayoría de las pseudomonas que crecían en la carne no producían pigmentos, ya que sólo 21 de las 110 lo hacían. Establecieron cuatro grupos o *clusters* de acuerdo con el nivel de similitud (% S). El *cluster* nº 2, el más abundante, tiene como especie más representativa a *Pseudomonas fragi* y se agrupa con un nivel de similitud del 87 %. Los *clusters* 1 y 2 son los más próximos (86 % S) y los 3 y 4 se encuentran algo más alejados, 80,5 % S y 78,5 % S respectivamente.

Las cepas de los 4 *clusters* crecían a 4 °C pero no a 41 °C (excepto una cepa del *cluster* 2). Ninguna producía ornitina o lisina decarboxilasa, DNAasa, piocianina o sulfuro de hidrógeno. Los *clusters* 1 y 2, los más numerosos, con 32 y 52 cepas respectivamente, se componían en su mayor parte de cepas monotricas no fluorescentes (sólo 3 de las 84). Casi todas las cepas del *cluster* 3 eran fluorescentes y multitricas. Finalmente, todas las cepas del *cluster* 4 fueron fluorescentes y monotricas.

Molin y Ternström (1982) estudiaron 218 cepas psicrotrofas (200 procedentes de carne y 18 cepas tipo). Con todas ellas realizaron una taxonomía numérica basándose en 174 caracteres. Obtuvieron 15 grupos, siendo el *cluster* mayoritario (112 cepas) el encabezado por la especie *Pseudomonas fragi*. Otros grupos principales fueron los afines a *Pseudomonas fluorescens* biotipo I (16 cepas), *Pseudomonas fluorescens* biotipo III (7 cepas), *Shewanella putrefaciens* (10 cepas) y el denominado *cluster 2*, integrado por 21 cepas sin una asignación concreta. Nótese que *Shewanella putrefaciens* se estudió conjuntamente con las pseudomonas a pesar de pertenecer a otro género y caracterizándose fundamentalmente por poseer un metabolismo facultativamente anaerobio.

Dainty y col. (1983) trabajaron sobre 789 cepas procedentes de carne y confirmaron que la mayoría de los aislamientos se ajustaban al *cluster* identificado como *Pseudomonas fragi*. Un año más tarde, en 1984, Shaw y Latty realizaron un nuevo trabajo de taxonomía numérica utilizando en este caso como caracteres diferenciadores la capacidad de utilizar 18 fuentes de nitrógeno diferentes y confirmaron que *Pseudomonas fragi* o aquellas cepas que se correspondían con las asignadas a los *clusters 1 y 2* en su trabajo datado en 1982, eran, con mucho, las más frecuentes.

Trabajos más recientes como el realizado por Olsson y col. (2003) basados en la obtención de grupos de bacterias de acuerdo a la similitud de la secuencia de nucleótidos de fragmentos del gen 16S del ARN ribosómico, confirman que las pseudomonas constituyen los microorganismos predominantes en la carne almacenada en refrigeración y aerobiosis, incluso aunque en las fases iniciales se encuentren en menor proporción que otros microorganismos.

En lo referente a las temperaturas de crecimiento se puede tomar como referencia *Pseudomonas fragi* que puede crecer entre 0 y 35 °C con una temperatura óptima de 30°C (Herbraud y col. 1994). Frank y col. (1972) realizaron un estudio en el que obtuvieron tasas de crecimiento de las pseudomonas a 2 °C del orden de 10 veces menores que a 30 °C, no obstante, a ambas temperaturas mantuvieron constante su tamaño, su composición protéica y de ácidos nucleicos, así como su actividad catalasa.

Estos hechos confirman su versatilidad para crecer en un amplio intervalo de temperaturas.

A modo de resumen hacemos nuestras las palabras de Gill (1986): las *Pseudomonas* tienen una marcada ventaja sobre el resto de bacterias alterantes de la carne debido a su más rápida capacidad de crecimiento y a que pueden valerse de diferentes sustratos para desarrollarse.

1.1.1.b. *Acinetobacter* / *Moraxella*.

Estos dos géneros siguen en importancia a las *Pseudomonas* como microorganismos alterantes de la carne. Son muy similares y con frecuencia se estudian juntos. Las especies de ambos géneros constan de bacilos aerobios estrictos, gram negativos, inmóviles, no fermentadores que no utilizan las hexosas y que crecen sobre todo a partir de aminoácidos. Se diferencian entre sí porque *Moraxella* es oxidasa positivo y *Acinetobacter* no (Juni 1984, Bovre 1984).

La evolución de la taxonomía que han seguido estos géneros está recogida en los trabajos de Thornley (1967), Shawn y Latty (1988) y Prieto y col. (1992) entre otros. Rossau y col. (1991) propusieron la creación de la familia *Moraxellaceae* dividida en 2 grupos principales, por una parte *Acinetobacter* y por otra un *supercluster* con 4 subgrupos: *Moraxella* spp., *M. osloensis*, *M. atlantae* y un grupo heterogéneo que contenía, entre otras, a *Psychrobacter immobilis*, especie descubierta por Juni y Heym (1986) y solo diferenciable de *Moraxella* por la capacidad de producir ácido a partir de glucosa y otros azúcares.

Algunos autores consideran que estos géneros forman una parte significativa de la microbiota alterante de la carne (Dainty y col. 1983, Gill 1986). Sin embargo, otros trabajos concluyen que se sobreestima la importancia de estas bacterias (Eribo y Jay 1985, Eribo y col. 1985). En un estudio sobre la microbiota de la carne refrigerada, sólo el 5 % de los microorganismos aislados pertenecieron a los géneros *Acinetobacter* o *Moraxella*, frente al 95% de *Pseudomonas* (Gardner 1965). Gennari y col. (1992) detectaron *Moraxella* y *Acinetobacter* en un porcentaje relativamente alto de muestras

de carne y leche (40 y 64% respectivamente) y aunque en valores absolutos obtuvieron recuentos considerables de estas bacterias, el porcentaje respecto al total de la microbiota fue generalmente bajo. *Moraxella* y *Psychrobacter immobilis* se detectaron principalmente en carnes frescas y *Acinetobacter* en carnes alteradas.

Eribo y Jay (1985) detectaron menos del 1% de especies de *Moraxella-Acinetobacter* entre las cepas obtenidas a partir de carne picada y del orden del 5% en carne fresca. Eribo y col. (1985), a partir de 29 muestras de carne picada mantenidas entre 5-7 °C hasta la alteración, obtuvieron 1.354 aislamientos gram negativos, oxidasa positivos, (88% del total), de los cuales sólo 34 fueron identificados como *Moraxella*.

La proporción de cepas pertenecientes al grupo *Moraxella-Psychrobacter* decrece conforme avanza la alteración, mientras que aumenta ligeramente la de las pseudomonas (Prieto y col. 1992). Más que por su número o proporción, estas bacterias pueden jugar un papel potenciador de la actividad de otras bacterias, como *Shewanella putrefaciens* y dificultar el desarrollo de *Pseudomonas* spp. al limitar o restringir la disponibilidad de oxígeno, provocando que estas últimas degraden los aminoácidos incluso en presencia de glucosa utilizable (Gill y Newton 1977).

1.1.1.c. *Alcaligenes*

Las bacterias pertenecientes al género *Alcaligenes* son bacilos cortos gram negativos, catalasa positivos, aerobios estrictos y móviles por flagelos peritricos. Producen álcali a partir de sales orgánicas y amidas, lo que les da su nombre (Kerstens y DeLey 1984). No producen ácido o lo hacen a pequeña escala a partir de carbohidratos (Kraft 1992). La mayoría de los aislamientos obtenidos a partir de carne son oxidasa positivos (Dainty y col. 1983). Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 20 y los 37 °C, pero algunas especies, como *Alcaligenes venustus*, pueden crecer a 4 °C (Kerstens y DeLey 1984).

La presencia de microorganismos del género *Alcaligenes* en carnes es conocida desde hace tiempo (Ayres 1960). Estudios más modernos, como los de Nortje y col. (1990) o Mosupye y Von Holy (2000) informan sobre la presencia de estos

microorganismos como contaminantes de superficies de trabajo, equipos y personal en los mataderos.

También se ha puesto de manifiesto la presencia de *Alcaligenes* junto con otras bacterias como *Flavobacterium*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* en los aerosoles de agua utilizados para facilitar la refrigeración de las canales de aves (Fries y Graw 1999).

1.1.1.d. *Shewanella putrefaciens*

Shewanella putrefaciens ha estado encuadrada en diversos géneros: *Achromobacter*, *Pseudomonas* y *Alteromonas*. Se trata de una bacteria similar a las pseudomonas; se diferencia estructuralmente de ellas en las proporciones de guanina-citosina y fisiológicamente en su metabolismo anaerobio facultativo (Palleroni 1989). Estudios basados en la determinación de la secuencia de pequeñas subunidades del ARN ribosómico, demuestran la independencia de este género respecto a otros, como *Moritella*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* o *Pseudoalteromonas* (Gauthier y col. 1995).

Esta bacteria actúa de forma similar a las pseudomonas en la alteración aeróbica de la carne, si bien, aunque la glucosa se encuentre disponible, en aerobiosis utiliza los aminoácidos cisteína y serina produciendo sulfuros orgánicos volátiles (Gill y Newton 1979, Gill 1986) mientras que en anaerobiosis produce sulfuro de hidrógeno.

Es una bacteria muy sensible al pH y aparece principalmente en carnes como las DFD (del inglés *dark, firm and dry*), con valores de pH de 6,0 o superiores pero no se detecta en carnes con valores de pH normal (5,5) (Gill y Newton 1979, Parry 1993). Si las condiciones de pH y baja disponibilidad de oxígeno favorecen el crecimiento de *Shewanella putrefaciens*, ésta produce gran cantidad de sulfuro de hidrógeno que reacciona con la mioglobina del músculo, formando sulfomioglobina que produce un color verdusco de la carne (Nicol y col. 1970, Parry 1993). Esta bacteria junto con algunas especies de pseudomonas, como *Ps. fluorescens* o *Ps. fragi*, es una de las principales responsables de la aparición de olores anómalos como a “estropajo usado” o “trapo sucio húmedo” en canales de pollo (Russell y col. 1995).

1.1.1.e. *Aeromonas*.

Son bacilos gram negativos, móviles mediante flagelo polar (excepto *A. salmonicida* que es inmóvil), oxidasa positivos, fermentadores y anaerobios facultativos. Se distinguen del género *Vibrio* por ser insensibles al agente vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridina) (Bain y Shewan 1968). Las *Aeromonas*, igual que *Shewanella putrefaciens*, generan sulfuro de hidrógeno en anaerobiosis, lo que provoca la aparición de tonalidades verdosas en la carne (Parry 1993). El intervalo de temperaturas mínimas de crecimiento se encuentra entre los 0 y 5 °C. No obstante suelen asociarse a la alteración de la carne mantenida a temperaturas de refrigeración elevadas, rozando la temperatura ambiente, entre 10 y 20 °C (Ingram y Simonsen 1980).

En aquellos casos en los que la refrigeración no se vigila adecuadamente, estos microorganismos pueden representar una parte significativa de la microbiota alterante de la carne (Kraft 1992). En este sentido, un trabajo realizado por Geornaras y col. (1998), en el que el 12,5% de los aislamientos obtenidos a partir de canales de aves desplumadas mecánicamente fueron del género *Aeromonas*, se observó que en determinadas carnes pueden formar parte de la microbiota inicial en proporciones no despreciables.

1.1.1.f. *Flavobacterium*

Este género está formado por bacilos gram negativos, aerobios, que producen unas colonias translúcidas amarillas, amarillo verdosas o naranjas. Son catalasa, oxidasa y fosfatasa positivos. Algunos *Flavobacterium* son móviles mediante flagelos peritricos y las cepas inmóviles se pueden confundir con las del género *Cytophaga* con el que comparten muchas características tanto morfológicas como bioquímicas y taxonómicas (Barry y col. 1984).

Las cepas relacionadas con *Flavobacterium breve* y las pertenecientes al grupo IIb se encuentran habitualmente en agua y alimentos, como carne cruda de mamíferos o de aves (Hayes 1977). *Hymenobacter actinosclerus*, una nueva especie íntimamente relacionada con los géneros *Flavobacterium* y *Cytophaga*, es resistente a las radiaciones

ionizantes y ha sido aislada de carnes de cerdo que se habían sometido previamente a este tipo de radiaciones (Collins y col. 2000).

1.1.1.g. *Xanthomonas*

Son bacilos gram negativos, aerobios estrictos, íntimamente relacionadas con las pseudomonas. Producen un pigmento carotenoide insoluble en agua de color amarillo. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 25 y 30 °C, si bien pueden crecer hasta 5 °C (Bradbury 1984). Se pueden confundir con *Flavobacterium*, si bien, las *Xanthomonas* son móviles mediante flagelo polar (Splittstoesser 1976).

Habitualmente son patógenos de los vegetales (Bradbury 1984), no obstante aparecen citadas en determinados trabajos como integrantes de la microbiota alterante de la carne (Kraft 1992, Sierra y col. 1995).

1.1.1.h. *Enterobacteriaceae*

Este grupo de bacilos gram negativos y anaerobios facultativos tiene importancia como indicador de contaminación fecal pero su contribución a la alteración de la carne en aerobiosis es bastante limitada. En ausencia de oxígeno y cuando el pH es inferior a 5,8, al no existir una microbiota competitiva, las enterobacterias psicrotrofas se multiplican de tal forma que en la carne envasada al vacío, pueden constituir una parte importante de la microbiota total (Beyer y Sinell 1981). También pueden tener importancia en carnes envasadas en atmósferas modificadas. Jiménez y col. (1997) han comprobado que atmósferas anaerobias enriquecidas en un 70 % de CO₂ no detenían totalmente el crecimiento de las enterobacteriaceas.

En condiciones aerobias, las enterobacteriaceas utilizan la glucosa y la glucosa-6 fosfato como sustratos. Algunas cepas pueden degradar ciertos aminoácidos produciendo aminas y sulfuros volátiles que confieren a la carne, los últimos olores desagradables (McMeekin 1982).

Aunque el crecimiento de estas bacterias en la carne refrigerada en aerobiosis, normalmente se inhibe por la microbiota competitiva, hay que tener en cuenta que pueden suponer un porcentaje importante de los microorganismos originalmente presentes. Sirva como ejemplo el trabajo de Geornaras y col (1998), en el que el 40 % de los aislamientos obtenidos a partir de canales de aves y el 29,1 % de los procedentes de agua de escaldado de un matadero de aves de Sudáfrica, resultaron ser de la familia *Enterobacteriaceae*.

1.1.1.i. *Brochotrix thermosphacta*

Es un bacilo gram positivo, no pigmentado, catalasa positivo, inmóvil, aerobio y anaerobio facultativo que no forma cápsulas ni esporas (Peter y col. 1986). Puede crecer en relativamente bajas actividades de agua (Skovgaard 1985) y su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 20-25 °C, si bien puede multiplicarse entre 0 y 30 °C (Peter y col. 1986). Todas las cepas crecen en presencia de NaCl al 6,5 % y algunas incluso en concentraciones superiores al 10 % (Gardner 1981). El pH de crecimiento óptimo es 7,0, pero en aerobiosis puede multiplicarse entre valores de pH de 5,0-9,0 (Brownlie 1966). En anaerobiosis, algunos autores como Grau (1980), citan que no puede crecer a pH inferiores a 5,8 mientras que otros, como Mano (1997), han observado el crecimiento de esta bacteria en carnes envasadas en atmósferas modificadas en ausencia de oxígeno a valores de pH incluso de 5,3.

Los productos finales del metabolismo aeróbico de la glucosa son ácido acético, acetoína y ácidos grasos volátiles (ácidos isobutírico e isovalérico), responsables del olor dulzón de la carne alterada por este microorganismo (Dainty y Hibbard 1980, 1983). Si la cantidad de glucosa disponible es alta y el pH bajo, se favorece la formación de acetoína, mientras que si la glucosa es escasa y el pH tiende a la neutralidad, se favorece la formación de ácidos grasos volátiles (Peter y col. 1986). En anaerobiosis, el producto final mayoritario del metabolismo de la glucosa es ácido láctico y pequeñas cantidades de ácidos grasos volátiles (Gill 1986).

Es el único microorganismo gram positivo que se aísla en cantidades considerables a partir de carnes alteradas mantenidas en refrigeración en aerobiosis

(Dainty y col. 1983, Sierra y col. 1995, Moreno 1997, Samelis y col. 2000, Ozdemir y Sireli 2001).

Gardner y col. (1967) demostraron una mayor incidencia de *B. thermosphacta* conforme decrecía la permeabilidad al oxígeno de los materiales de envasado. En un trabajo realizado por Blixt y Borch en 2002 en el que se comparaba la alteración de la carne de cerdo y vacuno envasada al vacío se encontraron recuentos de *Brochotrix thermosphacta* tan sólo del orden de 10^2 a 10^4 ufc/g en ambas especies. Sin embargo, también en carnes envasadas al vacío conservadas en refrigeración, se han aislado durante las primeras fases, unas dos semanas, a niveles mayores, del orden de 10^5 ufc/g (Sakala y col. 2002).

El pH del tejido graso (6,5-7,0), más alto que el del músculo, y las diferencias en la disponibilidad de oxígeno entre estos dos tejidos, puede influir en el grado en que *B. thermosphacta* crece en anaerobiosis (Kraft 1992), se han observado marcadas diferencias entre el número de *B. thermosphacta* que aparece en músculo y en la grasa de carne envasada al vacío (Egan y Grau 1981).

1.1.1.j. Bacterias lácticas.

Puede decirse que las bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*) son ubicuas en la naturaleza y, dada su capacidad para crecer en condiciones ambientales variadas, resultan muy competitivas en la contaminación de los alimentos (Stamer 1976). Crecen en presencia de altas concentraciones de carbohidratos, productos de degradación de las proteínas y con tensiones de oxígeno y pH bajos, condiciones que habitualmente inhiben el crecimiento de otras bacterias (Stamer 1976).

El género *Lactobacillus*, el más numeroso de las bacterias lácticas, está integrado por bacilos gram positivos, no esporulados, no pigmentados, anaerobios facultativos o microaerófilos, catalasa negativos, generalmente inmóviles. El ácido láctico constituye al menos la mitad de los productos finales de su metabolismo fermentativo, superando incluso el 80 % en los considerados homofermentativos. Su intervalo de temperatura de

crecimiento se cifra entre 2 y 53 °C, con una temperatura óptima de 30-40 °C (Kandler y Norbert 1986).

Lactobacillus plantarum crece a 4 °C y algunas especies como *Lactobacillus sake* y *Lactobacillus curvatus* pueden hacerlo a 2 °C (Kandler y Norbert, 1986). La limitación en la disponibilidad de oxígeno en la carne envasada al vacío y conservada en refrigeración favorece el crecimiento de los lactobacilos psicrotrofos frente a las pseudomonas y otras bacterias (Reuter 1981), ya que la falta de oxígeno no inhibe el desarrollo de la microbiota láctica mientras sí lo hace con la mayor parte de los microorganismos alterantes de la carne en aerobiosis. En un trabajo realizado a partir de carne de pollo, Ozbas y col. (1996) comprobaron que el número de bacterias lácticas se incrementaba de forma mucho más rápida en aquellas muestras envasadas en atmósfera modificada, o al vacío, que en las conservadas en aerobiosis.

Los lactococos, como *L. lactis* y *L. cremoris*, son cocos gram positivos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos con una temperatura óptima de crecimiento alrededor de 30 °C, si bien algunos pueden crecer por debajo de los 10 °C. El género *Leuconostoc* está integrado por bacterias gram positivas de forma esférica y a veces lenticular, catalasa negativas que se multiplican entre 2 y 30 °C.

Lactobacillus sake y *Lactobacillus curvatus* fueron las especies dominantes entre los nueve grupos de estreptobacterias aisladas por Morishita y Shiromizu (1986) a partir de carne y productos cárnicos. En este mismo sentido, utilizando la técnica de PCR multiplex, Yost y Nattress (2002) caracterizaron la microbiota láctica de lomo de cerdo envasado al vacío y almacenado a 2 °C, obteniendo un 74 % de aislamientos de *Lactobacillus sake* y un 25,7 % de *Leuconostoc* spp.

Algunas bacterias lácticas como *Leuconostoc mesenteroides* (L124) y *Lactobacillus curvatus* (L442) producen bacteriocinas que pueden inhibir el crecimiento de otras bacterias alterantes de la carne en anaerobiosis, como *Brochotrix thermosphacta* o enterococos, pudiendo utilizarse como cultivos biopreservadores en algunos productos cárnicos (Metaxopoulos y col. 2002).

1.1.1.k. *Micrococaceae*

La familia *Micrococaceae* consta de cuatro géneros: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Stomatococcus* y *Planococcus*. Todos ellos están integrados por cocos gram positivos, que pueden crecer en presencia de concentraciones de NaCl del 5 % e incluso alguno de ellos, del 10 al 15 %. Habitualmente son catalasa positivos y la mayoría son inmóviles, salvo *Micrococcus agilis* y las especies del género *Planococcus* (Schleifer 1986).

Micrococcus y *Planococcus* son aerobios (Kocur 1986, 1986a), mientras que *Stomatococcus* y *Staphylococcus* son anaerobios facultativos (Bergan y Kocur 1986, Kloos y Schleifer 1986). Las temperaturas óptimas de crecimiento se encuentran entre 25 y 37 °C (Schleifer 1986), si bien alguna especie como *Staph. xylosus* puede crecer a 4 °C a actividades de agua del 0,92 (Chandler y McMeekin 1989).

Prieto y col. (1995) realizaron un estudio de taxonomía numérica sobre 296 cepas gram positivas, catalasa positivas, aisladas a partir de carne de cordero conservado en aerobiosis a 7 °C y a 30 °C hasta su alteración. Obtuvieron 9 grupos principales (A-I); el grupo A, el más numeroso, estaba integrado por 142 cepas y tenía como representante al *Staph. xylosus*. Otros grupos importantes fueron el B (30 cepas), representado por el *Staph. saprophyticus* y el G (48 cepas), representado por el *Staph. capitis*. También hay que destacar que el mayor porcentaje de aislamientos a 7 °C se encuadraron en los dos grupos más numerosos, el A y el G.

La incidencia de estafilococos en la alteración de la carne se considera poco significativa (Mossel y Van Netten 1990, Varnam y Evans 1991), incluso aunque constituyan una parte importante de la microbiota inicial (Gill y Bryant 1992). No obstante, Prieto y col. (1995) comprobaron, sorprendentemente, que un 25,5 % de los aislamientos de la microbiota total se correspondía con estafilococos, llegando a ser dominante en la fase final de la alteración, aunque hay que tener en cuenta que muchos de los aislamientos se realizaron a 30 °C y no a temperaturas de refrigeración.

1.1.1.1. Otros géneros

Además de las especies, géneros, familias o grupos de bacterias que se han descrito en los apartados anteriores, se pueden citar otros microorganismos, como las bacterias corineformes de los géneros *Arthrobacter*, *Brevibacterium* o *Corynebacterium*, que sólo forman parte esporádicamente de la microbiota de la carne y juegan un papel poco significativo en su alteración (Kraft y col. 1966, Uche y Agbo 1985, Godda y col. 1986).

El crecimiento de mohos suele ser escaso durante el almacenamiento de la carne en refrigeración, limitándose a crecimientos en superficie, sobre todo cuando ha habido una deshidratación superficial y disminuye la a_w . Hace años, cuando se conservaban las canales a temperaturas de congelación elevada (-5 a -10 °C) era habitual la proliferación de mohos psicrotrofos (*Cladosporium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Thamnidium*), dando lugar a la aparición de filamentos y manchas de diferentes colores. En la actualidad, este fenómeno no se produce porque se utilizan temperaturas de congelación más bajas (James y James 2002), de al menos -18 °C donde ya no es posible el crecimiento de microorganismo alguno (Jay 1996).

Las levaduras que aparecen en la carne con más frecuencia pertenecen a los géneros *Torulopsis*, *Candida* y *Rhodotorula* (Ayres 1960). En un estudio realizado recientemente por Ismail y col. (2000) sobre la presencia de levaduras en carne de ave, cruda o procesada, y conservada a 5 °C, se concluyó que las levaduras, especialmente *Yarrowia lipolytica* y *Candida zeylanoides* podían jugar un papel más importante en la alteración de la carne que el que se consideraba hasta esos momentos.

Las bacterias patógenas que con mayor frecuencia se aíslan de la carne son *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp., *E. coli* enterohemorrágico O157:H7, *Aeromonas hydrophila* y *Listeria monocytogenes* (Kotula y col. 1987, Lammerding y col. 1988, James y James 2002a). De todos ellos adquieren especial importancia los patógenos psicrotrofos, capaces de crecer a temperaturas de 5 °C o inferiores, como son

Clostridium botulinum (no proteolítico), *E. coli* (enterohemorrágico), *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* y *Listeria monocytogenes* (Kraft 1992).

1.1.2. EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA Y PROCESOS DE ALTERACIÓN

La carne, debido a su elevada a_w , (aproximadamente 0,99), su pH (5,5 – 6,0) y su riqueza en nutrientes constituye un sustrato idóneo para el desarrollo bacteriano. Entre los nutrientes se puede distinguir un primer grupo de componentes mayoritarios como las proteínas (15-22%) y los lípidos (2,5-37%). Un segundo grupo integrado por compuestos nitrogenados solubles de bajo peso molecular, como la creatina, los nucleótidos, péptidos y aminoácidos que suponen del 1,57 al 1,65% (Ingram y Simonsen 1980, Jay 1996) y un tercer grupo en el que se incluye el glucógeno muscular que se degrada durante el comienzo del rigor mortis (Bendall 1973) generándose ácido láctico; este metabolito puede alcanzar unas concentraciones de hasta 9 mg/g (Gill 1983). Las concentraciones de glucosa son del orden de 100 $\mu\text{g/g}$ en vacuno, 300 $\mu\text{g/g}$ en cordero y 900 $\mu\text{g/g}$ en la carne de cerdo (Gill 1976).

La alteración de las piezas de carne es un fenómeno que se produce básicamente en su superficie. Según Greer (1989), las fibras de colágeno son resistentes a la acción de las proteinasas bacterianas, de tal forma que las bacterias que se encuentran en la superficie no pueden penetrar al interior del músculo hasta que no se generan enzimas proteolíticas en cantidad suficiente para degradar el colágeno, lo que sólo ocurre al final de la fase de crecimiento exponencial (Glenn 1976, Kraft 1992), es decir, muy avanzada la multiplicación cuando la concentración microbiana por cm^2 alcanza el séptimo orden logarítmico. En este momento, el músculo queda cubierto de una capa de limo y resulta evidente que ya está alterado (Dainty y col. 1975, Gill y Penney 1977, Kraft 1992). De todas formas, se ha observado cierta capacidad de penetración en algunas experiencias. Cuando *Pseudomonas putida* y *fragi* crecen a 37 °C pueden penetrar hasta 3 cm de profundidad a través de los septos musculares, mientras que *Lactobacillus casei*, a esa misma temperatura, alcanza profundidades de 2 cm (Gupta y Nagamohini 1993).

Es de señalar que las bacterias alterantes que crecen en la superficie comienzan a utilizar sustratos de “segunda preferencia” cuando en el espesor del músculo todavía hay

abundancia de sustratos de “primera preferencia” (Gill 1976). En el crecimiento aerobio, con una concentración de aproximadamente 100 µg/g de sustrato de uso preferente (glucosa), la superficie del músculo puede soportar una carga bacteriana de aproximadamente 10⁸ bacterias/cm² antes de comenzar a consumir sustratos secundarios, mientras que en anaerobiosis, la fermentación es menos eficaz y, con la misma concentración de glucosa, sólo se alcanza una concentración de 10⁷ bacterias/cm² (Gill 1983), lo que quizás explique por que se mantiene la tasa de bacterias lácticas a ese nivel durante semanas en la carne envasada a vacío (Vanderzant y col. 1982, Asensio y col. 1988).

Algunas bacterias que crecen sobre tejido adiposo degradan los triglicéridos pero no intervienen en el inicio de la alteración (Gill y Newton 1980). El crecimiento bacteriano sobre tejido adiposo húmedo se produce a expensas de los mismos sustratos solubles de bajo peso molecular que existen en el músculo, pero las concentraciones de nutrientes en el tejido adiposo son menores y la difusión desde el interior más lenta, de tal forma que los sustratos se agotan más rápidamente y se detiene el crecimiento observándose cargas bacterianas menores que las que se presentan en tejido muscular (Gill 1983).

1.1.2.a. Alteración de la carne en aerobiosis

Cuando las bacterias utilizan como fuente principal de carbono los carbohidratos, no se producen, por lo general, productos metabólicos especialmente desagradables a nuestros sentidos del olfato y gusto (Mossel e Ingram 1955). Sin embargo, la utilización de aminoácidos u otros compuestos que contienen nitrógeno y/o azufre, producen a menudo metabolitos realmente ofensivos (McMeekin 1982). Así pues, la aparición de signos de alteración depende tanto del sustrato como de la actividad metabólica bacteriana. En la Tabla 1.1 se expone, de forma resumida, los sustratos utilizados por algunos microorganismos que habitualmente alteran la carne y los principales productos finales de su metabolismo.

Las pseudomonas y las bacterias del grupo *Moraxella/Acinetobacter* son, habitualmente, los microorganismos aerobios presentes en la microbiota de la carne

Tabla 1.1
Sustratos utilizados por los microorganismos que habitualmente alteran la carne y principales productos finales de su metabolismo.

Microorganismo	Sustratos utilizados		Productos finales del metabolismo	
	Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis
<i>Pseudomonas</i>	Glucosa (1) Aminoácidos (2) Ácido láctico (3)		Sulfuros Ésteres, ácidos aminas (putrescina, cadaverina)	
<i>Acinetobacter/</i> <i>Moraxella</i>	Aminoácidos (1) Ácido láctico (2)		Ésteres, sulfuros	
<i>Shewanella</i> <i>putrefaciens</i>	Glucosa (1) Aminoácidos (2) Ácido láctico (3)	Glucosa (1) Aminoácidos (2)	sulfuros	H ₂ S
<i>Brochotrix</i> <i>thermosphacta</i>	Glucosa (1) Aminoácidos (2)	Glucosa (1)	ácido acético acetoína ácido isovalérico ácido isobutírico	Ácido láctico Etanol
<i>Enterobacter</i>	Glucosa (1) Glucosa-6-fosfato (2) Aminoácidos (3) Ácido láctico (4)	Glucosa (1) Glucosa-6-fosfato (2) Aminoácidos (3)	sulfuros aminas	Ácido láctico CO ₂ , H ₂ H ₂ S Aminas
<i>Lactobacillus</i>		Glucosa (1) Aminoácidos (2)		Ácido láctico Ácidos grasos volátiles

El número indica el orden de utilización de cada sustrato

Fuentes: Hitchner y col. 1979, Edwards y col. 1985 y Lambert y col. 1991

en número suficiente para jugar un papel determinante en la alteración de este alimento (Kraft 1992). No obstante, y aunque *Moraxella* y *Acinetobacter* utilizan de forma preferente los aminoácidos como sustrato, las cantidades de productos de degradación que generan suponen un porcentaje pequeño del total, dejando el papel protagonista de la alteración de la carne en aerobiosis al metabolismo de las pseudomonas (Gill 1983).

En las primeras fases, las pseudomonas tienen un metabolismo glucolítico y por lo tanto no producen metabolitos especialmente desagradables, pero cuando la densidad bacteriana supera las 10⁸ bacterias/cm² (Gill 1983), la glucosa “superficial” se ha consumido completamente y la difusión de la misma desde el interior del músculo resulta insuficiente, por lo que comienzan a utilizar el lactato y los aminoácidos generando a partir de estas sustancias malolientes (Gill 1986, Greer 1989). Entonces, el pH de la carne aumenta como consecuencia de la liberación de amoníaco, produciéndose

por ello un incremento en la capacidad de retención de agua de las proteínas, lo que las hace más susceptibles al ataque de las proteinasas bacterianas (Kraft 1992).

En menor cantidad, también se producen otros metabolitos como aminas (cadaverina, putrescina, isobutilamina), sulfuro de hidrógeno y metil sulfuro, que, aún en pequeñas concentraciones, algunos de ellos (aminas volátiles y sulfuros), confieren a la carne olores y sabores marcadamente desagradables (Eskin y col. 1971, Miller y col. 1973). En estas fases, la densidad bacteriana es tan elevada que la acumulación de catabolitos es muy rápida (Gill 1983).

De lo expuesto se concluye que el comienzo de la alteración de la carne en aerobiosis se produce cuando se agota la glucosa en la superficie. Hay que tener en cuenta que los porcentajes de carbohidratos en la carne son relativamente bajos (Greer 1989) y que la concentración de compuestos nitrogenados en el músculo suele ser bastante más elevada (Ingram y Simonsen 1980).

En las carnes DFD, las pseudomonas, además de *Shewanella putrefaciens*, son igualmente los microorganismos que determinan su alteración. El pH de estas carnes, más elevado que el de las carnes normales, no influye negativamente en el desarrollo de las pseudomonas (Gill y Newton 1982). Sin embargo, la glucosa puede estar ausente desde las primeras fases del desarrollo bacteriano y los microorganismos tendrán que recurrir a los aminoácidos directamente. En estas condiciones, la alteración resulta evidente con concentraciones microbianas de $10^6/\text{cm}^2$ (Gill 1983).

1.1.2.b. Alteración de la carne en anaerobiosis

Los lactobacilos y *Brochotrix thermosphacta* son los microorganismos que juegan un papel más importante en la alteración de la carne en anaerobiosis. Si la microbiota dominante está compuesta por lactobacilos, la fermentación de la glucosa produce gran cantidad de ácido láctico y el descenso de pH impide el crecimiento de *B. thermosphacta*. En estas condiciones, la alteración de la carne se detecta sobre todo como consecuencia de la acumulación de ácidos grasos de cadena corta (Sutherland y col. 1976). Esta alteración se produce de forma lenta y sólo se detecta mucho después de

haber alcanzado la fase estacionaria microbiana (Newton y col. 1977, Sutherland y col. 1975).

En carnes con valores de pH 6,0 o superiores, *Shewanella putrefaciens*, tiene un papel importante en su alteración, ya que en condiciones anaeróbicas con concentraciones de 10^6 ufc/cm² se producen grandes cantidades de sulfuro de hidrógeno y, por tanto, de sulfomióglobina, lo que provoca un evidente enverdecimiento de la carne (Nicol y col. 1970, Gill y Newton 1979).

En el caso particular del envasado a vacío, si éste no consigue evacuar prácticamente todo el oxígeno o existen problemas de hermeticidad en el envase, las pseudomonas proliferarán y alterarán la carne de igual modo a lo descrito para las condiciones aerobias. La alteración aparece entonces con densidades bacterianas relativamente bajas, 10^6 pseudomonas/cm² (Newton y col. 1977) debido al consumo de glucosa por los lactobacilos, cuya velocidad de crecimiento suele ser similar en aerobiosis y en condiciones de vacío, y a que las pseudomonas, al crecer en concentraciones limitantes de oxígeno, degradan los aminoácidos incluso en presencia de glucosa (Gill 1983).

1.1.2.c. Procesos de adhesión bacteriana a la superficie cárnica.

Ya se ha dicho que la superficie de la carne es el lugar donde se desarrollan las bacterias que la alteran (Gill 1986; Delaquis y col. 1992). La formación de agregados de microorganismos es ubicua, tanto en ecosistemas naturales, como artificiales (Costerton y col. 1987). La atracción y fijación entre las bacterias y una superficie se debe a las características físico químicas de ambas (Marshall 1976). La interacción entre ellas se consolida a menudo mediante la secreción de sustancias extracelulares y el crecimiento puede dar lugar a la formación de comunidades complejas de agregados celulares (Costerton y col. 1985), cuyo desarrollo se produce de acuerdo a unos complejos patrones de comportamiento superficial específicos para cada tipo de microorganismo (Lawrence y col. 1987; Marshall 1988).

Las interacciones entre las bacterias y las superficies se producen tanto en alimentos como en las superficies de los equipos de procesado. Desde éstas, los microorganismos pueden pasar a formar parte de la microbiota contaminante de cualquier alimento, como la carne. Considérese sobre todo el faenado de una canal y su despiece y se comprenderá la facilidad con que este producto puede contaminarse al contactar con ganchos, cuchillos, guantes, mesas, etc.

Los estudios realizados por Warriner y col. (2001) han concluído que no existen diferencias significativas entre la fuerza de adhesión de las distintas bacterias que analizaron: *Pseudomonas fragi*, NCTC 10689, *Listeria monocytogenes* BL5/2, *Salmonella typhimurium* LT2 y *Escherichia coli* JM109.

Notermans y Kampelmacher (1974) demostraron que el lavado de las canales reducía el número de microorganismos adheridos a la carne. De hecho, estos primeros trabajos sirvieron de base para el desarrollo de técnicas de detección y cuantificación de las bacterias adheridas a la superficie de la carne. La facilidad con que unas bacterias pueden eliminarse de la superficie mediante lavado se expresa en términos del valor S, que se define como el logaritmo de la relación entre los recuentos obtenidos mediante mezcla de la carne y los obtenidos mediante lavado (Firstenberg-Eden y col. 1979). Otros autores, como Dickson y Koohmaraie (1989), han propuesto una expresión matemática simple: el valor S_R , que representa el porcentaje total de la población bacteriana asociada a la superficie.

Si bien la adhesión de las bacterias a la superficie cárnica es fácilmente demostrable (Yada y Skura 1982), se han realizado diferentes trabajos para determinar el grado de esta adhesión y comprobar si la misma es un hecho accidental o por contra, este producto es especialmente susceptible a las adhesiones.

En este sentido, Delaquis y McCurdy (1990) contaminaron intencionadamente filetes de carne de vacuno con *Pseudomonas fragi* y *Pseudomonas fluorescens*. Posteriormente, los incubaron para favorecer la adhesión y tras un lavado con diferentes diluyentes (KCl 0,1 M, agua de peptona al 0,1 % y NaCl 0,1 M) determinaron los porcentajes de adhesión, expresados como S_R . Los resultados fueron similares a los

obtenidos por Dickson y Koohmaraie (1989). No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de movilizar bacterias de la superficie entre los tres diluyentes utilizados, aunque el más efectivo, resultó ser el KCl, coincidiendo con lo publicado por Appl y Marshall (1984) quienes atribuyeron a esta sal la capacidad de interferir los procesos de adhesión en las fases iniciales.

En este mismo trabajo Delaquis y McCurdy (1990) demostraron que la adhesión de las dos bacterias estudiadas se producía rápidamente a 25 °C, llegando al 60% en la primera media hora y el 80-90% a las 5 horas de incubación. A 4 °C, la adhesión se produjo muy rápidamente en *Pseudomonas fluorescens* y de forma más lenta en *Pseudomonas fragi* sin afectar, no obstante, al total de células adheridas a las 24 h. Así mismo, comprobaron que con el tiempo aumentaba proporcionalmente el número de bacterias no adheridas respecto a las adheridas.

En lo referente al tiempo necesario para que tenga lugar la adhesión bacteriana, los estudios realizados con *Pseudomonas fragi* y con *Brochotrix termosphacta* han demostrado que el 80% de la adhesión se completa en el primer minuto de contacto, presentando *P. fragi* mayor adhesión que *B. termosphacta* (Han y Yang 1999).

La temperatura de almacenamiento de la carne también influye en la capacidad de adhesión bacteriana a la superficie, siendo mayor a temperaturas de 4 °C, que a 25 °C (Delaquis y McCurdy 1990).

Estudios realizados respecto a la adhesión bacteriana a la superficie de canales de vacuno tratadas con vapor, demostraron que no existe diferencia significativa entre la adhesión que se produce en estas canales, respecto a las no tratadas (Warriner y col. 2001).

También se ha observado la capacidad de adhesión de ciertas bacterias patógenas, como *E. coli* enterohemorrágico; éstas permanecieron adheridas y viables tras 12 días de haberse inoculado experimentalmente en carne picada, si bien no se apreció crecimiento, manteniéndose los recuentos en unos niveles similares a los del inóculo inicial (Santos y col. 1995).

Rodrigues y col. (1996) han estudiado la adhesión bacteriana sobre diferentes proteínas musculares comprobando que la adhesión sobre la miosina, la actina y el fibrinógeno es menor que la que se produce en el colágeno o la elastina. Estos autores concluyeron que la adhesión bacteriana a la superficie cárnica está asociada principalmente al colágeno perimisial que mantiene juntas las fibras musculares. Delaquis y col. (1992) también consideran que el colágeno y la elastina son las zonas preferentes de adhesión bacteriana en la superficie cárnica.

Benedict y col. (1991), encontraron que algunas sustancias como la manosa inhibían la adhesión de *Salmonella* sp. a la carne de pollo, si bien DeGraft-Hanson y Heath (1990) comprobaron que esta inhibición no se producía con pseudomonas.

1.1.3. LA CARNE PICADA

Dado que en esta memoria se aborda la aplicación de la técnica de la p-nitroanilina para la evaluación de la carga bacteriana en la carne picada, procede realizar una revisión de los aspectos que diferencian a este producto de las piezas de carne o los filetes.

El Real Decreto 1916/1997 por el que se establecen las condiciones sanitarias aplicables a la producción y comercialización de carne picada y preparados de carne, define la carne picada como aquella que ha sido sometida a una operación de picado en fragmentos o al paso por una máquina picadora continua. Esta norma es de obligado cumplimiento en la carne picada elaborada en las industrias cárnicas. Sin embargo, no es de aplicación a la carne picada y a los preparados de carne producidos en establecimientos de venta al por menor o a los elaborados en los locales adyacentes a los puntos de venta para suministro directo al consumidor, en los que debe aplicarse la Orden 14/86.

La Orden de 14 de enero de 1986 por la que se aprueba la norma de calidad para carnes picadas de vacuno, ovino y porcino destinadas al consumo interior, define la carne picada en el punto 4 de forma más explícita, como “*el producto constituido por carne magra de vacuno o de ovino o de porcino, debidamente picada, que no ha sufrido*

ni la acción del calor, ni la maduración, ni la maceración". Esta misma norma especifica en el punto 5.4.1, respecto a la consistencia, que *"el producto debe estar suficientemente ligado, formando un conjunto homogéneo de consistencia pastosa"*. Esta norma prohíbe expresamente la mezcla de carnes de distintas especies, aunque esto no es de aplicación para las carnes picadas preparadas en presencia del consumidor.

Desde el punto de vista microbiológico, la carne picada es uno de los productos más estudiados tanto por sus implicaciones en la salud pública (Herrer 1995), como por la indudable importancia económica que representa para la industria cárnica.

Kraft (1992) cita, que algunos autores, como Kirsch a mediados del siglo XX se sorprendían al comprobar que la calidad microbiológica de la carne picada no había variado en los últimos 30 ó 40 años. Sin embargo, los sistemas de producción e inspección más modernos, basados en el análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC), que inciden en la prevención de la contaminación a lo largo de todas las fases de producción, han conseguido mejorar la calidad higiénica de la carne –incluyendo la picada- y en los últimos años se detectan menos contaminaciones y recuentos menos elevados como ya señalaron Eisel y col. (1997).

No obstante, incluso en los sistemas de producción que respetan estos métodos, la pérdida de control de la temperatura durante el almacenamiento, conlleva un incremento rápido del número de bacterias (Gill y McGinnis 1993). Pizzin y col. (2000) evaluaron la calidad microbiológica de la carne picada y de hamburguesas de vacuno y porcino comercializadas en supermercados y carnicerías; comprobaron que, en general, la calidad era satisfactoria; no obstante, enfatizan en la necesidad de un control exhaustivo de las temperaturas de almacenamiento. Herdia y col. (2001) obtuvieron peores resultados al estudiar la calidad microbiológica de la carne picada comercializada en el área metropolitana de Monterrey (Méjico). Estos autores comprobaron que la calidad de las muestras analizadas resultaba insatisfactoria, con recuentos superiores a 10^6 coliformes/g en el 40 % de las muestras y presencia de patógenos como *Salmonella* spp. (11,4% de las muestras), *Listeria* spp. (62 %), *Listeria monocytogenes* (16 %) o *E. coli* (76 %).

Mientras que la contaminación bacteriana de la carne en piezas se limita prácticamente a la superficie, el proceso de picado hace que la carga microbiana se distribuya de forma homogénea por toda la masa. Además, durante el picado se produce una liberación de extracto acuoso de la carne, de forma que el sustrato final resulta sumamente favorable para el crecimiento bacteriano (Duitschaever 1973, Herrer 1995). Por otra parte, hay que tener en cuenta que la carne picada y sus derivados, tanto refrigerados como descongelados, se consume, en muchas ocasiones, tras tratamientos culinarios insuficientes o inadecuados (El-Leithy y Rashad 1989, Kraft 1992, Eisel y col. 1997).

Desde la década de los 70 ha habido mucho interés en establecer estándares de calidad microbiológica para los alimentos en general y la carne picada en particular (Carl 1975, Pivnick y col. 1976, Winslow 1979). Las tablas 1.2 (criterios microbiológicos) y 1.3 (criterios de composición) recogen las exigencias de calidad de la carne picada establecidas por la legislación española en las normas a las que se ha hecho referencia.

Tabla 1.2
Criterios microbiológicos aplicables a la carne picada

Norma y ámbito de aplicación	Microorganismo	Límite permitido
Orden 14/86	<i>Salmonella</i>	Ausencia en 25 g
(BOE 21/01/86)	<i>Shigella</i>	Ausencia en 25 g
Carne picada elaborada por establecimientos de venta al menor	<i>Staph. aureus enterotoxigénico</i> <i>Clostridium perfringens</i>	Máximo 1×10^2 ufc/g Máximo 1×10^2 ufc/g
Real Decreto 1916/97	Aerobios mesófilos	$n=5, c=2, m=5 \times 10^3/g, M= 5 \times 10^6/g$
(BOE 13/01/98)	<i>E. coli</i>	$n=5, c=2, m=50/g, M= 5 \times 10^2/g$
Carne picada elaborada por industrias cárnicas	<i>Salmonella</i> <i>Staphilococcus aureus</i>	Ausencia en 10 g $n=5, c=2, m=10^2/g, M= 5 \times 10^3/g$

n = Número de unidades que componen la muestra

c = Número de unidades de la muestra que manifiestan valores situados entre m y M

m = Límite por debajo del cual todos los resultados se consideran satisfactorios

M = Límite de aceptabilidad por encima del cual los resultados dejan de considerarse satisfactorios. $M= 10xm$ cuando el recuento se efectúa en medio sólido y es igual a $30xm$ cuando el recuento se efectúa en medio líquido.

Fuente: Orden de 14 de enero de 1986 (BOE nº 18 de 21 de enero). Real Decreto 1916/1997 de 19 de diciembre (BOE nº 11 de 13 de enero de 1998).

Un hecho a tener en cuenta es que la ausencia de microbiota competitiva no patógena, puede favorecer el posterior desarrollo de microorganismos patógenos

contaminantes. Así, en un trabajo de Jay (1996a), se hacía la pregunta “¿cuán limpio es demasiado limpio?” y concluía que la microbiota de fondo ejerce un efecto antagonista frente al desarrollo de patógenos y que cargas bacterianas de microorganismos alterantes no patógenos del orden de 10^5 a 10^6 bacterias/g de carne, representaban un riesgo menor que cargas de 10^3 bacterias/g.

Tabla 1.3
Criterios de composición de la carne picada

Carne elaborada por establecimientos de venta al menor (Orden 14/86)			
Parámetro	Especie		
	Vacuno	Ovino	Porcino
Relación humedad/ proteína (máximo)	3,7	3,9	3,8
Grasa (mínimo)	20 %	24 %	24 %
Hidroxiprolina (máximo)	0,32 %	0,32 %	0,32 %

Carne elaborada por industrias cárnicas (Real Decreto 1916/1997)				
Parámetro	Carne picada			
	Magra	De vacuno	Que contenga cerdo	De otras especies
Porcentaje de materia grasa	≤ 7	≤ 20	≤ 30	≤ 25
Relación colágeno/proteína de carne	≤ 12	≤ 15	≤ 18	≤ 15

Fuente: Orden de 14 de enero de 1986 (BOE nº 18 de 21 de enero). Real Decreto 1916/1997 de 19 de diciembre (BOE nº 11 de 13 de enero de 1998).

Gram (1993) comprobó el efecto antibacteriano de algunas cepas de pseudomonas aisladas de productos de la pesca congelados. En este sentido, las bacterias lácticas, son las más comúnmente utilizadas como flora competitiva en los productos cárnicos. Abdel-Bar y Harris (1984) indicaron que *Lactobacillus bulgaricus* a niveles de 10^4 a 10^6 /g tenían un efecto inhibitor frente a microorganismos patógenos en carne picada.

El posible problema de la utilización de bacterias lácticas como cultivos protectores es la generación de sabores ácidos en la carne y otros alimentos. En un trabajo realizado por Yi-mei Sun y Ockerman (2001), se estudiaron las interacciones entre *Pseudomonas fluorescens*, como representante de la microbiota alterante, y *E. coli* no patógeno, como representante de contaminación fecal, inoculados sobre carne picada

estéril. Se comprobó que *P. fluorescens* manifestaba cierta actividad limitadora del crecimiento de *E. coli*.

Entre la microbiota contaminante también se pueden citar efectos sinérgicos, así Marshall y col. (1992) han demostrado que la presencia y desarrollo de *Pseudomonas fluorescens* potencia la multiplicación de *Listeria monocytogenes*, lo que puede deberse a la liberación de péptidos fácilmente metabolizables por el patógeno, provocada por la reconocida capacidad proteolítica de las pseudomonas.

Aunque la carne picada envasada de forma centralizada en la industria puede tener cargas microbianas menores que la preparada en las tiendas minoristas, el tiempo transcurrido entre el picado y la venta tiene más influencia en la calidad microbiológica que la carga inicial (Kraft 1992), por lo tanto, además de la vigilancia en origen, resulta muy recomendable un buen control en el comercio minorista.

La alteración de la carne picada se produce de forma similar a la de la carne en piezas. Sin embargo, en este caso, todo el sustrato se encuentra disponible para los microorganismos y estos están distribuidos homogéneamente en toda la masa cárnica. La fácil disponibilidad del sustrato y el efecto de disolución del picado, conlleva que las bacterias alcancen densidades superiores por gramo de carne picada, que por cm² de superficie cárnica, antes de que la alteración de la carne sea evidente (Gill 1983).

El-Leithy y Rashad (1989), en un estudio microbiológico de la carne picada y de productos elaborados a partir de la misma, indicaron, aunque resulte sorprendente, que ninguna de las muestras en las que se obtuvieron recuentos de microorganismos psicrotrofos de 10⁷/g e incluso de 10⁸/g, presentaba malos olores ni signos de alteración. En este mismo trabajo se detectó la presencia de lactobacilos, enterobacteriaceas y enterococos en todas las muestras analizadas aunque en proporciones no muy elevadas respecto a la microbiota total.

Casos como el expuesto en el párrafo anterior, en el que se demuestra que en ocasiones los sentidos no son lo suficientemente eficaces para detectar cargas

bacterianas elevadas, ponen de manifiesto la necesidad de técnicas rápidas para estimar la alteración de la carne en sus primeras fases.

Si la carne picada se envasa en paquetes muy apretados, las partículas, al juntarse estrechamente, dificultan el acceso del oxígeno al interior de la masa e impiden el crecimiento de los microorganismos aerobios en el interior, favoreciendo el de los anaerobios. No obstante, el tiempo en el que aparecen signos de alteración resulta similar tanto en carnes empaquetadas de forma “apretada”, como “holgada” (Gill 1986).

Von Holy y Holzapfel (1988) estudiaron la microbiota alterante de la carne picada en diferentes condiciones de almacenamiento. Observaron que, entre las bacterias gram negativas, las pseudomonas fueron las predominantes (63 %) y el resto perteneció, prácticamente, al grupo de enterobacterias. Entre las gram positivas, los lactobacilos supusieron un 45 %. También obtuvieron un 28 % de aislamientos de levaduras. Informaron que las pseudomonas crecieron incluso en las muestras envasadas al vacío y los lactobacilos aparecieron en un número significativo en todas las muestras, incluso en las almacenadas en aerobiosis.

Shewanella putrefaciens no se considera uno de los principales microorganismos alterante de la carne picada conservada en aerobiosis; aun así, Parker y Levin (1983), observaron que el 100 % de los 65 aislamientos obtenidos a partir de carne picada de cepas productoras de sulfuro de hidrógeno, se correspondía con *Shewanella putrefaciens*.

1.1.3.a. Carne picada adicionada de proteína de soja.

A la carne picada se le adiciona en ocasiones proteína de soja para la elaboración de hamburguesas y otros productos cárnicos (Morris y col. 1987, El-Leithy y Rashad 1989, Abdel-Aziz y col. 1997). Esta adición afecta a la microbiota de la carne y puede influir en el acortamiento de la vida útil del producto.

Harrison y col. (1981) observaron que el crecimiento de las bacterias psicrotrofas y mesófilas, después de 6 días a 4 °C, fue mayor en las muestras adicionadas de soja que

en las que no se añadió esta proteína. Draughon y col. (1982) también observaron que al comparar las cargas de microorganismos psicrotrofos en carne picada con y sin adición de soja, conservada a 0 y 6 °C, los recuentos de las muestras adicionadas fueron significativamente superiores a los de las no enriquecidas en soja. Igualmente, las bacterias lácticas crecieron mejor en carne picada adicionada de soja que en la no adicionada (Bell y Shelef 1978).

Los resultados de diferentes trabajos indican que existe una relación cuantitativa, de tal forma que las muestras adicionadas con porcentajes superiores de soja, se alteran proporcionalmente más pronto que las que contienen porcentajes menores (Craven y Mercuri 1977, Draughon y col 1982). Así, tras 8 días a 4 °C, se realizaron recuentos en muestras de carne picada de vacuno y pollo a las que se les adicionó cantidades del 10 y del 30 % de concentrado de soja, obteniéndose recuentos significativamente mayores en las muestras adicionadas con un 30 % que en las adicionadas con un 10 % (Craven y Mercuri 1977).

La proteína de soja puede actuar protegiendo a los microorganismos de la acción del frío, especialmente en la congelación y proporcionando nutrientes adicionales (Kraft 1992). Aunque algunos trabajos como los de Foster y col. (1978), contrariamente a lo expuesto, concluyen que la adición de soja no influye en la carga bacteriana de la carne picada, la mayoría indica que ésta estimula el crecimiento bacteriano y hace que el producto se altere con más facilidad.

De forma general se ha observado que el picado de la carne provoca un acortamiento de su vida útil. Este es un hecho incuestionable que, por sí solo, justifica la puesta a punto de técnicas que estimen de forma rápida su carga microbiana. Las técnicas rápidas son convenientes para cualquier producto, pero resultan imprescindibles para los alimentos con vidas útiles más cortas. Si no se dispusiera de ellas, se podría librar a la venta productos de dudosa calidad o retener hasta su alteración alimentos que, en el momento de la toma de muestras, eran perfectamente comercializables.

1. 2. AMINOPEPTIDASAS DE ORIGEN BACTERIANO

1.2.1. NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN

Los términos “proteínasa” (endopeptidasa) y “proteasa” se utilizan a menudo de forma indistinta; sin embargo, se considera que proteínasa es más específico que proteasa (McDonald 1985), ya que el término proteasa abarca tanto las endo como las exoenzimas, mientras que el término proteínasa se refiere a las endopeptidasas que catalizan principalmente la hidrólisis de las uniones internas de péptidos y que, además, son muy activas frente a proteínas de gran tamaño (Barret 1980). El término “proteasa”, pues, incluye, además de otras enzimas proteolíticas (p.e. peptidasas, aminopeptidasas, carboxipeptidasas, etc.), a las proteínasas.

Las exopeptidasas hidrolizan solamente los enlaces peptídicos que se encuentran al final de la cadena peptídica porque generalmente requieren un grupo α -amino o α -carboxilo no sustituido. Las bacterias suelen poseer exopeptidasas intracelulares o ligadas a la membrana celular (McKellar 1989).

El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, en su *Nomenclatura Enzimática*, publicada en 1992, y ampliada con 5 suplementos posteriores (véase la referencia bibliográfica Nomenclature Comité of ...), contempla dentro de la clase 3 (hidrolasas), la subclase 3.4 (peptidasas). A su vez, dentro de las peptidasas distingue 14 tipos de enzimas entre las que cabe destacar las aminopeptidasas (EC 3.4.11) y algunas endopeptidasas como las metaloendopeptidasas (EC 3.4.24) que son las más frecuentes en los microorganismos alterantes de la carne (McKellar 1989).

1.2.2. AMINOPEPTIDASAS EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.

Los trabajos científicos en los que se hace referencia a la presencia de enzimas aminopeptidásicas en distintas especies bacterianas son muy abundantes. Ya en 1975 Lazdunski y col. estudiaron una enzima capaz de hidrolizar la l-alanina-p-nitroanilida

detectada en varias cepas de *Escherichia coli*. Los estudios de la especificidad por determinados sustratos indicaron que se trataba de una aminoendopeptidasa, ya que mostraba actividad tanto aminopeptidásica como endopeptidásica (Lazdunski y col. 1975a). Posteriormente, Wingfield y col. (1989) aislaron y purificaron a partir de *Escherichia coli* y de *Salmonella typhimurium* una aminopeptidasa específica para la metionina, denominada peptidasa M, cuya actividad se ve estimulada por iones Co^{2+} .

La actividad l-alanina-aminopeptidasa se ha detectado principalmente en las bacterias gram negativas; esta actividad puede ponerse de manifiesto utilizando como sustrato la l-alanina-4-nitroanilida (Cerny 1972, 1976, 1978, Teuber y Cerny 1973, Murgier y col. 1976). Esta propiedad de las gram negativas se utilizó en un principio para el desarrollo de pruebas capaces de diferenciar estas bacterias de las gram positivas (Costin y col., 1983; Otte y Tolle, 1980).

En *Pseudomona aeruginosa* se ha aislado una aminopeptidasa con un peso molecular de 28.000 daltons, con un pH óptimo de actuación de 8,5 sobre un sustrato de leucina-p-nitroanilida. Es una enzima dependiente del zinc, ya que su actividad queda inhibida por los quelantes del zinc. Mediante secuenciación de los primeros 20 residuos y comparación con otras proteínas, se ha comprobado que presenta diferentes porcentajes de similitud con aminopeptidasas de otras especies como *Streptomyces griseus*, *Bacillus subtilis*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Aeromonas caviae*, *Vibrio proteoliticus* y *Vibrio cholerae*, por lo que se estima que pueden pertenecer todas ellas a la familia M28 de metaloproteinasas (Cahan y col. 2001).

Son bastantes las referencias bibliográficas acerca de metaloproteinasas en *Pseudomonas aeruginosa*. Así, Bayouth y col. (2000) purificaron y aislaron, en la cepa MN1 de esta especie, una proteinasa alcalina de 32.000 daltons cuya actividad se veía fuertemente inhibida por el EDTA, así como por iones Zn^{2+} , Cu^{2+} y Hg^{2+} y parcialmente inhibida por Ca^{2+} y Mn^{2+} . En la cepa CCRC 15541 también se ha aislado una metaloproteinasas neutra que presenta una actividad máxima a 60 °C y pH 7,0, capaz de conservar un 85 % de su actividad tras una hora de incubación a 60 °C e, igualmente, se ve fuertemente inhibida por la acción del EDTA (Lu y Chang 1996). Es de reseñar que, de forma general, las proteinasas procedentes de *Pseudomonas* spp., junto con las de

Aeromonas hydrophila y *Serratia marcescens*, se encuentran entre las más estables al calor (Braun y col. 1998).

Lundy y col. (1996) estudiaron mediante *immunobloting*, la reactividad cruzada de los patrones de anticuerpos de la proteinasa de *Pseudomonas fluorescens* con las proteínas extracelulares producidas por diferentes pseudomonas asociadas con la alteración de la carne, entre las que se incluyeron *Pseudomonas fragi* y *Ps. ludensis*. Los resultados mostraron la existencia de reactividad cruzada en diferente grado, lo que indica la presencia común de determinantes antigénicos entre las enzimas proteolíticas de las pseudomonas alterantes de la carne.

También se han estudiado las aminopeptidasas y otras proteasas de las pseudomonas que más habitualmente se aíslan de carne alterada. Así la *Pseudomonas putida* ATCC 12633, produce una L-aminopeptidasa que se activa fuertemente por los cationes divalentes y que presenta una gran especificidad por sustratos tales como las amidas de dipéptidos y alfa-4-aminoácidos (Hermes y col. 1993). *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 posee unas vesículas extracelulares que presentan una marcada actividad proteolítica y que pueden jugar un papel importante en la distribución fisiológica de las proteinasas extracelulares (Myhara y col. 1990). Estudios realizados por este mismo autor verificaron que las condiciones óptimas de cultivo para la producción de proteasas en esta especie son: 12,5 °C, un pH inicial de 6,8, 314 mM de nitrógeno orgánico (glutamina), y 7,42 ppm de O₂ disuelto en el medio (Myhara y Skura 1990). Otros autores como Blair y McDowell (1995), utilizando técnicas inmunológicas de ELISA sandwich, han puesto de manifiesto también la presencia de proteasas en *Pseudomonas fragi*

Murgier y col. (1976) compararon la movilidad electroforética de las aminoendopeptidasas aisladas de diferentes bacterias gram negativas y comprobaron que todos los R_f, como muestra la tabla 1.4, eran muy similares; esto, junto con su inmunorreactividad cruzada, indica una gran similitud entre estas enzimas homólogas.

Tabla 1.4
Comparación de la movilidad electroforética de aminoendopeptidasas de bacterias gram negativas.

Especie	Rf (1)
<i>E. coli K10</i>	0,59
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,59
<i>Proteus mirabilis</i>	0,56
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	0,60
<i>Aerobacter aerogenes</i>	0,61
<i>Serratia marcescens</i>	0,55

(1) Valor calculado como la relación entre la distancia recorrida por la banda del enzima y el recorrido total del frente.

Fuente: Murgier (1976)

1.2.3. AMINOPEPTIDASAS EN BACTERIAS GRAM POSITIVAS

Entre las bacterias lácticas productoras de aminoendopeptidasas se puede citar a *Lactobacillus helveticus* CNRZ32, que produce una aminoendopeptidasa con una actividad máxima a 45 °C y pH 6,5, capaz de hidrolizar una gran variedad de sustratos derivados de la p-nitroanilida (Fernández de Palencia y col. 2000).

La cepa LHE-511 de esta misma especie produce, por una parte, una prolil aminoendopeptidasa activa en un intervalo de pH de 4,5 a 6, con una temperatura óptima de actuación de 35 °C, y una aminoendopeptidasa de estructura monomérica (92.000 daltons de peso molecular) ligada a la superficie, cuyas condiciones óptimas de actividad son pH 7,0 y 37 °C y que se inhibe por la acción de agentes quelantes (Miyakawa y col. 1992, 1995).

Se ha aislado en *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* una aminoendopeptidasa con un peso molecular de 98.000 daltons, que presenta una actividad máxima, a pH 6,0 y 40 °C, sobre la L-lisina-4-nitroanilida (Tsakalidou y col. 1993). En este mismo trabajo también se aisló una aminoendopeptidasa en *Streptococcus thermophilus*, con un peso molecular de 89.000 daltons y una actividad máxima a pH 6,5 y 35 °C sobre el mismo sustrato.

Otras bacterias gram positivas en las que se ha puesto de manifiesto la presencia de aminopeptidasas son: *Lactococcus lactis* (Van Alen-Boerrigter y col. 1991, Garde y col. 2002), *Bacillus cereus* (Fricke y Aurich 1993), *Micrococcus* spp. (Marth 1989) o algunas cepas de estreptococos (Cowman y Baron 1993).

A continuación, en la tabla 1.5 se relacionan una serie de bacterias, tanto gram negativas como gram positivas, en las que se han aislado aminopeptidasas.

Tabla 1.5
Relación de bacterias en las que se han aislado aminopeptidasas.

Bacterias Gram negativas:

<i>Escherichia coli</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Escherichia adecarboxylata</i>	<i>Serratia fonticola</i>
<i>Shigella sonnei</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Salmonella</i> sp.	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas putida</i> (1)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Pseudomonas fragi</i> (2)
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas acidovorans</i>
<i>Enterobacter sakazaki</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Erwinia diversus</i>	<i>Yersinia intermedia</i>
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i> (8)

Bacterias Gram positivas:

<i>Bacillus cereus</i>	<i>Streptococcus mutans</i> (5)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus cricetus</i> (5)
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i> (5)
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i> (6)
<i>Lactococcus lactis</i> (3)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (7)
<i>Streptococcus thermophilus</i> (4)	

Fuente: Manafí y Kneifel 1990, (1) Hermes y col. 1993, (2) Harmayani y col. 1991, (3) Garde y col. 2002, (4) Tsakalidou y col. 1998, (5) Cowman y Baron 1993, (6) Fernández de Palencia y col. 2000, (7) Tsakalidou y col. 1993, (8) Odagami y col. 1994

1.2.4. LOCALIZACIÓN DE LAS AMINOPEPTIDASAS.

La localización de las enzimas en la célula resulta fundamental, ya que, en ocasiones, condiciona la actividad enzimática y explica el comportamiento de las bacterias frente al sustrato propio de la enzima.

En este sentido, es importante recordar la diferente composición de la pared celular de las bacterias gram positivas y gram negativas. Así, la envoltura de las bacterias gram positivas consta de dos capas: la membrana citoplásmica, en contacto con el citosol, y exteriormente una capa de peptidoglicano o mureína que consta de varias capas (hasta 50), constituyendo una gruesa red tridimensional. Sin embargo, en el caso de las gram negativas, la cubierta bacteriana consta de tres capas: la membrana citoplásmica, una capa fina de peptidoglicano (de 1 nm de espesor y con poros) y una membrana externa con estructura de bicapa lipídica exclusiva de estas bacterias. Entre la membrana externa y la citoplásmica, existe un compartimento acuoso bañando la capa de peptidoglicano denominado periplasma o espacio periplásmico. Este gel periplásmico es una solución densa abundante en macromoléculas (Oliver 1997). Las peptidasas periplásmicas pueden degradar los péptidos presentes en el medio externo (Fricke y Aurich 1993).

Lazdunski y col. (1975) fueron los primeros en sugerir una localización periplásmica de la aminopeptidasa N descrita en *E. coli*. No obstante, con posterioridad le asignaron, al igual que otros autores, una localización citoplásmica (Oliver 1997, Lazdunski 1989). Con la intención de aclarar la localización de determinadas enzimas en las bacterias, Fricke y Aurich (1993) realizaron un interesante trabajo en el que comprobaron la actividad aminopeptidásica de diferentes fracciones obtenidas mediante shock osmótico y rotura mecánica en *Acinetobacter calcoaceticus* y *Pseudomonas aeruginosa* (como representantes de las bacterias gram negativas), y mediante rotura mecánica en *Bacillus cereus* (como representante de las bacterias gram positivas). Los resultados que obtuvieron se resumen en la tabla 1.6. Estos autores demostraron que las enzimas aminopeptidásicas en las bacterias gram negativas se encontraban sobre todo en el espacio periplásmico, mientras que en las gram positivas se encontraban en el citosol. Además, la actividad aminopeptidásica de *B. cereus* resultó ser de 3 a 7 veces menor que

la de *P. aeruginosa* y *A. calcoaceticus*. La enzima málica, que se localiza exclusivamente en el citosol, servía como control para comprobar que no había contaminación del periplasma por parte de las enzimas citosólicas.

Esta diferente localización enzimática explica por qué las bacterias gram positivas productoras de aminopeptidasas, como *B. cereus*, no hidrolizan sustratos extracelulares como la alanina-7-metilcumarina o la alanina-p-nitroanilida.

Tabla 1.6
Distribución de las actividades aminopeptidásicas (%) para el ataque a diferentes sustratos, en diferentes fracciones de bacterias gram negativas y gram positivas.

Bacterias gram negativas: <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
Enzima / sustrato	Sobrenadante de sacarosa			Sobrenadante del lavado de membranas	Membranas lavadas
	del shock osmótico	Periplasma	Citosol		
Enzima málica	--	0,3	98,4	0,7	0.6
Glutámico-p-nitroanilida	17,9	73,4	6,1	0,5	2.1
Alanina- p-nitroanilida	3,8	93,4	1,3	0.3	1.2
Leucina- p-nitroanilida	1,0	88,4	6,9	0.2	1.2
Lisina-p-nitroanilida	--	95,8	3,8	0.1	0.3
Prolina- p-nitroanilida	--	92,8	6,7	0.3	0.6
Bacterias gram positivas: <i>Bacillus cereus</i>					
	Membranas lavadas		Compuestos solubles (citosol y sobrenadantes de lavado)		
Alanina- p-nitroanilida	--		100		

NOTA: Se considera actividad aminopeptidásica periplásmica la suma de los porcentajes de los apartados periplasma más la del sobrenadante de sacarosa del shock osmótico.

Fuente: Fricke y Aurich 1993)

Jensch y Fricke (1997) en estudios posteriores, inciden en la importancia que tiene la utilización de diferentes métodos para extraer el periplasma y no confiar todo el estudio de localización a un solo método de liberación del mismo. En este estudio confirmaron la localización periplásmica de la alanina aminopeptidasa en *Ps. aeruginosa* y descartaron esta localización para la leucina aminopeptidasa; en realidad, esta enzima se localiza en el citosol cerca de la membrana citoplásmica y por esta proximidad pasa al periplasma por la acción del shock osmótico.

En algunos casos, surgen dudas sobre la localización de una enzima como es el caso de la aminopeptidasa N descrita por Lazdunski y col (1975) en la cepa K-10 de *E. coli*. Trabajando con esta cepa, mediante el shock osmótico sólo se liberaron parcialmente las aminopeptidasas del periplasma. Otras cepas, incluso, son resistentes al tratamiento. Esto se debe a que en algunas especies, algunas aminopeptidasas se encuentran fuertemente unidas a la parte exterior de la superficie de la membrana citoplásmica (Jensch y Fricke 1997).

1.2.5. APLICACIONES DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA BACTERIANA

La capacidad de diversas bacterias para producir aminopeptidasas y otras proteasas, se utiliza de forma habitual con fines industriales, como por ejemplo, en la desproteínización de subproductos de la pesca (San Lang Wang y San Hwa Chio, 1998, Yi Su Oh y col. 2000), en la síntesis de edulcorantes artificiales (Lu y Chang 1996), en el desarrollo de aroma en el cacao (Voigt y col. 1994) o en la hidrólisis de mezclas racémicas de amidas de D,L-aminoácidos (Hermes y col. 1993). Raksakulthai y Haard (2003), en un artículo publicado recientemente, han realizado una revisión sobre la aplicación de las exopeptidasas para la reducción de sabores amargos en alimentos.

La actividad aminopeptidásica de las bacterias gram negativas, responsables mayoritarias de la alteración de la carne en refrigeración, también ha servido de base para el desarrollo de pruebas analíticas que intentan reemplazar los métodos tradicionales de recuento en placa y que permiten estimar de forma rápida la calidad higiénica de determinadas materias primas (Pérez de Castro 1988, Greer 1989, Alvarado y col. 1992, Dainty 1996). En estos trabajos se han utilizado diferentes sustratos cromogénicos y fluorogénicos para evaluar la actividad aminopeptidásica y/o endopeptidásica bacteriana.

1.2.6. SUSTRATOS PARA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA

Los sustratos cromogénicos que se utilizan con más frecuencia para la evaluación de la actividad aminopeptidásica son los derivados de la p-nitroanilida (pNA), bien sean aminoácidos bien dipéptidos. Los sustratos fluorogénicos están representados por

aminoácidos, dipéptidos o tripéptidos derivados de la 7-amino-4-metilcumarina (AMC). Para la determinación de la actividad endopeptidásica se usan diferentes oligopéptidos derivados de la AMC (Murgier y col. 1976, Manafi y Kneifel 1990, Tsakalidou y col. 1993, Nongporn y col. 1999, Stepaniak 2000).

Stepaniak (2000) comparó la eficacia de diferentes sustratos y calculó los límites de detección microbiana con cada uno de ellos, como se muestra en la tabla 1.7.

Tabla 1. 7
Límites teóricos de detección microbiana con distintos
sustratos cromogénicos y fluorogénicos.

SUSTRATO	LIMITE DE DETECCIÓN (Log ufc/cm ²)
Sustratos cromogénicos:	
Alanina-pNA	2,83
Leucina-pNA	3,59
Prolina-pNA	5,72
Glicina-Prolina-pNA	5,70
Sustratos fluorogénicos:	
Alanina-AMC	2,71
Leucina-AMC	2,45
Glicina-Prolina-AMC	5,43
Lisina-Alanina-AMC	4,67
D-Alanina-Leucina-Lisina-AMC	6,60
Succínico-Alanina-Alanina-Fenilalanina-AMC	5,50
Succínico-Glicina-Prolina-Leucina-Glicina-Prolina-AMC	3,55

Fuente: Stepaniak 2000.

En este caso, el límite de detección, se definió como el logaritmo de las ufc/cm² de carne asociadas a una lectura de fluorescencia de 1, o a una lectura de absorbancia de 0,001; lecturas correspondientes con los valores más bajos generados por el espectrofotómetro de fluorescencia y el de ultravioleta-visible respectivamente.

1.2.7. BIOSÍNTESIS Y REGULACIÓN DE ENZIMAS AMINOPEPTIDÁSICAS

Algunos trabajos, como el realizado por Murgier y col. (1976), demuestran que la regulación de la biosíntesis de estas enzimas se encuentra condicionada por los niveles de fosfatos inorgánicos disponibles en el medio. Estos autores comprobaron que la actividad aminopeptidásica de *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis* y *Aerobacter aerogenes* aumentaba de forma ligera y progresiva conforme disminuía el nivel de fosfatos disponibles en el medio. Una vez llegado un punto en el que los fosfatos disponibles se agotaban, se produjo una desinhibición de la biosíntesis de la enzima, multiplicándose por ocho la actividad aminopeptidásica medida mediante hidrólisis de l-alanina-p-nitroanilida (Murgier 1976).

También se ha comprobado que el tripolifosfato sódico en bajas concentraciones producía una inhibición de la actividad proteolítica de *Aeromonas hydrophila* sin que se inhibiera el crecimiento de esta bacteria (Venugopal y col. 1984).

El hexametáfosfato sódico, a concentraciones del 0,3 %, puede inhibir la actividad aminopeptidásica de *Pseudomonas fragi*, mientras que otros fosfatos, como el pirofosfato ácido de sodio, el tripolifosfato sódico o el pirofosfato tetrasódico, también reducen la actividad aminopeptidásica, pero en un grado menor. El hexametáfosfato sódico puede producir una inhibición total de la actividad aminopeptidásica durante 5 días de almacenamiento a 5 °C (Harmayani y col. 1991).

La inhibición de la actividad aminopeptidásica producida por los fosfatos se encuentra en estrecha relación con la capacidad de estos de inhibir el crecimiento bacteriano. Así, el hexametil fosfato sódico, además de inhibir la actividad aminopeptidásica, ralentiza el crecimiento de *Pseudomonas fragi*. Sin embargo, el tripolifosfato sódico que reduce la actividad aminopeptidásica de esta misma bacteria, no puede inhibir su crecimiento (Harmayani y col. 1991). Algo similar comprobaron Venugopal y col. (1984). Estos autores observaron que el tripolifosfato sódico inhibía la secreción de proteasas de *Aeromona hydrophila* a concentraciones de 0,5 mg/ml, mientras que para inhibir el crecimiento, eran necesarias concentraciones más elevadas.

Se ha propuesto hace tiempo la acción quelante de los fosfatos como la responsable de la inhibición del crecimiento microbiano tanto *in vitro*, como en productos alimentarios (Post y col. 1963, Garibaldi y col. 1969). Algunos estudios han sugerido que el hexametil polifosfato interfiere en el metabolismo de los cationes divalentes, probablemente el Mg^{2+} , produciendo la inhibición de la división celular y la pérdida de la integridad de la pared bacteriana (Miyamoto y col. 1988, Harmayani y col. 1991).

Otras sustancias que actúan como inhibidoras de la actividad aminopeptidásica son el lactato y el alginato sódico y el lactato cálcico. El primero de ellos, a concentraciones del 3-4 %, presenta un efecto inhibitor, tanto del crecimiento como de la actividad aminopeptidásica de *Pseudomonas fragi*. Los otros dos, disminuyen ligeramente esta actividad en *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas fragi*, pero sin tener efectos en el crecimiento (Harmayani y col. 1991a). La bestatina y la amastatina, aisladas a partir de *Streptomyces*, también son inhibidoras de las aminopeptidasas (McKellar 1989).

La producción de aminopeptidasas no es constante en todas las fases del crecimiento bacteriano, de forma que la síntesis de proteasas por parte de las bacterias psicrotrofas aumenta en la última parte de la fase exponencial (Coleman y col. 1975). Este hecho fue confirmado por Myhara y Skura (1989), quienes comprobaron que la producción de enzimas proteolíticas por parte de *Pseudomona fragi*, comienza entre el final de la fase de crecimiento exponencial y el principio de la fase estacionaria.

En lo referente a la evolución de la microbiota en los productos cárnicos, se puede afirmar que existe una correlación entre la secreción de proteasas y el crecimiento bacteriano, así como, con la alteración que se produce en los mismos (Venugopal 1990).

1. 3. AMINOPEPTIDASAS DE ORIGEN CÁRNICO

Quizás sean las células epiteliales intestinales las más ricas en peptidasas, ya que estas enzimas son necesarias para un correcto aprovechamiento de las proteínas. No obstante, en otros muchos tejidos, incluido el muscular, también pueden encontrarse estas enzimas (Ledeme y col. 1983, Taylor y col. 1984, Lalu y col. 1986, Gal-Garber y Uni 2000). Muchos autores han puesto de manifiesto aminopeptidasas tanto en el músculo esquelético humano, como en el de distintas especies animales (McDonald y Barret 1986, Lauffart y Mantle 1988, Toldrá y col. 1992, 1992-a, Flores y col. 1998 y 2000). La presencia de estas enzimas en el músculo favorece la producción de aminoácidos libres desde el mismo momento del sacrificio (Nishimura y col. 1988a). Recuérdese la importancia de estas sustancias en el desarrollo del sabor de la carne. Además, estas enzimas juegan un papel clave en la degradación de las proteínas miofibrilares (Penny 1980, Etherington 1984, Asghar y Bhatti 1987). La acción de las aminopeptidasas influye en el ablandamiento de la carne, junto con otros factores, tales como los niveles de enzimas glicolíticas, la relación entre los niveles de ATP y ATPasas (Miller y col. 1991), la acción de radicales libres sobre las proteínas y los lípidos musculares (Kanner y col. 1994) o la especie animal (Blanchard y Mantle 1996). Greaser y Fritz (1995) describieron detalladamente la relación existente entre el ablandamiento de la carne y los niveles de algunas proteínas miofibrilares clave, resultando que la proteólisis de la actina y de la miosina no tenía una especial trascendencia en el proceso de ablandamiento de la carne almacenada en refrigeración.

Las aminopeptidasas, así como otras peptidasas de las células musculares, se localizan en el citoplasma y en los lisosomas. Normalmente, para el aislamiento y estudio de estas enzimas se procede, en primer lugar, al picado de la carne y después a la extracción de las enzimas mediante una homogeneización con la ayuda de tampones. Para extraer de las enzimas citoplasmáticas, Blanchard y Mantle (1996) utilizaron un reactivo compuesto por tampón Tris/acetato 50 mM pH 7,5 a una temperatura de 37°C, junto con ditioneitol 1 mM, NaCl 0,15 mM y NaN₃ 3 mM. Para la extracción de las enzimas lisosomales, sustituyeron en el reactivo anterior, el tampón Tris/acetato 50 mM, por tampón ácido acético/acetato 50 mM ajustando el pH a 5,5, ya que la extracción de las enzimas lisosomales con el primero les hacía perder la actividad rápidamente.

Nishimura y col. (1990), determinaron la actividad aminopeptidásica de extractos de músculo *Longissimus dorsi* de las especies porcina y bovina después de uno y cuatro días de sacrificado el animal, respectivamente, así como de músculo pectoral superficial de pollo extraído inmediatamente tras el sacrificio. Los sustratos utilizados fueron β -naftilamidas de diferentes aminoácidos. Estos son unos sustratos cromogénicos que, una vez hidrolizados, generan β -naftilamina, de color rojo, cuya concentración puede medirse espectrofotométricamente a 540 nm.

Tabla 1. 8
Hidrólisis de aminoácidos- β -naftilamidas (aa-na) por extractos de músculo porcino, de pollo y bovino.

SUSTRATO	Actividad aminopeptidásica $\mu\text{mol } \beta\text{-naftilamina / hora / 0,2 ml } ^*$		
	<i>Porcino</i>	<i>Pollo</i>	<i>Bovino</i>
Serina- β -naftilamida.	0,87	1.14	0.51
Glutámico- β -naftilamida.	0.44	0.64	0.18
Prolina- β -naftilamida.	0.87	1.14	0.65
Glicina- β -naftilamida.	0.02	0.03	0.02
Alanina- β-naftilamida.	6.39	7.03	5.04
Valina- β -naftilamida.	0.14	0.17	0.12
Metionina- β -naftilamida.	3.83	3.56	2.57
Leucina- β -naftilamida.	2.81	2.71	2.12
Lisina- β -naftilamida.	5.36	5.78	3.81
Actividad total	20,73	22,21	15,02

* 0,2 ml de extracto corresponden a 0,05 g de músculo.

Fuente: Nishimura y col. 1990

Como puede verse en el resumen de resultados expuestos en la tabla 1.8, el músculo de pollo presenta los mayores niveles de actividad aminopeptidásica, seguido del porcino y del bovino. También se observa que la alanina- β -naftilamida fue el sustrato que generó la máxima actividad aminopeptidásica.

En el trabajo realizado por Blanchard y Mantle en 1996, al que ya se ha hecho referencia anteriormente, se estudiaron los niveles de enzimas proteolíticas, inmediatamente después del sacrificio, presentes en el músculo *Longissimus dorsi* del cerdo, cordero y conejo, así como en el músculo pectoral y muslo de pollo. Las enzimas estudiadas y sus actividades se exponen en la tabla 1.9.

Tabla 1. 9
Variación de la actividad proteásica en el músculo de diferentes especies.

TIPO DE ENZIMA	Actividad enzimática				
	nmol / hora / mg de proteína soluble en sobrenadante				
	<i>Pollo</i> (muslo)	<i>Pollo</i> (músculo pectoral)	<i>Cordero</i> (<i>Longissimus</i> <i>dorsi</i>)	<i>Cerdo</i> (<i>Longissimus</i> <i>dorsi</i>)	<i>Conejo</i> (<i>Longissimus</i> <i>dorsi</i>)
CITOPLASMÁTICAS:					
Alanil aminopeptidasa	224	171	144	112	182
Arginil aminopeptidasa	238	207	206	149	177
Leucil aminopeptidasa	24.2	19.7	13.7	20.1	14.8
Piroglutamil aminopeptidasa	3.84	3.38	4.25	4.08	3.82
Dipeptidil aminopeptidasa III	0.622	0.523	0.284	0.476	0.62
Dipeptidil aminopeptidasa IV	44.4	32.7	13.6	20.4	24
Tripeptidil aminopeptidasa	38.5	36.4	20.8	17.5	27.3
LISOSOMALES:					
Dipeptidil aminopeptidasa I	109	94.8	57.8	65.8	22.2
Dipeptidil aminopeptidasa II	56.2	47.1	38.1	25.5	62.4

Fuente: Blanchard y Mantle 1996

Es de reseñar que la actividad enzimática se determinó frente a sustratos fluorogénicos, que aunque no son sustratos fisiológicos, presentan la ventaja de discriminar entre las actividades de distintos tipos de proteasas. Como se puede apreciar en la tabla, el músculo de pollo, especialmente el procedente del muslo, presenta los mayores niveles de aminopeptidasas, lo que concuerda con los resultados de Nishimura y col. (1990). Asimismo, los niveles de aminopeptidasas en la especie bovina ofrecidos en los dos trabajos que se están discutiendo fueron similares. La carne de conejo, de cordero y de cerdo siguen, por este orden, a la de pollo en los niveles de aminopeptidasas. Blanchard y Mantle (1996) pretendían, por otra parte, establecer la

relación entre la velocidad de ablandamiento y los niveles de proteasas, no quedando demostrada de forma clara la relación entre ambos factores.

En los extractos de músculo esquelético bovino se encuentran al menos cuatro tipos de aminopeptidasas distintas. En el caso de los extractos de músculo porcino y de pollo se encuentran hasta seis tipos distintos de estas enzimas, siendo las más comunes en todas las especies las aminopeptidasas B y C. En el músculo esquelético del conejo, las aminopeptidasas C y H son las que más contribuyen a la formación de aminoácidos libres durante el almacenamiento (Nishimura y col. 1988). Estas aminopeptidasas son las que presentan la mayor capacidad de hidrólisis pudiendo degradar la mayor parte de los sustratos (Nishimura y col. 1990).

Debido al papel que pueden jugar las aminopeptidasas de origen cárnico como interferencias en la prueba que se pretende desarrollar se describirán a continuación las características de algunas de estas aminopeptidasas aisladas de diferentes especies.

La aminopeptidasa H, purificada del músculo esquelético bovino, migra como una banda única en la electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil-sulfato (SDS-PAGE). Su peso molecular es de 52.000 y presenta una actividad óptima a pH 7,5, hidrolizando la L-leucina-2-naftilamida. Su actividad se ve fuertemente inhibida por el ácido monoiodoacético y la leupeptina, mientras que el tetra-acetato de etilendiamina (EDTA), la pepstatina o el fluoruro de metilmetano sulfonilo no le afectan en absoluto (Nishimura y col. 1994).

Nishimura y col. (1991) aislaron y estudiaron diversas aminopeptidasas, entre ellas una aminopeptidasa B, extraída a partir de músculo esquelético porcino. Esta enzima se caracteriza por presentar una actividad máxima sobre las uniones arginina-aminoacil a pH 6,5 y 37 °C. Esta aminopeptidasa es muy estable a valores de pH por encima de 6 y temperaturas inferiores a 35 °C, inactivándose rápidamente a pH 5 y temperaturas de 50-65 °C. La bestatina, a una concentración de 50µM inhibe completamente a la enzima, mientras que el EDTA 5µM inhibe solamente el 40% de su actividad (Flores y col. 1993). Además de esta aminopeptidasa B, Nishimura y col. (1991) aislaron y purificaron, también a partir de músculo esquelético porcino, una

aminopeptidasa H activa frente a L-leucina- β -naftilamida y α -benzoil-L-arginina- β -naftilamida. El peso molecular de esta enzima era 51.000 dalton y su pH óptimo de hidrólisis 8,0. Su actividad se inhibe por el ácido monoiodoacético y por la leupeptina pero no por el EDTA, el fluoruro de fenil-metil-sulfonilo, la pepstatina ni la bestatina.

En un estudio realizado por Rico y col. (1991), sobre la actividad de la catepsina H en músculo bíceps femoral porcino, se puso de manifiesto que la actividad aminopeptidásica interfería con la de la catepsina. Estos autores cifraron en algo menos del 5 % de la actividad total la que se debía a las aminopeptidasas.

En el músculo bíceps femoral porcino se ha aislado una aminopeptidasa capaz de hidrolizar una gran cantidad de derivados aminoáclicos, siendo el más susceptible la metionilamida-4-metilcumarina. El peso molecular de esta enzima es de 53.000 dalton y tiene una actividad máxima a pH 7,5 y 40 °C. Esta enzima no contiene iones metálicos y no se inhibe por la acción de la bestatina, la puromicina o el cloruro sódico (Flores y col. 2000). Esta resistencia a la sal hace que esta enzima adquiera relevancia para la industria de los productos porcinos curados.

La alanil-aminopeptidasa aislada del músculo esquelético de cerdo presenta una actividad óptima a pH 6,5 y 50 °C, viéndose su actividad estimulada por la presencia de algunos cationes metálicos como el Cu^{2+} o el Ca^{2+} , e inhibida por la presencia de agentes quelantes y reactivos sulfhidrúlicos (Flores y col. 1997). La actividad de las alanil-aminopeptidasas de músculo porcino viene determinada por la presencia de un aminoácido específico con un nitrógeno terminal en el péptido. Así mismo, el porcentaje de actividad de la enzima también puede estar condicionado por la longitud del péptido (Flores y col. 1999).

Algunos autores han estudiado la influencia de las aminopeptidasas del músculo porcino sobre la liberación de aminoácidos libres y su influencia en las características organolépticas de los productos cárnicos curados. Toldrá y col. (2000) han comprobado que la actividad aminopeptidásica incrementa los niveles de aminoácidos libres como el ácido glutámico, lisina, leucina y arginina, compuestos responsables en gran medida del aroma del jamón curado. Otros autores como Virgili y col. (1998) han comprobado que

los jamones con poco o ningún amargor presentan niveles altos de actividad aminopeptidásica.

La aminopeptidasa C, purificada a partir de músculo esquelético de pollo, migra como una banda simple en SDS-PAGE. Su peso molecular es de 92.000 dalton, presentando un intervalo de pH óptimo entre 6 y 7 sobre un sustrato de L-leucina- β -naftilamida, si bien la enzima permanece estable a valores de pH entre 6,5 y 8. El EDTA y la puromicina actúan como factores inhibidores de esta enzima (Nishimura y col. 1991a).

En el trabajo realizado por Toldrá y Flores (2000), en el que estudiaron la actividad aminopeptidásica de carnes de porcino PSE (pálidas, blandas y exudativas), RSE (rojas, blandas y exudativas), RFN (rojas, firmes y no exudativas) y DFD (oscuras, firmes y secas), se confirma que la actividad aminopeptidásica de la carne de porcino constituye un factor que puede utilizarse para predecir, de forma rápida tras el sacrificio, la calidad de la carne y sus posibilidades de uso industrial, ya que la actividad aminopeptidásica de las carnes exudativas es significativamente mayor que la de las no exudativas tras el sacrificio.

1.4. MÉTODOS RÁPIDOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

La aplicación en la industria alimentaria de sistemas APPCC, así como el establecimiento de planes de muestreo estadísticamente válidos, requiere el análisis de gran número de muestras y la obtención rápida de resultados que permitan aplicar acciones correctoras rápidas, incluso durante el proceso de fabricación (Jarvis 1982, Gonzalez y col. 1994).

Los métodos microbiológicos tradicionales son laboriosos y lentos, en muchas ocasiones de una lentitud incompatible con el procesado, distribución y comercialización de los alimentos, sobre todo de los muy perecederos. Esto ha provocado el desarrollo de métodos rápidos para detectar, identificar y enumerar los microorganismos presentes en los alimentos (Entis y col. 2001) y así tener una idea, al menos aproximada, de la calidad microbiológica del alimento en un breve espacio de tiempo. Fung (1997), en una revisión sobre métodos rápidos de análisis microbiológico, manifestaba el interés creciente en los últimos años por el uso de estas técnicas rápidas, así como las previsiones del incremento de su utilización en el futuro.

Los métodos desarrollados y comercializados para la detección e identificación de microorganismos son muy abundantes; sin embargo, son mucho menos numerosos los métodos rápidos para el recuento de microorganismos (Entis y col. 2001). En los apartados siguientes se mencionarán los métodos cuya finalidad es tanto la detección e identificación como el recuento, si bien, por la naturaleza de esta memoria, será a estos últimos a los que se les preste más atención.

Los métodos para estimar la calidad microbiológica de los alimentos se pueden clasificar atendiendo a diversos criterios. A continuación se agrupan de acuerdo al fundamento en que se basan:

- Métodos basados en la automatización de los métodos convencionales
- Métodos basados en fenómenos físicos
- Métodos basados en membranas filtrantes

- Métodos basados en los ácidos nucleicos
- Métodos basados en reacciones antígeno-anticuerpo
- Métodos basados en reacciones bioquímicas y enzimáticas.

1.4.1. MÉTODOS BASADOS EN LA AUTOMATIZACIÓN DE MÉTODOS CONVENCIONALES

Actualmente se comercializan diferentes aparatos que realizan de forma automática las operaciones rutinarias típicas del trabajo laboratorial como la preparación de medios de cultivo y su distribución, las diluciones, inoculaciones, siembras y recuentos de colonias.

A continuación se describe alguno de ellos para que el lector comprenda mejor el sentido de la automatización y el ahorro de tiempo que puede significar su empleo. No está en el ánimo del firmante de esta memoria hacer propaganda de los incluidos ni recomendarlos o menospreciar los equipos que no se mencionen, tanto en este apartado como en los sucesivos.

Uno de los equipos automatizados más difundidos es el sembrador en espiral. La casa *AES laboratoire*, comercializa el “W.A.S.P.” (Whitley Automated Spiral Plater). Este aparato deposita de forma continua un volumen decreciente de líquido en la superficie de la placa de agar que gira mientras el dispensador se mueve desde el centro hacia la periferia. Este método elimina las diluciones seriadas, realiza la siembra por duplicado, ahorra material y además tiene una buena correlación con el recuento en placa. La misma casa, *AES laboratoire*, comercializa otros equipos, como el “A₂PS300”, que permite realizar siembras en masa, procesando hasta 550 placas por hora, diluidores gravimétricos como el “Dilumat 4” o contadores de colonias como el “EC1”.

Todos estos autómatas de laboratorio reducen el gasto de material y, sobre todo, de personal y aumentan el número de muestras procesadas por unidad de tiempo; no obstante, tienen un coste elevado y, además, sus resultados siguen dependiendo del tiempo de crecimiento bacteriano que se produce tras un periodo de incubación, por lo que no significan un acortamiento notable del tiempo del ensayo.

1.4.2. MÉTODOS BASADOS EN FENÓMENOS FÍSICOS

1.4.2.a. Impedimetría.

Las primeras investigaciones en las que se asocian el crecimiento bacteriano y determinados cambios eléctricos en el medio de cultivo datan de finales del siglo XIX y principios del XX (Firstenberg-Eden 1985).

La impedimetría se basa en la detección de la actividad microbiana a través de la medida de la impedancia eléctrica. La impedancia se define como la resistencia al paso de la corriente alterna a través de un material conductor, en este caso un medio de cultivo. La impedancia está relacionada con la capacitancia y la conductancia (Cady 1978). La conductancia de un medio de cultivo, está en función de la resistencia y ésta depende de la cantidad de iones en disolución (Hartman y col. 1992). Las relaciones matemáticas existentes entre estos parámetros, sus símbolos y unidades de medida se exponen en la tabla 1.10.

Tabla 1.10
unidades de medida, símbolos, y relaciones matemáticas existentes entre la impedancia, la capacitancia y la conductancia.

Parámetro	Símbolo	Unidades de medida	
Impedancia	Z	ohmios	
Resistencia	R	ohmios	
Reactancia	X	ohmios	
Capacitancia	C	faradios	
Conductancia	G	siemens	
Frecuencia	f	hercios	
Ecuaciones:	$Z^2 = R^2 + X^2$	$X = \frac{1}{2\pi fC}$	$G = 1/R$

Fuente: Easter y Gibson 1989.

Como se puede comprobar, la impedancia, la capacitancia y la conductancia, están relacionadas entre sí, y aunque en la práctica los equipos de laboratorio pueden medir uno o varios de estos parámetros, al objeto de su descripción se denominaran genéricamente métodos impedimétricos.

Los microorganismos, al crecer, metabolizan sustratos no iónicos de baja conductividad, como proteínas, hidratos de carbono o grasas y los convierten en metabolitos iónicos de una conductividad mayor, como ácidos grasos, aminoácidos o ácidos orgánicos (González y col. 1994). Estos metabolitos incrementan la conductancia y disminuyen la impedancia del medio (Entis y col. 2001). Cuando la concentración microbiana alcanza tasas de 10^6 - 10^7 microorganismos/ml, la impedancia, la conductancia o la capacitancia del medio (dependiendo del parámetro que se mida) alcanza un umbral y detecta el cambio (Firstenberg-Eden 1985). Una vez alcanzado el umbral de detección, se registra el tiempo (en horas) que ha tardado en alcanzarse. Es el denominado tiempo de detección (TD).

El TD viene determinado principalmente por la carga bacteriana inicial. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que la temperatura a la que se realiza el ensayo condiciona el tiempo de generación bacteriano y debe seleccionarse cuidadosamente para que no existan diferencias importantes entre los diferentes grupos de bacterias presentes en la muestra o, por el contrario, elegir la más específica para detectar una especie o grupo de bacterias en concreto (Firstenberg-Eden 1983, 1985, Russell y col. 1995, Russell 1997).

Con los TD y los recuentos en placa de las muestras realizados en las mismas condiciones se elaboran rectas de calibrado previas. El método tiene una buena correlación con el recuento en placa (Easter y Gibson 1989). Analizando entre 80 y 100 muestras con niveles entre 10^1 y 10^5 de microorganismos/ml y cuyas diferencias entre los tiempos de generación estén minimizadas, se pueden conseguir coeficientes de correlación de 0,85 (Hartman y col. 1992) e incluso de 0,95 (Firstenberg-Eden y Tricarico 1983).

Esta técnica permite detectar poblaciones bacterianas de $10^5 - 10^6$ ufc/ml en tres a cinco horas, y de $10^4 - 10^5$ ufc/ml entre cinco y siete horas (González y col. 1994). La sensibilidad, pues, es muy alta, pudiendo llegar a detectar incluso una sola bacteria presente en el medio, si bien en estos casos los TD son mucho más largos y presentan una considerable variabilidad, de tal forma que las muestras con menos de 10 microorganismos generan curvas de calibración con coeficientes de correlación mucho más bajos (Entis y col. 2001). Por el contrario, las muestras con cargas superiores a 10^7 microorganismos/ml, producen la saturación del electrodo y deben diluirse antes de procesarse.

La impedimetría se ha utilizado con éxito para predecir la vida útil de la leche (O'Connor 1979, Bishop y col. 1984), algunos quesos (Bishop y White 1985), vegetales y alimentos congelados (Hardy y col. 1977). En carnes refrigeradas, esta técnica permite la detección de niveles de microorganismos del orden de 10^7 ufc/cm² en menos de dos horas (Bulte y Reuter 1984). También se utiliza para la detección y el recuento de diferentes grupos de microorganismos, como coliformes (Martins y Selby 1980, Russell y col. 1995, Strauss y col. 1984, Tenpenny y col. 1984), mesófilos (Russell y col 1992), o psicrotrofos (Firstenberg-Eden y Tricarico 1983), así como para la detección de patógenos como *Salmonella* (Pless y col. 1994), *E. coli* (Jawad y col. 1998, Edmiston y Russell 2000) y *Staphilococcus aureus* (Glassmoyer y Russell 2001). Para ello, se utilizan, según el caso, medios selectivos o condiciones de crecimiento definidas.

Los equipos utilizados actualmente para el desarrollo de esta técnica son: el "Bactometer", el "RABIT", el "Malthus" y el "BacTrac". Este último equipo permite separar las señales de impedancia del medio y la del entorno próximo al electrodo, interpretándolas de forma individual, denominándose método de impedancia dividida (Impedance-Splitting Method). Resulta especialmente útil para el control de microorganismos que crecen en medios con una elevada concentración de sales (Entis y col. 2001).

Entre las ventajas de esta técnica se pueden citar: la detección relativamente rápida, la posibilidad de detección de microorganismos específicos, la simplicidad de preparación de las muestras y la posibilidad de informatización (González y col. 1994).

Entre los inconvenientes destacan el elevado coste del instrumental, la necesidad de calibración específica particularizada para cada producto y condiciones, el límite máximo de microorganismos a detectar (10^7 ufc/ml), que puede saturar e inutilizar temporalmente el electrodo, así como la baja relación sensibilidad/velocidad, ya que cuanto menores sean los recuentos, mayores serán los tiempos de detección (Jarvis y Easter 1987). También hay que tener en cuenta que algunas bacterias como *Micrococcus*, *Acinetobacter* y *Brochothrix* no producen cambios en la impedancia del medio, lo que da lugar a falsos negativos (Schulenburg y Bregan 2000).

1.4.2.b. Microcalorimetría.

Se basa en la medida de los muy pequeños cambios de calor que produce la actividad metabólica generada durante el crecimiento microbiano. El calor se detecta y se transforma en señales eléctricas que son amplificadas y medidas con un microcalorímetro (González y col. 1994).

Pueden hacerse recuentos de microorganismos midiendo el tiempo necesario para alcanzar una respuesta determinada o la cantidad de calor generado. Los distintos tipos de microorganismos metabolizan los sustratos de forma diferente; así, usando medios de cultivo con una composición definida de azúcares pueden llegar a identificarse diferentes tipos de bacterias mediante los termogramas de metabolización de los azúcares (Hartman y col. 1992).

La microcalorimetría se ha utilizado en el recuento de bacterias en la masa panaria (Martínez y Rodrigo 1987) y en la estimación de la carga bacteriana de carne picada (Gram y Sogaard 1985). También se utiliza en el control de la fermentación de la cerveza (Lentini 1993) y del natto (comida tradicional japonesa), (Akihiko y col. 1999).

Gram y Sogaard (1985), en el trabajo al que se ha hecho referencia, obtenían resultados en 24 horas, con un límite de detección de 10^4 ufc/g y con una correlación de $r=0,97$, en el intervalo comprendido entre $10^5 - 10^8$ ufc/g, respecto a los métodos de recuento en placa.

Debido al elevado coste y a la imposibilidad de procesar gran número de muestras es una técnica que se utiliza muy poco.

1.4.2.c. Turbidimetría / Nefelometría.

Esta técnica se basa en la propiedad de las partículas de pequeño tamaño de refractar la luz incidente, de forma que, midiendo la absorción o transmisión de la luz que atraviesa una suspensión celular, puede establecerse una relación con el número de microorganismos presentes en la misma. Con valores de absorbancia muy altos, la relación deja de ser lineal (García y col. 1991). Para realizar medidas directas sin dilución de la muestra es preciso utilizar un nefelómetro que mida directamente la luz difractada (González y col. 1994).

La turbidimetría se ha utilizado en el recuento de bacterias en leche cruda (Mattila 1987), carne picada y productos cárnicos (Jorgense y Schulz 1985, Kitzman 1997), así como en el control de especias irradiadas (Gautam y col. 1998). El límite de detección se encuentra alrededor de 10^5 ufc/ml y el tiempo necesario para la obtención de resultados es de unas 16 - 24 horas (Schulz y col. 1988, Jacob y col. 1989) aunque algunas bacterias lácticas requieren unas 48 h. (Schulz y col. 1988).

Otros autores, como Manninen y col. (1990), trabajando con distintas bacterias y diferentes matrices, obtuvieron coeficientes de correlación con los métodos de recuento en placa, entre $r=0,59$ y $0,99$. En el control de *Brochotrix thermosphacta* y *Pseudomonas* se han obtenido correlaciones con el método de recuento en placa de $r=0,91-0,97$ (Schulz y col. 1988), si bien algunos autores sólo han conseguido correlaciones elevadas en el intervalo de 10^7-10^9 microorganismos/ml (Rattanasomboon y col. 1999).

Aunque es una técnica rápida, sencilla y barata, la gran cantidad de partículas en suspensión presentes en los alimentos, e incluso su opacidad, limitan de forma radical su utilización. Para tener éxito se requiere tener matrices muy limpias, casi exentas de materiales en suspensión.

1.4.2.d. Radiometría.

Muchas bacterias producen CO₂ como producto de su metabolismo. La cuantificación de este metabolito puede relacionarse con los niveles de carga bacteriana. Utilizando sustratos (glucosa, manitol, formiato o glutamato) marcados con ¹⁴C radiactivo y medios selectivos, se puede monitorizar el ¹⁴CO₂ liberado mediante un contador de centelleo y, de este modo, calcular la cantidad de bacterias que crecen en dicho medio. Hay que tener en cuenta que el tiempo necesario para detectar el ¹⁴CO₂ es inversamente proporcional a la cantidad de microorganismos presente (Entis y col. 2001). Para medir el ¹⁴CO₂ se utiliza el sistema “BacTec”.

Esta técnica se ha utilizado para la detección de patógenos en alimentos como *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* (Previtte y col. 1972, Steward y col. 1980) y para la estimación de microorganismos viables en zumos de naranja refrigerados (Hatcher y col. 1977).

La radiometría es una técnica rápida. Los coliformes en agua se detectan en, aproximadamente, 4,5 h a concentraciones de 10¹ a 10⁵ bacterias/ml (Reasoner y Geldreich 1989). No obstante, esta técnica presenta los inconvenientes inherentes a la utilización de isótopos radiactivos y, además, el coste de los equipos es elevado.

1.4.2.e. Citometría de flujo.

La citometría de flujo analiza células en suspensión que interceptan una fuente de luz. La intersección de cada célula con la luz láser provoca la emisión de señales que permiten diferenciar poblaciones celulares en la muestra analizada por su tamaño relativo, por sus granulaciones, o bien por su reactividad con fluorocromos previa incubación con anticuerpos monoclonales marcados.

Es una técnica ampliamente utilizada en hematología. Sin embargo, Laplace-Builhe y col. (1993) apuntaron que, habida cuenta de su rapidez, gran reproducibilidad y la buena correlación con los métodos de recuento en placa, sería un buen método para la estimación de la carga bacteriana en alimentos y bebidas. En este sentido, Malacrino y

col. (2001) han utilizado la citometría de flujo con éxito para el análisis de bacterias y levaduras viables en vino, con un coeficiente de correlación de $r=0,94$ respecto a los recuentos en placa, con un límite de detección de 10^3 ufc/ml para levaduras y 10^4 ufc/ml para bacterias. También se ha utilizado para la detección de patógenos como *E. coli* O157:H7 (Goodridge y col. 1999, Kusunoki y col. 2000), o *Vibrio cholerae* (Alvarado y col. 1994).

El mayor inconveniente de esta técnica es el elevado coste de los equipos necesarios para su realización.

1.4.2.f. Otros métodos basados en fenómenos físicos.

A parte de los métodos expuestos en los apartados anteriores, se han investigado otras estrategias basadas en fenómenos físicos para el recuento o la identificación de microorganismos de forma rápida. No obstante, los que se citan a continuación han alcanzado menos relevancia que los ya discutidos.

Imágenes de ultrasonidos: Utilizado por Ahavenainen y col. (1989) para la monitorización no destructiva de la calidad microbiológica de productos lácteos envasados.

Resonancia magnética nuclear: Utilizado por Delpassand y col. (1995) con la intención de obtener una base de datos de espectros de resonancia magnética de diferentes bacterias patógenas, a modo de “huellas dactilares”, de por ejemplo *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* o *Enterococcus faecalis*.

Inmunosensor piezoeléctrico: Basado en un cristal de cuarzo en cuya superficie se encuentran fijados unos anticuerpos que se movilizan por la presencia de los antígenos correspondientes, produciendo una disminución de la masa sobre la superficie, lo que produce a su vez, una variación de la frecuencia eléctrica. Este método fue utilizado por Bovenizer y col. (1998) para la detección de *Pseudomonas aeruginosa*, con

un límite de detección de 10^5 bacterias/ml, con un intervalo lineal entre 2×10^6 y 1×10^8 bacterias/ml.

Espectroscopia de infrarrojos por transformadas de Fourier: Esta técnica la emplearon Rodríguez-Saona y col. (2001), utilizando los espectros en el infrarrojo cercano para identificar bacterias (*E. coli* HB101, *E. coli* ATCC 43888, *E. coli* 1224, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Ps. aeruginosa*, *B. cereus* y *Listeria innocua*) una vez separadas de su matriz. El método puede distinguir, incluso, entre diferentes cepas de *E. coli*.

Flujo de protones: Seymour y col. (1994) utilizaron el incremento de los mV/h generados por un filtrado obtenido a partir de carne picada, como índice para estimar su vida útil. Los incrementos menores a 1 mV/h indican que la carne tiene recuentos inferiores a 10^6 ufc/g.

Aunque las referencias a estos métodos se pueden calificar de esporádicas, algunos de ellos pueden tener un gran potencial de utilización en un futuro más o menos inmediato.

1.4.3. MÉTODOS BASADOS EN MEMBRANAS FILTRANTES

1.4.3.a. Epifluorescencia directa sobre filtro (DEFT).

La técnica DEFT, del inglés *direct epifluorescence filter technique*, se basa en la filtración de una muestra de alimento o de un extracto de la misma a través de una membrana de policarbonato que retiene mohos, bacterias y levaduras. Los microorganismos retenidos en el filtro se tiñen con el colorante fluorescente naranja de acridina, con el fin de poder observarlos y contarlos mediante microscopía de fluorescencia (Pettipher 1986). El naranja de acridina tiñe específicamente los ácidos nucleicos. El filtrado se somete a un tratamiento con detergentes antes de la tinción, con el fin de destruir las células somáticas. Las células vivas se tiñen de un color anaranjado-rojizo, amarillo-anaranjado o marrón-anaranjado, mientras que las células muertas presentan una fluorescencia verde (Fung 1997), lo que las hace claramente distinguibles.

En ciertos casos los filtros pueden incubarse para producir colonias más fácilmente detectables.

Las preparaciones se pueden contar de forma manual, obteniendo resultados en unos 30 minutos, o bien de forma semiautomática, con la ayuda de un analizador de imagen que permite procesar del orden de 50 muestras por hora y operario (Pettipher 1986, Singh y col. 1989).

Este método está muy difundido. Se ha utilizado o se utiliza satisfactoriamente para recuentos de microorganismos viables en leche (Rodríguez y Kroll, 1985, Pettipher 1986, Champagne y col. 1997, Hermida y col. 2000), en pescado (Pettipher 1986), en carnes y productos cárnicos (Qvist y Jackson 1985, Farr 1986, Boisen y col. 1992, Deibl y col. 1998), en carne de ave irradiada (Gardini y col. 1999), en alimentos congelados irradiados (Jones y col. 1997), en la monitorización de bacterias ácido-lácticas durante el almacenamiento del vino (Millet y Lonvaud 2000), y en la detección de microorganismos alterantes de la cerveza (Barney y Kot 1992).

Tortorello y Gendell (1993) desarrollaron el método para recuento de *E.coli* O157:H7 en leche y zumos, utilizando anticuerpos fluorescentes junto con el método de DEFT (Ab-DEFT). Esta misma técnica se ha utilizado para la detección de *E.coli* O157:H7 en zumo de manzana (Tortorello y col. 1998) y carne (Restaino y col. 1997) y para la detección de *Listeria* en vegetales frescos (Tortorello y col. 1997).

La DEFT es una técnica rápida y sensible, con un límite de detección de, aproximadamente, 10^3 ufc/ml ó cm^2 (Pettipher y col. 1980, Pettipher y Rodríguez 1982). La correlación con el recuento en placa es alta, alcanzando valores de $r=0,89-0,96$ en el intervalo entre 10^4-10^7 ufc/ml en leche cruda (Pettipher y Rodríguez 1982), si bien se puede utilizar en leches con cargas bacterianas de 5×10^3 hasta 10^8 bacterias/ml (Graham y Pettipher 1989). En carne y pescado prefiltrado se obtienen correlaciones de $r=0,91$, en el intervalo de 10^4-10^{10} ufc/g (Graham y Pettipher 1989) aunque debe tenerse en cuenta que la correlación puede verse afectada por muchos factores, entre ellos el estado metabólico y el tipo de microorganismo medido (Rapposch y col. 2000). Vivegnis y col. (1996) compararon esta técnica con el método tradicional de recuento en placa,

utilizando diferentes alimentos y bacterias y obtuvieron coeficientes de correlación bastante más variables que los citados anteriormente: bacterias totales en vegetales congelados (103 muestras) $r=0,87$; bacterias totales en piel de cuello de pollo (36 muestras) $r=0,42$; bacterias totales en carne picada desengrasada de cerdo (14 muestras) $r=0,99$; enterobacteriaceas en vegetales congelados (28 muestras) $r=0,57$ y *Staphylococcus aureus* en carne picada (17 muestras) $r=0,8-0,95$.

Entre los inconvenientes que presenta esta técnica se pueden citar que su realización, en caso de hacerse de forma manual, es muy tediosa para el operario y que, debido al elevado coste de los equipos semiautomáticos, la utilización de los mismos incrementa considerablemente el precio de la prueba.

1.4.3.b. Membrana filtrante hidrofóbica cuadrículada (HGMF)

La técnica de HGMF, del inglés *hydrofobic grid membrane filter*, se basa en la separación de los microorganismos presentes en una muestra o en un extracto de la misma, mediante filtración a través de una membrana hidrofóbica, de 6x6 cm y 0,4 μ m de tamaño de poro, que contiene 1600 cuadraditos separados (Entis y col. 2001). Las unidades formadoras de colonias quedan confinadas dentro de los cuadrillos y tras la incubación de la membrana, aparece una distribución de colonias, que pueden ser contadas de forma manual, si bien el sistema está desarrollado preferentemente para el recuento automático mediante un sistema informático (Vila 1999).

Al principio, su aplicabilidad se limitaba al análisis de muestras de agua pero la introducción de prefiltros, diluyentes y técnicas de digestión enzimática, permiten la eliminación, previa al filtrado, de las partículas de los alimentos homogeneizados (Entis y Lerner 1996) y, por tanto, en la actualidad puede aplicarse a otros muchos productos.

Entre las ventajas que presenta este método se pueden citar las siguientes: elimina las diluciones múltiples y separa los microorganismos de la matriz evitando interferencias (Entis y Boleszczuk 1990), confina las colonias en cuadrillos individuales con crecimientos generalmente más densos y fáciles de detectar, lo que evita las interpretaciones subjetivas y redundante en una mayor reproducibilidad y precisión (Sharpe

y col. 1983). Además, el filtro puede transportarse de un medio a otro, o de un reactivo a otro, lo que permite incubaciones secuenciales o varias reacciones diferenciales en el mismo filtro (Holley y Millard 1988).

La HGMF no es un sistema especialmente rápido, ya que requiere la incubación de la membrana, lo que conlleva un tiempo similar al de los métodos convencionales. Otros inconvenientes que presenta son: la necesidad de limpiar y reesterilizar el aparato entre muestras, así como la fatiga visual del operador para contar los 1600 cuadrillos o el incremento de precio de la técnica en caso de adquirir equipos automáticos de recuento como el “ISO-GRID Line Counter” (Entis y col. 2001).

Esta técnica también se utiliza en combinación con anticuerpos o sondas DNA para la detección y recuento de patógenos como *Campylobacter jejuni* (Wang 2002), *Vibrio parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Banerjee y col. 2002) o *E. coli* (Todd y col. 1999).

1.4.4. MÉTODOS BASADOS EN LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

1.4.4.a. Hibridación

La hibridación es un proceso en el que una sonda de ADN marcada mediante algún sistema se une a una región complementaria de una cadena simple de ADN o de ARN. La sonda suele ser una secuencia de entre 20-200 nucleótidos y puede unirse a genes específicos como genes de toxinas, regiones de ARN ribosómico o secuencias de ADN con funciones desconocidas, pero que son comunes o específicas de determinadas especies o grupos de bacterias (Hartman y col. 1992).

Las sondas pueden marcarse mediante isótopos radiactivos, sustancias fluorescentes, enzimas o anticuerpos. Dependiendo de la naturaleza del marcaje se establece el sistema de detección (película radiográfica, sustratos específicos o reacciones inmunológicas).

La hibridación es una técnica que puede ser muy específica dependiendo de la secuencia de ADN diana seleccionada. No obstante, requiere de aproximadamente 10^5 - 10^6 copias del ADN diana, por lo que, en ocasiones, es imprescindible el enriquecimiento de la muestra mediante cultivo o filtrado.

En el comercio pueden encontrarse diferentes tests, como el GENE-TRACK[®], basado en la detección de la región 16S del ARN ribosómico, para la detección de patógenos como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica* (Curiale y col. 1994, D'Aoust y col. 1995). Otro test es el AccuPROBE[®] que utiliza quimioluminiscencia para la detección (Entis y col. 2001).

La combinación de este método con el de filtración a través de membrana hidrofóbica permite la utilización de esta técnica de forma cuantitativa y esta posibilidad se ha utilizado para el recuento de *Campylobacter jejunii* (Wang 2002) y de *E. coli* en aguas y bebidas (Tortorello y Reineke 2000).

1.4.4.b. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*, consiste en esencia en la amplificación de un fragmento de ADN o ARN mediante la utilización de unas secuencias de nucleótidos (cebadores) complementarios con las secuencias localizadas en los extremos 5' del fragmento a amplificar y una serie de reacciones catalizadas por una ADN polimerasa termorresistente que se repiten cíclicamente hasta obtener una gran cantidad de copias del fragmento de ADN diana.

La PCR es una técnica rápida, sumamente sensible, que permite la detección incluso de una sola copia del ADN diana. La especificidad, al igual que en las técnicas de hibridación, depende de la secuencia amplificada. Ésta puede ser específica de una bacteria o común a un determinado grupo de especies bacterianas.

La PCR se ha utilizado para la detección e identificación de patógenos como *E. coli* en carne picada (Jonson y col. 1998, Uyttendaele y col. 1999), *E. coli* en ostras

(González y col. 1999), *Campylobacter* (González y col. 1997, Denis y col. 2001), *Clostridium estertheticum* en carne envasada al vacío (Helps y col. 1999), *Clostridium perfringens* (Schoepe y col. 1998), *Arcobacter* spp. en carne de pollo (González y col. 2000, Antolín y col. 2001) e incluso virus como el de la hepatitis A (Schwab y col. 2001).

Esta técnica se ha utilizado en algunos trabajos de forma cuantitativa en combinación con sondas biotinadas y detección mediante enzimoimmunoensayo (ELISA) para la detección de bacterias alterantes de la leche (Gutiérrez y col. 1997) y de la carne refrigerada (Gutiérrez y col. 1998). En este último trabajo, basado en la detección de una región del gen 16S del ARN ribosómico, común a la mayoría de las bacterias alterante de la carne, se obtuvo un coeficiente de correlación de $r=0,95$ en el intervalo entre 10^2 y 10^7 ufc/cm².

Las nuevas técnicas de PCR cuantitativa en tiempo real, con marcadores fluorescentes, han abierto la puerta a la utilización de la PCR en la cuantificación rápida de microorganismos en alimentos. Venkitanarayanan y col. (1996) también han utilizado esta técnica de forma cuantitativa para la estimación de la carga bacteriana en la carne, obteniendo resultados en 4 horas con un coeficiente de correlación de $r=0,91$, respecto al método de recuento en placa.

La PCR presenta algunos inconvenientes como son: la necesidad de equipos costosos, especialmente los sistemas de PCR cuantitativa en tiempo real; la necesidad del diseño y adquisición de las sondas, que deben ser particularizadas para cada especie o grupo de bacterias a detectar; la presencia en los alimentos de posibles inhibidores; así como la imposibilidad de conocer exactamente si el ADN o ARN amplificado proviene de microorganismos vivos o inactivados por algún tratamiento, lo que puede generar falsos positivos (Fung 1997).

1.4.5. MÉTODOS BASADOS EN REACCIONES ANTÍGENO-ANTICUERPO.

El desarrollo de los anticuerpos monoclonales ha permitido un gran auge de las técnicas inmunológicas, de tal forma que éstas pueden aplicarse con cierta facilidad en la

detección e identificación de microorganismos. Entre los métodos basados en reacciones antígeno-anticuerpo utilizados en microbiología pueden citarse: la inmunofluorescencia, la aglutinación en látex, la inmunoinmovilización, la inmunoprecipitación, la cromatografía de inmunoadinidad, la separación inmunomagnética o el enzimoinmunoensayo (ELISA), del inglés *enzyme-linked immunosorben assay*.

Todas estas técnicas tienen una gran especificidad y, algunas de ellas, sensibilidades muy altas, existiendo numerosas citas bibliográficas en las que se han empleado con gran eficacia en la detección e identificación de patógenos en diferentes productos alimentarios. Aunque algunas de estas pruebas, como las de ELISA, permiten realizar cuantificaciones *per se* o en combinación con otras técnicas de aislamiento, en general todas ellas se utilizan poco como técnicas cuantitativas y, por tanto, considerando el objetivo de esta memoria, no van a tratarse en detalle.

1.4.6. MÉTODOS BASADOS EN REACCIONES BIOQUÍMICAS Y ENZIMÁTICAS.

1.4.6.a. Pruebas miniaturizadas de identificación.

Las pruebas bioquímicas y enzimáticas se han utilizado desde el comienzo de la bacteriología para estudiar la actividad metabólica y así poder identificar los diferentes microorganismos. Actualmente existen diversos kits miniaturizados de diagnóstico; de entre ellos pueden entresacarse los siguientes:

- “Enterotube II” (Roche Diagnostics): Galería de 15 pruebas bioquímicas para identificación de enterobacteriaceas.
- “Oxi/Ferm Tube” (Roche diagnostics): Similar al anterior. Se utiliza para la identificación de bacterias gram negativas no fermentadoras.
- API (BioMerieux): Galería con 23 pruebas bioquímicas para la identificación de distintas bacterias (20E, enterobacteriaceas; NFT, gram negativas no enterobacteriaceas; CAMP, *Campylobacter* spp.; Staph-IDENT, estafilococos y micrococos; 20A, anaerobios; 50CH, *Lactobacillus*; 20C, levaduras;

STREP, estreptococos y CORYN, *Corynebacterium*). Esta misma casa comercializa el sistema informatizado “MINI API”.

- ATB (BioMerieux): Galería con 32 sustratos para la identificación de microorganismos anaerobios, estafilococos, micrococos, levaduras, enterobacterias, estreptococos y bacilos gram negativos.
- Minitek (Becton Dickinson Microbiology): consiste en discos impregnados con diferentes sustratos.
- BBL Crystal (Becton Dickinson Microbiology): consta de 30 pruebas diferentes.
- Micro ID (Organon Teknika): consta de 15 pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias gram negativas.
- RapID One System (Remel): galería con 20 pruebas bioquímicas para la identificación de diferentes bacterias.

Estos kits miniaturizados resultan muy útiles para la identificación, ya que tienen precisiones del orden del 76-97 % (Entis y col. 2001), pero no son pruebas que tengan como objetivo la cuantificación de la carga bacteriana.

1.4.6.b. Medida del ATP /Bioluminiscencia

Las reacciones luminiscentes (reacciones enzimáticas que cursan con la emisión de luz), se pueden utilizar para el control de la calidad bacteriológica de los alimentos mediante el empleo de la luciferasa. Esta enzima, en presencia de luciferina, oxígeno, iones Mg^{2+} y ATP, cataliza una reacción bioluminiscente en la que la luciferina se oxida, provocando la emisión de luz azul-verdosa que puede cuantificarse por espectrofotometría a 560 nm. La cantidad de luz generada en esta reacción es proporcional a la cantidad de ATP, hecho que puede utilizarse para estimar la biomasa de células de una muestra (Fung 1997). Las interferencias procedentes del ATP no microbiano (somático), pueden evitarse separando los microorganismos mediante filtración o extrayendo y eliminando este ATP no microbiano mediante surfactantes o enzimas (Payne y Kroll 1991). En los alimentos con un alto contenido en ATP somático, como la carne, no es posible su eliminación completa, generándose un “ruido de fondo” en la reacción (Tholen y col. 1997).

Esta prueba se ha utilizado y se utiliza actualmente para la detección de microorganismos en carne de vacuno y de ave (Kennedy y Oblinger 1985, Littel y col. 1986, Ellerbroek y col. 1998, Chen 2000), en leche (Botha y col. 1986, Girotti y col. 1997, Niza y col. 2000, Samkutty y col. 2001), en zumos y bebidas (Ryan 1996, Takahashi y col. 2000), en pescado fresco (Ward y col. 1986) y sobre todo, para el control higiénico de superficies (Minvielle 2000, Moore y col. 2001, Ukuku y col. 2001).

Diferentes compañías como “Lumac”, “Biotrace-Ecolab Inc.”, “Celsis Inc.”, “GEM Biomedicla Inc”, “Millipore Corp.” o “New Horizons Diagnostics”, entre otras, comercializan equipos y kits con reactivos necesarios para la medida del ATP mediante bioluminiscencia.

La bioluminiscencia es una técnica muy rápida, con la que pueden obtenerse resultados en unos 10-20 minutos, con un límite de detección en torno a $5 \times 10^4 - 10^5$ ufc/g (Littel y col. 1986, González y col. 1994). Algunos autores, como Kennedy y Oblinger (1985) y Littel y col. (1986), al comparar esta técnica con los métodos tradicionales de recuento en placa, dicen obtener buenos coeficientes de correlación, de $r=0,94$ y $0,97$ respectivamente, para un intervalo entre 5×10^4 y 5×10^8 ufc/g., si bien Braeunig y Trenner (1996), en un estudio realizado con *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, manifiestan la imposibilidad de establecer de forma general niveles límite de ATP que estén en relación con niveles especificados de calidad microbiológica, siendo necesario desarrollarlos para aplicaciones y condiciones concretas.

Entre los inconvenientes que presenta la prueba cabe citar la necesidad de equipos específicos, el coste elevado de los reactivos y el hecho de que la presencia de detergentes o desinfectantes puede interferir, generándose falsos positivos por quimioluminiscencia. En este sentido Green y col. (1999) señalan que cuando se usa esta técnica en el control de superficies, es esencial tener en cuenta el tipo y concentración de sustancias desinfectantes utilizadas.

Otra aplicación de la bioluminiscencia consiste en la incorporación de los genes responsables de la luminiscencia (genes *Lux*) a microorganismos no luminiscentes mediante el concurso de fagos. Es una técnica muy sensible, ya que permite detectar incluso menos de 10 bacterias/ml. Mejora la especificidad y además permite distinguir entre bacterias vivas y muertas (Stewart y col. 1997). Duzhii y Zavil'gel'skii (1994) han utilizado esta técnica para la detección de bacterias entéricas indicadoras sin enriquecimiento, en 15 minutos.

1.4.6.c. Prueba del *Limulus*

La prueba del *Limulus* o (LAL), del inglés *Limulus Amebocyte Lysate*, se basa en la capacidad que posee una endotoxina de naturaleza lipopolisacárida, presente en la pared celular de las bacterias gram negativas, capaz de provocar la coagulación de un lisado de amebocitos procedentes del plasma del cangrejo americano (*Limulus polyphoemus*). La formación de este gel, sirve para la cuantificación de la endotoxina presente y por tanto, para estimar la carga bacteriana (Entis y col. 2001). El desarrollo de la prueba es simple. Se incuban alícuotas de un homogeneizado del alimento junto con pequeñas cantidades de lisado de *Limulus* durante 1h a 37 °C. El recuento buscado será la inversa de la dilución más baja que produce la gelificación (González y col. 1994). Para mayor precisión, puede medirse la turbidez generada por la reacción mediante espectrofotometría a 360 nm, (Bishop y White 1986).

Este método se ha utilizado para la detección de la carga bacteriana en leche (Byrne y Bishop 1990, Mottar y col. 1993, Waage y col. 1994), en carne y productos cárnicos (Jay 1981, Scoter y col. 1994, Stolle y col. 1994, Misawa y col. 1995), así como en ovoproductos (Bostel y Stroh 1995).

El límite de detección de esta prueba es del orden de 10^4 ufc/ml ó g (Jay 1981). Byrne y Bishop (1990) señalan coeficientes de correlación de $r=0,78$ respecto a recuentos en placa de microorganismos psicrotrofos. Stolle y col. (1994) obtuvieron coeficientes de correlación de $r=0,62$ y $0,77$ frente a recuentos de bacterias totales y de bacterias gram negativas, respectivamente. Sin embargo, otros autores como Furuhashi y

col. (1992) manifestaron no obtener una correlación clara entre la concentración de endotoxina determinada y los recuentos en placa.

Una modificación de esta prueba es el método cromogénico, en la que además del lisado de amebocitos, se añade un sustrato de arginina-p-nitroanilida, desarrollándose un color amarillo por la liberación de la p-nitroanilina, que puede medirse espectrofotométricamente a 405 nm. Esta técnica se ha utilizado en el control microbiológico de carne (Siragusa y col. 2000) y leche (Lawrence y Gilmour 1992). Tiene una sensibilidad similar, pero proporciona resultados más precisos y cuantificables (Svensson y Hann-Hägerdal 1987).

El reactivo de lisado de amebocitos supone un coste elevado, por ello se han desarrollado micrométodos que reducen considerablemente el consumo de reactivos (May y col. 1989). El “Toxinómetro ET-201” permite medir automáticamente la turbidez del medio como consecuencia de la actividad de la endotoxina. Mottar y col. (1993) evaluaron este equipo, considerándolo muy útil para el control microbiológico rutinario de la leche.

1.4.6.d. Prueba de la catalasa

Se basa en la capacidad que tienen los microorganismos catalasa positivos de desdoblar el agua oxigenada, en agua y oxígeno. Entre estas bacterias se encuentran una parte considerable de las alterantes de los alimentos frescos almacenados en aerobiosis en refrigeración. La prueba de la catalasa permite la detección de cargas bacterianas del orden de 10^4 ufc/g en unos 5 minutos, pero no permite el establecimiento de una correlación nítida con los métodos de recuento en placa, por lo que no debe emplearse para la cuantificación de la carga bacteriana (Fung 1997).

Enzimas con actividad catalasa también existen en otros muchos sistemas vivos, entre ellos, los alimentos en general y la carne en particular. Este hecho ha provocado que esta técnica se haya utilizado con éxito para vigilar los procesos de limpieza y desinfección de superficies. Ang y col. (1994) han utilizado esta prueba para la

vigilancia del calentamiento de carne de ave a punto final, ya que la actividad catalasa, tanto la bacteriana como la animal, se pierde por completo a 71 °C.

1.4.6.e. Prueba de la p-nitroanilina.

Es una prueba sencilla y barata que no requiere ningún equipo sofisticado. Fue desarrollada por Pérez de Castro en 1988 y posteriormente mejorada por Alvarado y col. (1992). Como se ha expuesto en apartados anteriores, las bacterias gram negativas y algunas gram positivas, entre las que se encuentran la mayoría de las alterantes de los alimentos frescos almacenados en aerobiosis y refrigeración, poseen enzimas con actividad aminopeptidásica, cuya actividad recae sobre péptidos. Experimentalmente, se utilizan para la reacción sustratos como la L-leucina, L-lisina o L-alanina-p-nitroanilida, que libera el aminoácido correspondiente y p-nitroanilina, compuesto de color amarillo cuantificable mediante espectrofotometría a 390 nm.

Esta prueba proporciona datos en unas 2 - 2,5 horas. El límite de detección es del orden de 10^5 ufc/cm² en carne y de 5×10^5 ufc/ml en leche. La correlación observada en estos alimentos respecto a los recuentos en placa ha sido de $r=0,96$ en carne y $0,93$ en leche.

Llama la atención la ausencia de referencias bibliográficas en las que se haya usado de forma rutinaria para la cuantificación de la carga microbiana, incluso en aquellos productos en los que se ha demostrado su utilidad. También sorprende el hecho de que siendo una prueba con unas características de sensibilidad y correlación comparables, e incluso mejores, que las de otros métodos rápidos, algunas revisiones recientes respecto a métodos rápidos en microbiología como la realizada por Entis y col. (2001) no hagan ni siquiera mención a la misma. Pero, por otra parte tampoco se ha criticado o valorado negativamente ni se han citado inconvenientes serios.

1.5 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

La carne picada es un alimento muy perecedero, sobre todo si no se toman precauciones para su conservación. Es obvio que la forma habitual de almacenamiento, en refrigeración y aerobiosis, extiende su vida útil, aunque el alcance de esta prolongación no puede decirse que sea reseñable; ya que no se puede mantener en condiciones de consumo más allá de aproximadamente una semana a temperaturas de 3 a 5 °C. Otro caso sería la utilización de métodos más eficaces de conservación, como la congelación o la obtención de productos modificados tratados con calor. No obstante, la comercialización habitual de la carne picada sigue siendo en refrigeración y, por tanto, el escaso margen de tiempo disponible desde la producción de este alimento o su adquisición a un proveedor y el final de su vida útil –microbiológica- no permite que las decisiones respecto a su consumo se demoren, de modo que la aplicación de métodos rápidos y fiables que detecten y cuantifiquen la carga bacteriana resultan, a todas luces, más que convenientes, imprescindibles.

Las decisiones rápidas y adecuadas acerca de la calidad microbiológica de cualquier alimento en general redundan en beneficios económicos para la industria y son un arma valiosa, garante de una buena planificación sanitaria. Los métodos tradicionales de recuento en placa de microorganismos son los métodos de referencia por su exactitud y precisión, avalada por los muchos años de su utilización, tanto en el ámbito industrial como investigativo. No obstante, esta técnica precisa de un tiempo excesivo para dar resultados que, si bien en algunos alimentos sólo demoran su libranza al mercado, en otros puede significar un trastorno económico enorme, porque durante la espera hasta la obtención de resultados el alimento puede estar alterándose y depreciándose de forma irresoluble. Por consiguiente, el hecho de disponer de métodos rápidos que ofrezcan respuestas fiables en unas pocas horas acerca de la calidad de los alimentos en general, y de la carne picada en particular, siempre irá en beneficio de todas las partes implicadas en la cadena alimentaria, desde el productor al consumidor.

Para la realización de este trabajo no se parte de cero, más bien se sigue la estela de los trabajos realizados por el grupo dirigido por el Profesor Ordóñez, cuyos trabajos han sido publicados en varios artículos (Pérez de Castro y col. 1988, Pérez de Castro

1989, Alvarado y col. 1992, Ordóñez y García de Fernando 1996). Estos autores desarrollaron la prueba de la p-nitroanilina para la detección de la carga bacteriana en superficies cárnicas y en leche y exponen en sus trabajos la dificultad que supone la aplicación de esta prueba en carnes picadas por diversos motivos. Las características especiales de este alimento, en el que las bacterias se distribuyen homogéneamente por toda su masa, hacen necesaria una adaptación que permita una recuperación adecuada de los microorganismos, así como un estudio de las posibles interferencias que puedan suponer las aminopeptidasas propias de la carne liberadas durante el picado.

Otra faceta destacable del presente trabajo es que se pretende garantizar que la prueba de la p-nitroanilina es válida para el fin que se le da. Recuérdese que la microbiota que puede desarrollarse en un alimento percedero y mantenido en aerobiosis y refrigeración está compuesta fundamental, y casi únicamente, por bacterias psicrotrofas gram negativas y que todas ellas disponen de enzimas de carácter aminopeptidásico ligadas a sus paredes celulares. Esta aseveración es la base de la prueba de la p-nitroanilina. La técnica cuantifica la carga microbiana de un alimento suponiendo que la actividad aminopeptidásica desarrollada en el análisis, y ponderable espectrofotométricamente, es directamente proporcional al número de microorganismos gram negativos presentes. Esta afirmación admite, y así fue demostrado con varias cepas de pseudomonas (Pérez de Castro y col. 1988), aunque no se ha demostrado para otros géneros, que no hay grandes diferencias en la actividad aminopeptidásica de las diferentes bacterias gram negativas. Se pretende abordar aquí tal demostración con el fin de garantizar que los resultados obtenidos en la prueba de la p-nitroanilina son fiables. Para ello se propone la cuantificación de la actividad aminopeptidásica de las bacterias psicrotrofas gram negativas de más relieve en la industria de la carne. Además, se pretende conocer cómo afectan las condiciones de crecimiento a la actividad desarrollada por las bacterias, para comprobar, desde otro punto de vista, la fiabilidad de la correlación entre la actividad aminopeptidásica medida en la prueba de la p-nitroanilina y la concentración de microorganismos que la desarrolla.

Ya se ha dicho más arriba que la labor aquí expuesta tiene unos antecedentes. El presente trabajo pretende tomar el testigo y aceptar el reto de poner a punto la prueba de la p-nitroanilina para determinar la calidad microbiológica de carnes picadas, evaluando

aquellos aspectos que puedan afectar a la técnica. Además, también se pretende dar un nuevo impulso a esta metodología en la que los autores confían plenamente, tratar de difundirla en los ámbitos académicos y, quizás en un futuro inmediato, darla a conocer a la industria para que la evalúen y, en su caso, la adapten a sus estrategias de control de calidad.

Se ha comentado anteriormente que en leche cruda Pérez de Castro (1989) consiguió detectar tasas bacterianas de 5×10^5 ufc/ml. Es una sensibilidad alta pero insuficiente para detectar el nivel impuesto por la normativa de la UE de 10^5 ufc/ml (DOCE L268, 1992). Otros miembros del grupo que están realizando investigaciones para aumentar la sensibilidad de la prueba aplicada a leche cruda, han tenido éxito en sus estudios consiguiendo aumentar la sensibilidad hasta detectar tasas del orden de 10^4 ufc/ml (Manzano y col. 2003)

Un asunto importante, y que a juicio del autor debe resaltarse, es el ámbito en el que se ha desarrollado esta investigación. El presente trabajo se ha realizado en el Centro Militar de Veterinaria, principal Unidad Técnica Veterinaria de las Fuerzas Armadas, responsable, entre otros asuntos, de la inspección de los alimentos en el ámbito del Ministerio de Defensa. El carácter móvil de las Unidades militares, cuya participación de carácter humanitario en conflictos internacionales resulta cada vez más frecuente, acentúa todavía más las necesidades de los veterinarios responsables de la inspección de alimentos, en condiciones a veces extremas, de herramientas que faciliten la toma de decisiones de acuerdo a criterios objetivos y fiables. La posibilidad de disponer de métodos sencillos, baratos y técnicamente robustos, resulta siempre de utilidad para las Fuerzas Armadas y por tanto, la investigación en este campo siempre se ve estimulada por esta Institución.

Justificados los motivos que nos inducen a realizar este trabajo se proponen los siguientes objetivos:

Objetivo principal:

1. La puesta a punto de la técnica rápida de la p-nitroanilina para carnes picadas.

Objetivos parciales:

1. Llevar a cabo el estudio comparativo de las actividades aminopeptidásicas de las bacterias gram negativas habituales en la alteración de la carne en refrigeración.
2. Comprobar experimentalmente el efecto de las condiciones de crecimiento bacteriano en la actividad aminopeptidásica de las bacterias gram negativas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

La fase experimental de este trabajo consistió básicamente en la determinación de la actividad aminopeptidásica en muestras de carne picada, en unas ocasiones con su microbiota bacteriana natural y en otras contaminadas intencionadamente con distintas especies bacterianas. Para ello se diseñaron diferentes procedimientos de trabajo que permitieron optimizar la recuperación de microorganismos, evitar las interferencias de las aminopeptidasas cárnicas y valorar la influencia de las condiciones del crecimiento bacteriano.

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1. MUESTRAS DE CARNE

Se utilizaron dos tipos distintos de muestras de carne; algunas exigieron la preparación previa y el picado en el laboratorio, antes de procesarse, mientras que otras se procesaron directamente como fueron adquiridas en los distintos despachos comerciales. A continuación se describen las distintas características de cada una de ellas.

2.1.1.a. Muestras destinadas a ser picadas en el laboratorio

Consistieron en muestras de carne de las especies porcina, bovina y ovina, así como de conejo (*G^o Oryctolagus*), pollo (*Gallus domesticus*) y pavo (*Meleagris gallopavo domesticus*) y se adquirieron en distintas carnicerías de la provincia de Madrid.

Las muestras pertenecientes a las especies porcina, bovina y ovina consistieron en filetes de 2 a 4 cm de grosor obtenidos de diferentes piezas. La carne de vacuno utilizada fue el solomillo, que incluye los músculos psoas mayor, psoas menor y cuadrado de los lomos, y la babilla, que incluye los músculos cuádriceps femoral cutáneo del lomo y tensor de la fascia lata.

Las muestras en la especie porcina se obtuvieron a partir de lomos, piezas integradas principalmente por el músculo dorsal largo, y en la especie ovina a partir de piezas de pierna deshuesada.

Las muestras de carne de conejo, que según el Real Decreto 1915/1984 incluye a cualquier especie del *G° Oryctolagus*, consistieron en canales enteras o medias canales de las que se extrajeron porciones de masa muscular de las extremidades posteriores y de la zona lumbar.

Las muestras de carne de pollo y de pavo consistieron en filetes de 2 a 4 cm de grosor obtenidos a partir de cortes de filete de pechuga (Reglamento CEE núm. 1538/91) integrados por los músculos pectorales.

2.1.1.b. Muestras adquiridas previamente picadas.

Estas muestras se adquirieron en diversos centros comerciales de la provincia de Madrid y procedían de las especies bovina, porcina.

El picado de la carne se realizó en el momento de su adquisición, conteniendo la muestra final una sola especie o bien una mezcla de ambas en proporciones variables. También se adquirieron muestras previamente picadas y envasadas en bandejas de poliestireno recubiertas con una película plástica de polietileno. Se tomaron de las vitrinas refrigeradoras de distintos supermercados.

El transporte de todas las muestras desde el punto donde fueron adquiridas hasta el laboratorio se realizó en recipientes herméticos termoaislantes.

2.1.2. ESPECIES BACTERIANAS

Las especies bacterianas que se utilizaron en el presente trabajo fueron las siguientes:

Pseudomonas fluorescens (Trevisan 1889) Migula 1895; cepa tipo, número 378 de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), que se corresponde con la de referencia número 13525 de la American Type Culture Collection, Rockville, USA (ATCC).

Pseudomonas fragi (Eichholh 1902) Gruber 1905; cepa tipo, número 446 de la CECT, que se corresponde con la de referencia número 4973 de la ATCC.

Pseudomonas putida (Trevisan 1889) Migula 1895; cepa tipo, biovar A, número 324 de la CECT, que se corresponde con la de referencia número 12633 de la ATCC.

Flavobacterium odoratum Stutzer 1929, cepa tipo número 998 de la CECT, que se corresponde con la de referencia número 4651 de la ATCC.

Moraxella bovis (Hauduroy et al. 1973) Murray 1948, cepa tipo número 468 de la CECT, que se corresponde con la de referencia número 10900 de la ATCC .

Todas estas cepas bacterianas se recibieron liofilizadas, envasadas en un vial de vidrio. La revitalización de las cepas se realizó suspendiendo el polvo en agua de peptona tamponada siguiendo las especificaciones del catálogo de cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo.

Además de las cepas anteriormente citadas se utilizó una cepa de *Pseudomonas* sp. aislada de una muestra de alimento en el propio laboratorio.

La revitalización de *Ps. fluorescens*, *Ps. fragi*, *Ps. putida* y *Flavobacterium odoratum* se realizó utilizando como medio de cultivo agar nutritivo. La temperatura de incubación fue de 26 °C en las tres primeras y 37 °C en las dos últimas.

La revitalización de *Moraxella bovis* se realizó utilizando como medio de cultivo agar cerebro corazón (Oxoid CM 375) e incubando a 37 °C.

Una vez revitalizadas se mantuvieron mediante resiembras sucesivas en agar nutritivo con una frecuencia quincenal.

2.2. MATERIAL DE LABORATORIO

Las pesadas de muestras se efectuaron en granatarios monoplato de la marca “AND“ mod. EW-300B con una resolución de una décima de gramo. Para las pesadas de precisión se utilizaron balanzas analíticas “AND” mod. ER-60 y “Sartorius” mod. BP210D con una resolución de una décima de mg y de una centésima de mg respectivamente.

Las esterilizaciones de los medios de cultivo se efectuaron en autoclave eléctrico marca “Selecta” mod. AUTESTER 437-G aplicando temperaturas de 121°C durante 20 min.

La esterilización del material general de laboratorio de vidrio y metal se efectuó en un horno “Selecta” mod. 204A a 160 °C durante 3 horas.

Las esterilizaciones de piezas con partes plásticas tales como las cuchillas u otros componentes de las picadoras, así como cualquier material sensible a altas temperaturas, se realizaron en equipo para esterilización con óxido de etileno (C₂H₄O) marca “Labora y Adsuar S.L.” con una proporción de óxido de etileno del 8,6 % a 1 atmósfera de presión, durante 6 horas.

Las centrifugaciones se realizaron en una ultracentrífuga marca “Kontron” mod. CENTRIKON T-2050 utilizando un rotor modelo TST 41.14 y tubos de policarbonato TH de 14 ml ref^a. 9091-90382 y 9091-00533.

La centrifugación a la que se hace referencia en el apartado 2.5.2 se realizó en una centrífuga refrigerada marca “JOUAN” mod. CR-312 equipada con un rotor de 17 cm de radio.

Para la clarificación del medio previa a la lectura espectrofotométrica se utilizó una centrífuga de la marca “ALRESA”.

Para la conversión entre revoluciones por minuto (r.p.m.) y fuerza de aceleración (g) se utilizaron las siguientes ecuaciones matemáticas:

$$z = 1,118 \times 10^{-5} \times n^2 \times r$$

$$n = 299,07 \times \sqrt{z/r}$$

Donde:

n = nº de revoluciones por minuto

z = nº de g

r = radio del rotor de la centrífuga utilizada.

El picado de las muestras de carne se hizo en una picadora de cuchillas de laboratorio marca “TECATOR” mod. KNIFTEC 1095.

Las incubaciones microbiológicas de microorganismos psicrotrofos viables en los que se requerían temperaturas inferiores a la ambiental se llevaron a cabo en estufa-refrigeradora termostataada de la marca “Selecta” modelo 338. El resto de las incubaciones se realizó en estufas termostataadas de la misma marca modelos 237 y 207.

El mantenimiento de los medios de cultivo fundidos a 55 °C previo a su distribución en placas de Petri se hizo en una estufa termostataada de la marca “Selecta” mod. 237

Las incubaciones para el desarrollo de la reacción entre las aminopeptidasas y el sustrato de L-alanina-4-nitroanilida se efectuaron en un agitador dotado de campana incubadora termostataada de la marca “Selecta” mod. ROTOBIT.

Las siembras se realizaron en una campana de flujo laminar “Telstar” mod.FV-13

Los pHmetros utilizados fueron de la marca “Crison” mod. 2001 equipados con electrodos mod. 52-00 y 52-32 y sonda de temperatura compensadora automática (CAT) Mod. 55-55.

Las lecturas espectrofotométricas y turbidimétricas se realizaron con espectrofotómetro de doble haz “Shimadzu” Mod. UV-1603, utilizando cubetas de metacrilato semimicro de 1 cm de paso óptico.

Se utilizaron micropipetas de las marcas “ BRAND “ Mod. Transferpette de 0,5-5 ml, 10-100 μ l y 100-1000 μ l.

La obtención de agua ultrapura utilizada para la preparación de soluciones acuosas y medios de cultivo se llevó a cabo mediante los sistemas asociados en línea MILLI-RO y MILLI-Q de la marca “Millipore”, modelos ZERONC004 y ZFMQ23004, respectivamente.

La recogida de microorganismos mediante homogeneización se hizo en un homogeneizador de palas “Stomacher” mod. BA6021, utilizando bolsas de polietileno provistas de un filtro interior.

La filtración de las muestras previa a la lectura espectrofotométrica se llevó a cabo mediante filtros estériles “Millipore” de 0,45 μ m de diámetro de poro Mod. MILLEX-HV

La preparación de las diluciones y la realización de las siembras para los recuentos bacterianos se realizaron utilizando tubos de vidrio de diversos volúmenes, agitadores rotatorios de la marca “BUNSEN” mod.AGT-9, placas de Petri estériles de polietileno de 8,5 cm de diámetro, asas de Driglasky y material general de vidrio de laboratorio.

2. 3. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Los reactivos utilizados a lo largo del trabajo fueron los siguientes:

- L-alanina-p-nitroanilida marca Sigma ref^a A 9325
- Tampón TRIS hidroximetil aminometano marca Bio-Rad Ref^a 161-0716
- Ácido clorhídrico 0,1 N P.A. marca Merck
- Hidróxido sódico 0,1 M P.A.marca Panreac
- Etanol 96° marca Scharlau
- Tampón de pH 4 para calibración de pHmetro marca Crison
- Tampón de pH 7 para calibración de pHmetro marca Crison
- Cloruro potásico 3 M + cloruro de plata (Electrolito para pH-metro) Crison
- Cloruro sódico marca Panreac

Los medios de cultivo utilizados en las determinaciones microbiológicas, a excepción del suero fisiológico que se preparó en el propio laboratorio disolviendo 7,5 g de cloruro sódico en agua ultrapura hasta un volumen de 1000 ml, fueron de la marca “Oxoid”. Se utilizaron: agua de peptona tamponada (pH $7,2 \pm 0,2$), Plate Count Agar (PCA) (pH $7 \pm 0,2$), agar nutritivo (pH $7,4 \pm 0,2$), agar cerebro corazón (pH $7,4 \pm 0,2$), y Triptone Soye Broth) (TSB) (pH $7,3 \pm 0,2$)

2. 4. PROCEDIMIENTOS GENERALES

2.4.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE CARNE PICADA CON BAJA CARGA BACTERIANA

Algunos de los protocolos de trabajo que se exponen en los apartados siguientes exigieron trabajar con carne picada cuya carga bacteriana fuera lo más baja posible. Dado que está comprobado que el interior del músculo de animales sanos sacrificados en condiciones higiénicas adecuadas es prácticamente estéril (Gill, 1979), se procedió como se expone a continuación:

En las muestras de carne de porcino, bovino y ovino, así como las de pollo y pavo se tomaron los filetes de 2 a 4 cm de grosor y se procedió a aplicarles una espátula candente por toda la superficie externa, insistiendo de forma especial en aquellas zonas donde la pieza presentaba irregularidades.

En las muestras de carne de conejo, al tratarse de canales enteras con una superficie irregular, se procedió a la aplicación de la espátula candente en las zonas en las que posteriormente se pretendía tomar porciones de masa muscular, si bien se finalizó el tratamiento con un flameado general de la canal.

En cualquiera de las especies utilizadas, una vez formada la escara superficial, ésta se eliminó mediante pinzas, tijeras y bisturí estériles hasta una profundidad de al menos 3 mm. A continuación se tomaron porciones de masa muscular del interior de la pieza.

Estas porciones se picaron en una picadora de cuchillas. Todas las piezas, de este equipo, que entraban en contacto con la muestra, se habían esterilizado previamente.

El grado de picado al que se sometió la carne fue el necesario en cada una de las muestras para conseguir reducirla a gránulos de 2 a 3 mm.

Todas estas operaciones se realizaron en campana de flujo laminar y el operario estaba provisto de mascarilla y guantes estériles. La muestra así obtenida se introdujo en un recipiente hermético estéril y se conservó a 4 °C hasta el momento de su uso.

2.4.2. RECUENTO DE MICROORGANISMOS PSICROTROFOS VIABLES

El recuento de microorganismos psicrotrofos viables presentes en una muestra se realizó siguiendo el siguiente protocolo. Se partió de una dilución de 10^{-1} de la muestra de carne, salvo en el caso del procedimiento descrito en el apartado 2.5.1 en el que se partió de diluciones 1/14 y 1/70 debido al diseño de esa experiencia concreta.

El diluyente utilizado para la dilución 10^{-1} de partida fue, de forma general, suero fisiológico estéril, salvo en el caso de los protocolos de trabajo descritos en los apartados 2.5.1 y 2.5.2 en los que se utilizó tampón Tris 0,1 M pH 8,0.

A partir de la dilución de partida y de acuerdo con la carga bacteriana esperada en la muestra, se prepararon sucesivas diluciones decimales tomando con micropipeta 1 ml de esta dilución y añadiéndolo a un tubo que contenía 9 ml de agua de peptona al 1%. Se procedió así sucesivamente hasta conseguir el número de diluciones deseado.

A partir de cada una de las diluciones preparadas se sembraron, por duplicado en placas de Petri que contenían medio de cultivo PCA previamente solidificado, 0,1 ml del inóculo. Este volumen se distribuyó homogéneamente por toda la superficie con la ayuda de un asa estéril de vidrio de Driglasky. Todas las operaciones descritas anteriormente se realizaron bajo campana de flujo laminar.

Una vez realizada la siembra se procedió a incubar las placas en posición invertida en estufa-refrigeradora termostataada. Las condiciones de tiempo y temperatura de incubación fueron las siguientes: 24 horas a 17 °C seguidas de 72 horas a 7 °C, como recomiendan Sϕgard y Lund (1981) para este tipo de microorganismos.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el recuento de las colonias únicamente en aquellas placas que contenían entre 30 y 500 colonias. El recuento se realizó mediante cuentacolonia provisto de registrador.

Para obtener el resultado final se multiplicó el recuento obtenido en cada placa por la inversa de la dilución correspondiente. Seguidamente se hizo la media de los recuentos obtenidos con cada una de las series de diluciones. Al realizarse los recuentos por duplicado se obtuvo la media de los dos y finalmente, para expresarlo en unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo, se multiplicó el valor final por 10, ya que los recuentos procedían de la siembra de 0,1 ml. que, a todos los efectos, lo asumimos como 0,1 g.

2.4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA A PARTIR DE UNA SUSPENSIÓN ACUOSA MEDIANTE LA PRUEBA DE LA P-NITROANILINA

La reacción entre las enzimas y el sustrato, que se expuso de forma esquemática en el apartado 1.2.6 de la introducción, constituye el último paso común a todos los protocolos de trabajo que utilizamos en la fase experimental. Para desarrollar esta reacción, independientemente de que las aminopeptidasas tuvieran origen cárnico o bacteriano, se procedió siempre del mismo modo, de acuerdo al esquema que se muestra en la figura 2.1.

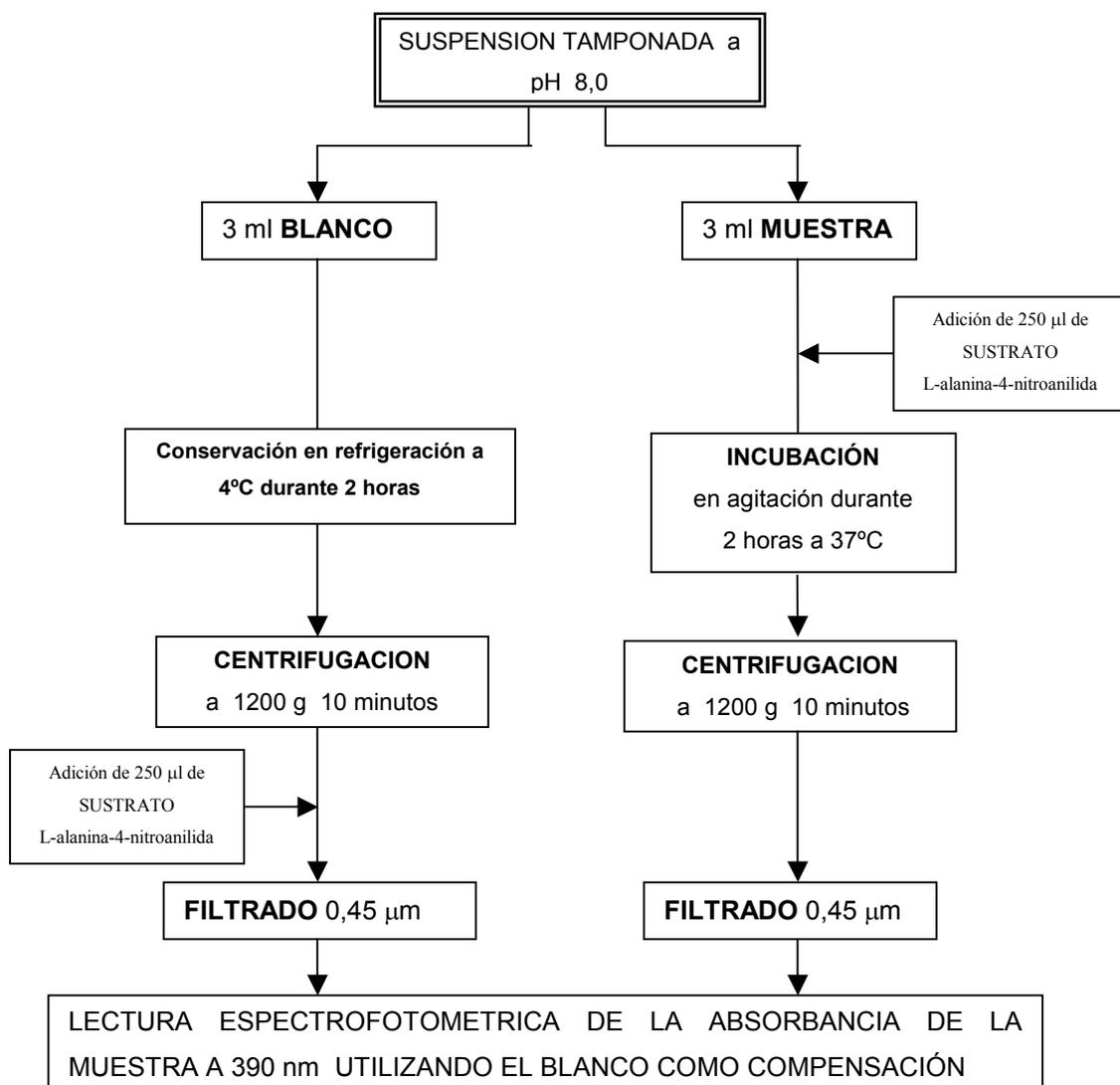


Figura 2.1. Esquema del procedimiento para la determinación de la actividad aminopeptidásica de una muestra mediante la prueba de la p-nitroanilina.

Para la determinación de la actividad aminopeptidásica de una muestra se siguió el método desarrollado por Pérez de Castro (1988).

Como sustrato se utilizó la L-alanina-4-nitroanilida. Se eligió este sustrato por ser el más específico de la enzima cuya actividad se pretende determinar (Teuber y Cerny 1973), además de haber sido utilizada por Cerny en 1976 para la diferenciación entre bacterias gram positivas y gram negativas.

La preparación de la dilución del sustrato al 0,1 % se realizó pesando en un matraz aforado de 10 ml, con una precisión de una décima de mg, 0,01 g de L-alanina-4-nitroanilida y enrasando posteriormente hasta el volumen total del matraz con agua ultrapura estéril. Agitando suavemente por rotación se facilitó la disolución y cuando ésta se completó se transfirió a un frasco estéril con cierre hermético.

Todas las operaciones anteriores, incluida la pesada, se realizaron bajo campana de flujo laminar utilizando siempre material estéril y provistos de mascarilla y guantes quirúrgicos.

Aunque la solución de sustrato, preparada en las condiciones anteriores y conservada en refrigeración a 4 °C es bastante estable y en la determinación de la actividad aminopeptidásica siempre se realiza una compensación por blanco, se limitó el periodo máximo de utilización a 1 semana.

Para realizar la prueba se tomaron 6 ml. de la muestra y se repartieron en dos alícuotas de 3 ml. que se denominaron muestra y blanco.

Se adicionaron 250 µl de sustrato a la muestra y se incubó durante 2 horas a 37 °C. Durante el tiempo de incubación la muestra se agitó en un agitador rotativo a 120 r.p.m. Una vez finalizada la incubación se procedió a centrifugar la muestra a 1200 g para clarificar el medio. El sobrenadante se filtró a través de un filtro estéril de 0,45 µm.

y, finalmente, se leyó la absorbancia del filtrado a 390 nm. en un espectrofotómetro de ultravioleta-visible Shimadzu UV-1603.

La alícuota utilizada como blanco se mantuvo durante 2 horas en refrigeración a 4 °C. Posteriormente, de forma paralela a la muestra, se centrifugó a 1200 g para clarificación. Finalmente se añadió el sustrato y se filtró a través de un filtro estéril de 0,45 μm y su absorbancia a 390 nm se utilizó como compensación de la lectura espectrofotométrica.

2.4.4. CONTROL DE CALIDAD DE LA LECTURA ESPECTROFOTOMÉTRICA.

La obtención de medidas de absorbancia correctas con el uso de espectrofotómetros de ultravioleta-visible depende en gran medida del estado de mantenimiento y calibración de los mismos. Las condiciones de trabajo en que se utilizó el equipo fueron las adecuadas (ambiente exento de polvo, no incidencia de luz solar directa etc.).

La lectura espectrofotométrica se mantuvo siempre en condiciones analíticas óptimas. Para ello, se realizaron periódicamente, de acuerdo con las recomendaciones e instrucciones de la firma suministradora, las siguientes operaciones de verificación y calibración:

- Alineación del compartimento de la célula de lectura (mensualmente)
- Verificación de la exactitud de las lecturas de la absorbancia (trimestralmente).
- Comprobación de la exactitud de las longitudes de onda (trimestralmente).
- Cálculo de la incertidumbre de la medida de la absorbancia (semestralmente).

Para verificar la exactitud de las absorbancias leídas por el equipo se utilizaron dos filtros patrón de vidrio, color gris neutro. Para verificar la exactitud de la longitud de onda del equipo se utilizó un filtro patrón de óxido de holmio. Estos juegos de filtros eran de la marca HELLMA y sus características se exponen en las tablas 2.1 y 2.2.

Tabla 2.1.

Absorbancias a diferentes longitudes de onda e incertidumbre asociada de dos filtros patrón de vidrio (HELLMA) utilizadas en la verificación de la exactitud de las lecturas de absorbancia.

FILTRO	Nº CATALOGO	Nº SERIE	ABSORBANCIA A LAS LONGITUDES DE ONDA ESPECIFICADAS					Incertidumbre de absorbancia asociada a la medida del patrón
			440	465	546	590	635	
F3	666-F3	E-198	0.502	0.458	0.470	0.498	0.486	0.004
F4	666-F4	E-092	0.974	0.904	0.928	0.965	0.920	0.007

Tabla 2.2.

Picos de absorbancia máxima a diferentes λ y su incertidumbre asociada generadas por un filtro patrón de óxido de holmio (HELLMA)

FILTRO	Nº CATALOGO	Nº SERIE	PICOS DE ABSORBANCIA MAXIMA A LAS λ ESPECIFICADAS					Incertidumbre de longitud de onda asociada al patrón
			279	361	453	536	638	
F1	666-F1	E-512	279,35	360,90	453,60	536,45	637,90	0,25

2.5. PROTOCOLOS ESPECÍFICOS DE TRABAJO.

2.5.1. INVESTIGACIÓN, EN PRESENCIA DE CARNE, DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA DE MUESTRAS CON BAJA O NULA CARGA BACTERIANA.

En la propia carne o sus jugos pueden existir enzimas aminopeptidasas que enmascaren la actividad aminopeptidásica de las bacterias gram negativas que se recogen de la matriz. No resulta nada fácil recolectar bacterias de la carne picada sin

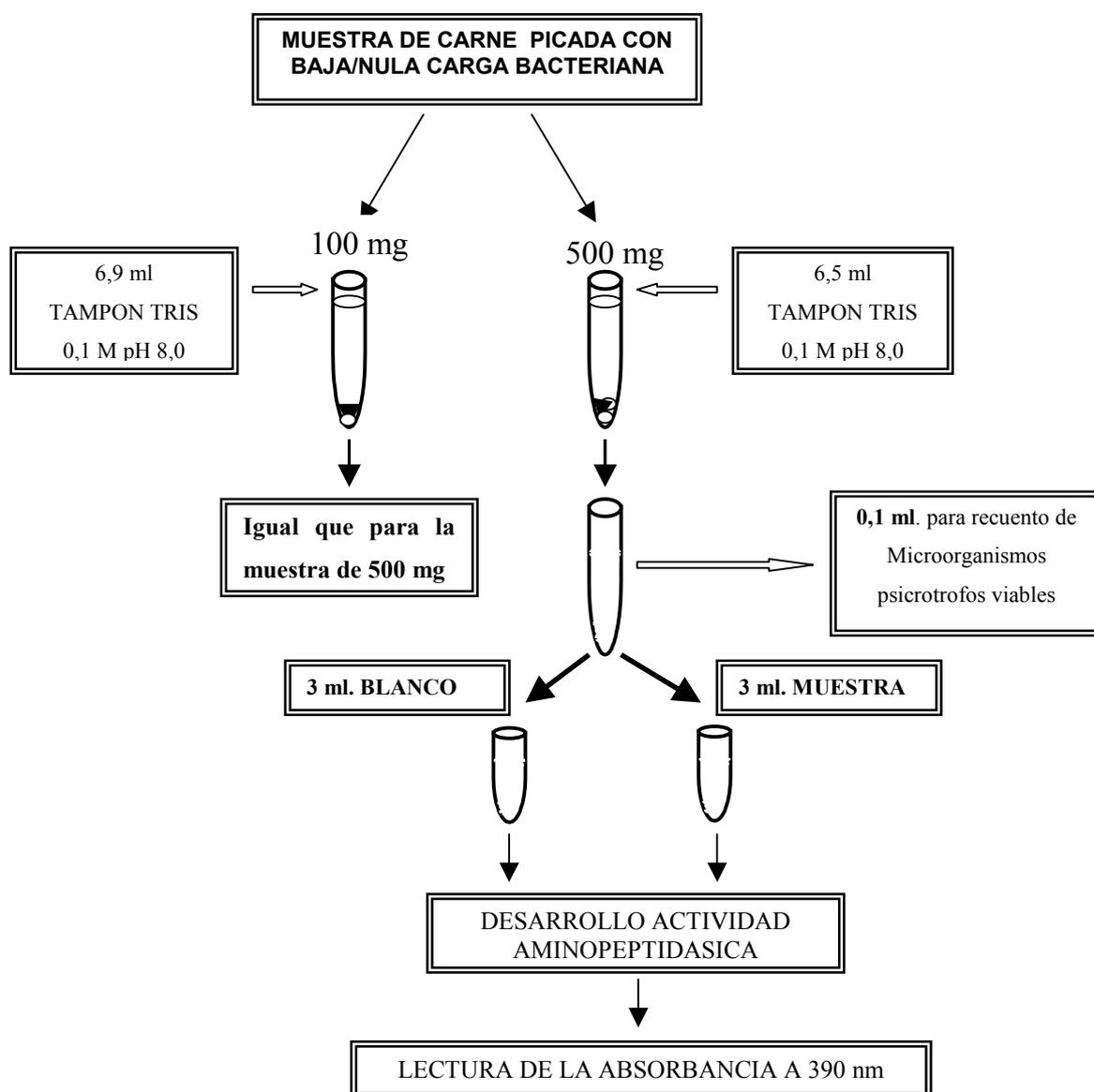


Figura 2.2 Esquema del protocolo de trabajo para determinación de actividad aminopeptidásica en carne con baja /nula carga bacteriana en presencia de la carne.

arrastrar al tiempo partículas o jugos procedentes de la misma. La estrategia que se diseñó para comprobar como influía la presencia de estos restos cárnicos y si la prueba podría llevarse a cabo o no en presencia de los mismos se recoge en la figura 2.2.

Partiendo de una muestra obtenida según el procedimiento expuesto en el apartado 2.4.1 se tomaron cantidades de 100 y de 500 mg. de carne que se introdujeron en sendos tubos de ensayo. Mediante la adición de tampón TRIS 0,1 M pH 8,0 se llevó a un volumen total de 7 ml. La preparación del tampón TRIS 0,1 M pH 8,0 se realizó siempre por volúmenes de 500 ml. pesando 6,057 g del producto en polvo en matraz aforado de 500 ml y añadiendo agua ultrapura hasta completar el volumen total; una vez conseguida la disolución del producto mediante agitación suave, se procedió a ajustar el pH adicionando ácido clorhídrico 0,1 M hasta alcanzar el pH 8,0 deseado. Una vez preparado se procedió a esterilizarlo en autoclave a 121°C durante 15 minutos, comprobando el pH tras la esterilización.

Se añadieron 6,9 ml. del tampón en tubos que contenían 100 mg. de muestra y 6,5 ml. en los que contenían 500 mg; a continuación, se homogeneizó la mezcla con un agitador de tubos rotativo. Las adiciones de tampón dieron como resultado unas diluciones de 1/70 y de 1/14 para las muestras con 100 mg y 500 mg, respectivamente.

De cada tubo se tomó una alícuota de 0,1 ml para llevar a cabo un recuento en placa de microorganismos psicrotrofos viables de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 2.4.2

Con el volumen restante de cada tubo se procedió a la determinación de la actividad aminopeptidásica de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 2.4.3

2.5.2. ESTABLECIMIENTO DE LA RELACIÓN ENTRE CARGA BACTERIANA Y ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN.

Para determinar la actividad aminopeptidásica en las diferentes fracciones que se obtienen por centrifugación del extracto filtrado procedente del lavado de una muestra de carne con muy baja carga bacteriana y establecer la relación existente entre esta actividad aminopeptidásica y la tasa bacteriana en dicha fracción, se diseñó el protocolo de trabajo que se expone de forma esquemática en la figura 2.3.

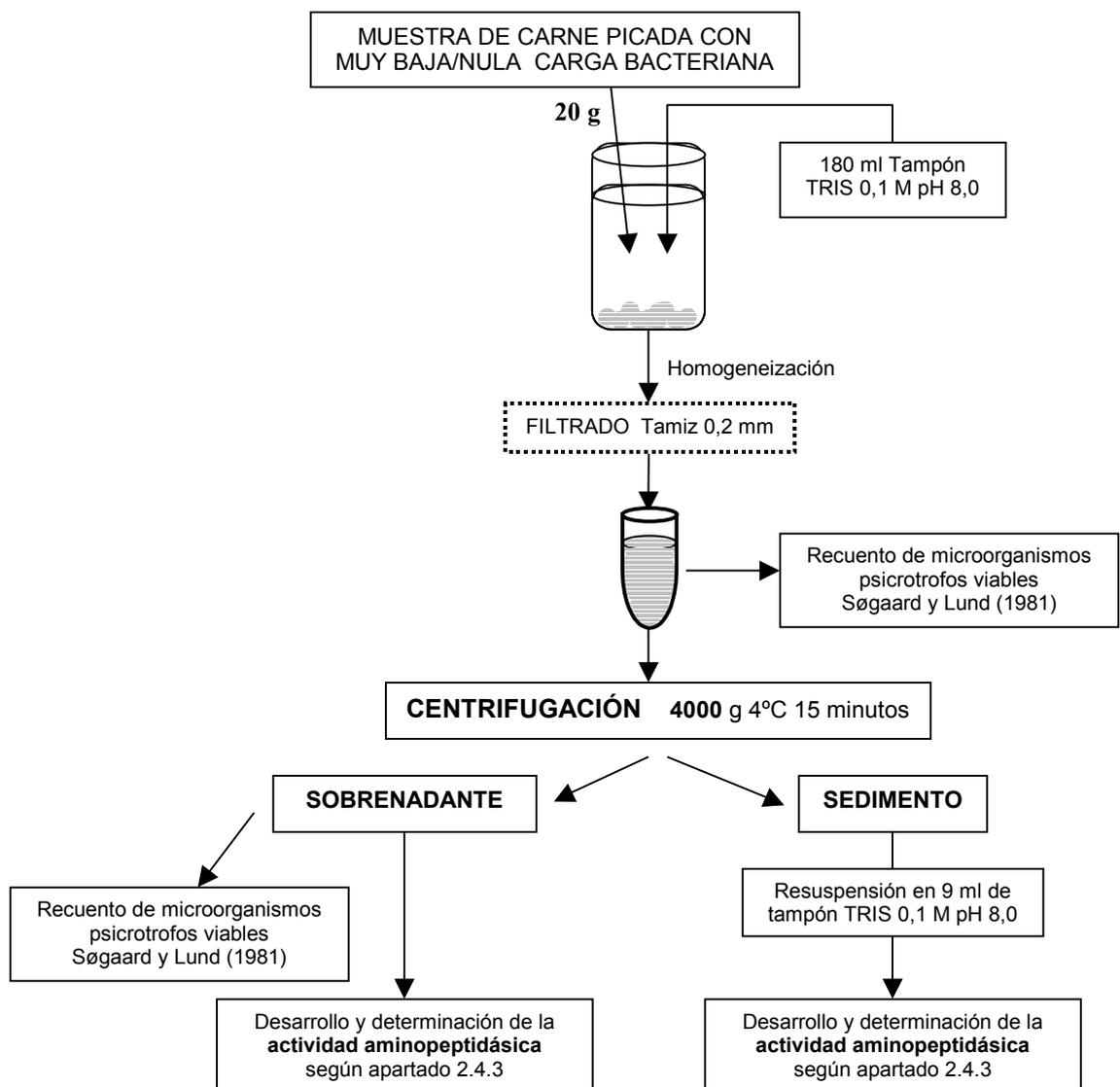


Figura 2.3 Esquema del protocolo de trabajo para establecer la relación entre carga bacteriana y la actividad aminopeptidásica de diferentes fracciones obtenidas por centrifugación.

Se partió de una muestra obtenida según lo expuesto en el apartado 2.4.1 con una carga bacteriana nula o muy reducida. Se tomaron 20 g de esta muestra de carne picada y se añadieron 180 ml de tampón TRIS 0,1 M pH 8,0, de tal forma que se obtuvo la dilución 10^{-1} . La pesada de la muestra, la introducción de ésta en la bolsa para su homogeneización y la adición del tampón se realizaron en campana de flujo laminar.

Posteriormente, se procedió a homogeneizar la muestra en un homogeneizador de palas “Stomacher” durante 30 segundos. Si bien las bolsas utilizadas para la homogeneización estaban dotadas de un filtro interior de nailon, se procedió a un segundo filtrado a través de un tamiz metálico de 0,20 mm de tamaño de malla para reducir al mínimo el paso de partículas de carne. Este filtrado se recolectó en un matraz estéril y del mismo se tomaron, por una parte, 0,1 ml para proceder al recuento de microorganismos psicrotrofos viables de acuerdo con el método expuesto en el apartado 2.4.2, y, por otra, 24 ml que fueron posteriormente centrifugados a 4000 g durante 15 minutos a 4 °C

Una vez que se centrifugó el filtrado, se obtuvo por una parte el sobrenadante, y por otra, el sedimento. Del sobrenadante se tomó 1ml para realizar un recuento de microorganismos psicrotrofos viables de acuerdo a lo establecido en el apartado 2.4.2 y otros 6 ml. con los que se realizó la prueba para el desarrollo de la actividad aminopeptidásica siguiendo el procedimiento del apartado 2.4.3

El sedimento se redisolvió en 9 ml de tampón TRIS 0,1 M pH 8,0 de los que se tomaron, como en el caso del sobrenadante, 6 ml para el desarrollo de la actividad aminopeptidásica. El recuento de este sedimento se estimó como la diferencia entre el recuento del filtrado menos el recuento del sobrenadante.

Como se desprende del protocolo diseñado, la necesidad de que las condiciones de pH en el que se desarrolla la actividad aminopeptidásica fueran las mismas, tanto en el sobrenadante como en el sedimento redisolto, es lo que exigió realizar la dilución inicial 10^{-1} con tampón TRIS 0,1M pH 8,0.

2.5.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE RECUPERACIÓN

Para buscar las mejores condiciones de recuperación de microorganismos presentes en la muestra, es decir, en un número suficiente y sin interferencias en el desarrollo de la actividad aminopeptidásica debidas a aminopeptidasas de origen cárnico, se desarrolló un procedimiento de trabajo que podemos ver de forma esquemática en la figura 2.4.

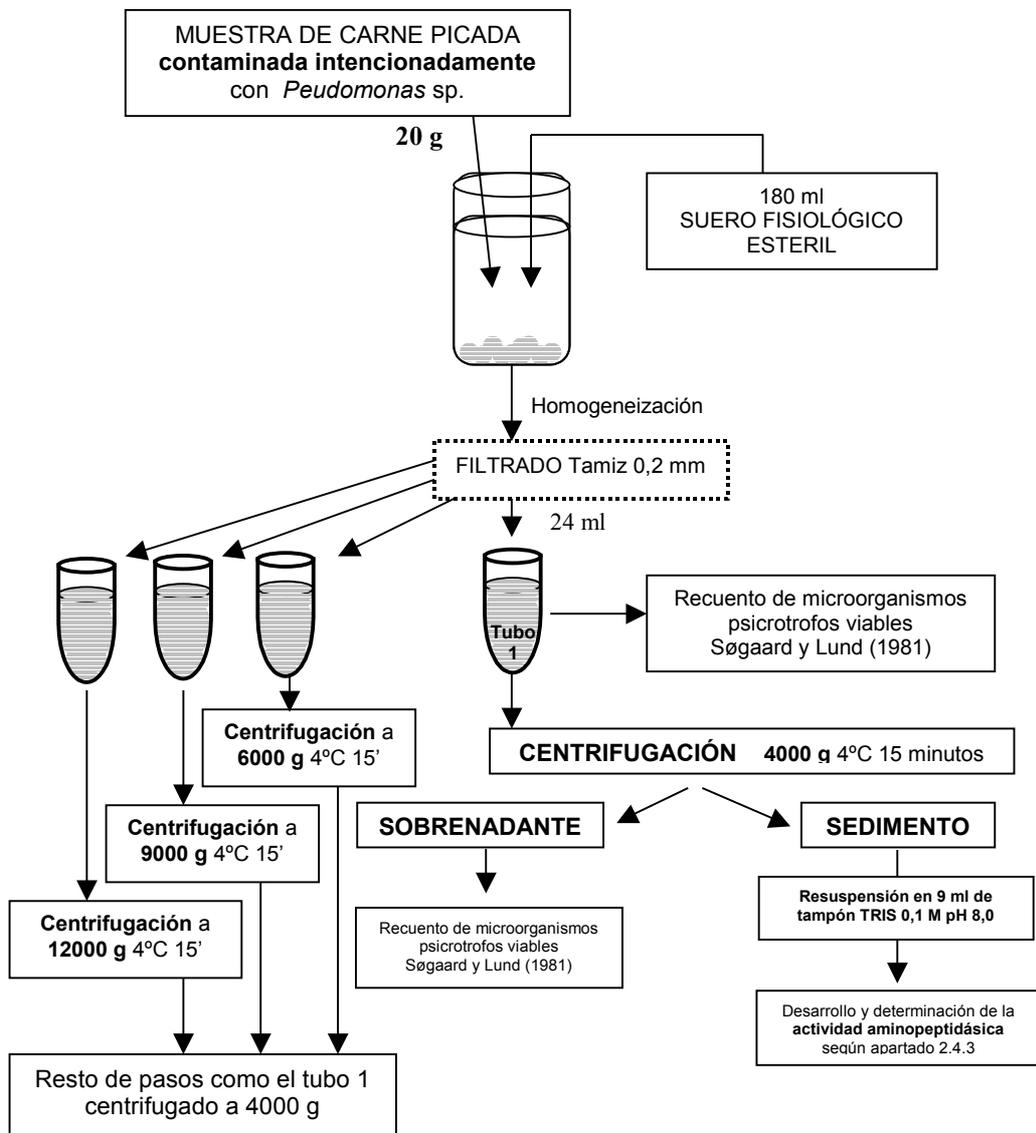


Figura 2.4 Esquema del protocolo para optimización de las condiciones de recuperación

La muestra que se procesaba debía tener cargas bacterianas variables de tal forma que los resultados que se obtuvieran cubriesen el mayor intervalo posible, desde muestras con una carga bacteriana baja hasta muestras con signos evidentes de alteración. Para ello, se partió de 20 g de una muestra de carne picada preparada como se expone en el apartado 2.4.1 y se contaminó intencionadamente con distintas cantidades de un cultivo en medio líquido de agua de peptona tamponada de *Pseudomonas* sp. Una vez homogeneizada la muestra con el inóculo, se procedió, en unos casos, al procesado directo y, en otros, a su almacenamiento en condiciones de refrigeración (3-8°C) durante periodos que oscilaron entre 6 h y 15 días.

La recogida de los microorganismos presentes en la muestra se hizo mediante la adición de 180 ml de suero fisiológico estéril y homogeneizando durante 30 segundos en un homogeneizador de palas “Stomacher”, con lo que se consiguió la dilución 10^{-1} . Esta dilución previamente filtrada a través del filtro de nailon presente en la propia bolsa de homogeneización se filtró una segunda vez a través de un tamiz metálico de 0,2 mm de tamaño de malla. Este filtrado se recogió en un matraz estéril y a partir de él se procedió, por una parte, al recuento de microorganismos psicrotrofos viables y, por otra, a la toma de cuatro alícuotas de 24 ml. que se centrifugaron durante 15 minutos a 4 °C a 12.000, 9.000, 6.000 y 4.000 g respectivamente.

Las características del rotor de la ultracentrífuga utilizada hicieron que hubiera que repartir la alícuota de 24 ml en 3 tubos de policarbonato de 9 ml de volumen interno. Una vez concluida la centrifugación se reunieron y homogeneizaron los sobrenadantes de los 3 tubos en un matraz estéril del que se tomó la cantidad necesaria para realizar el recuento de microorganismos psicrotrofos viables de acuerdo al procedimiento expuesto en el apartado 2.4.2

El sedimento de los 3 tubos se resuspendió mediante la ayuda de un agitador rotativo de varilla estéril intercambiable en 9 ml, 3 por cada tubo, de tampón TRIS 0,1M pH 8,0 y se recolectó y homogeneizó finalmente en un solo tubo, tomándose del mismo 6 ml para realizar el desarrollo de la actividad aminopeptidásica de acuerdo a lo expuesto en el apartado 2.4.3. Todas estas operaciones se realizaron bajo campana de flujo laminar.

Si bien la flora bacteriana presente en la muestra es básicamente monoespecífica, debido a la preparación de la muestra y a la posterior contaminación experimental de la misma, no se eligió como temperatura de incubación la temperatura de crecimiento óptimo de esta especie, sino que se siguió el procedimiento habitual de recuento de microorganismos psicrotrofos, ya que de esta manera se consideró que el recuento obtenido se acercaba más a las condiciones reales de crecimiento bajo condiciones de refrigeración.

2.5.4. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL LAVADO DEL SEDIMENTO EN LA RECUPERACIÓN Y LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA.

Con objeto de evaluar la influencia que, sobre la recuperación de microorganismos y la actividad aminopeptidásica final, pudiera tener la inclusión de un lavado del sedimento que se obtiene tras la centrifugación se siguió el plan de trabajo que se expone de forma esquemática en la figura 2.5.

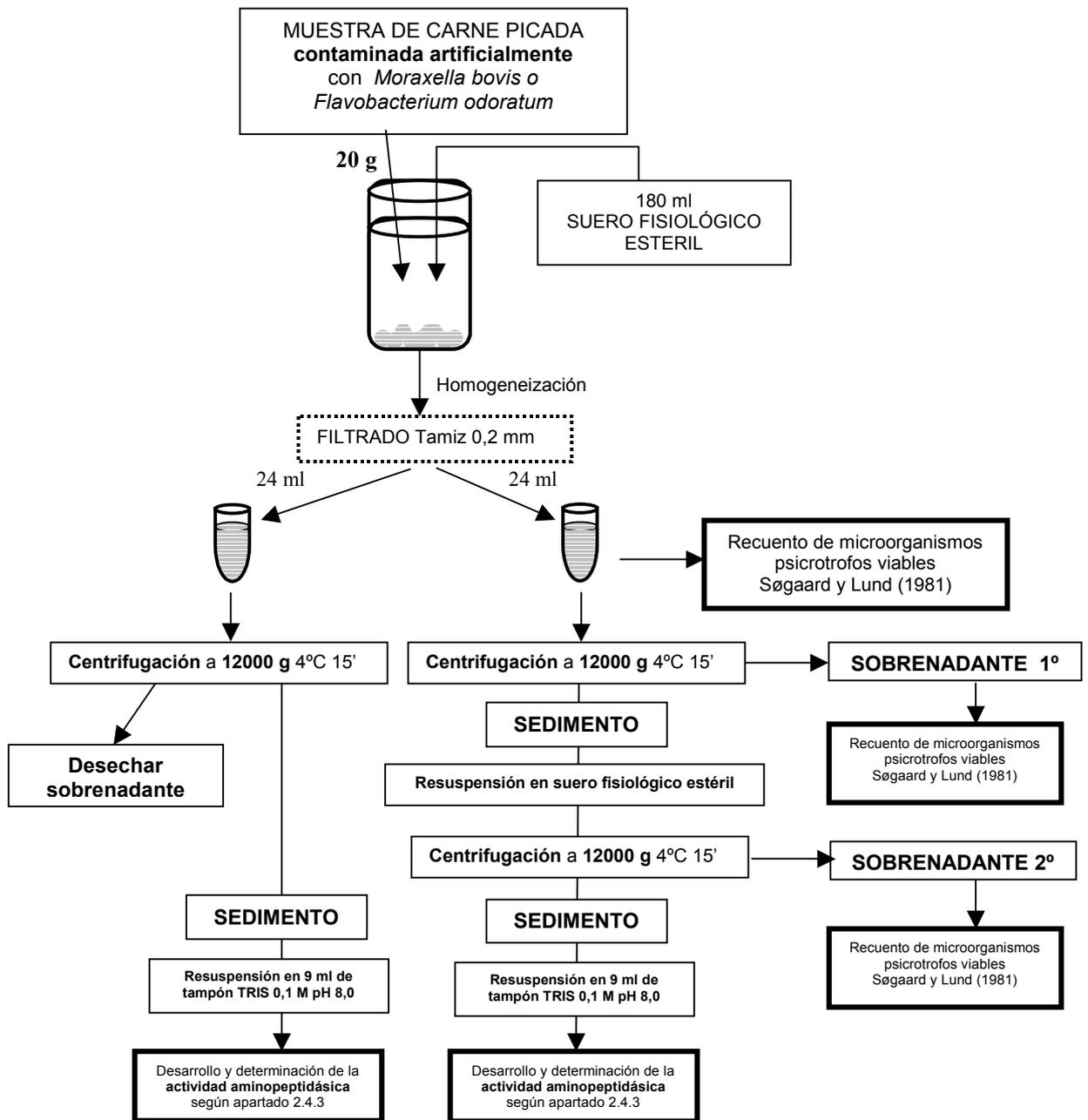


Figura 2.5 Esquema del protocolo para evaluar la influencia de la inclusión de un lavado del residuo en la recuperación y la actividad aminopeptidásica.

Se procesó la misma muestra por duplicado siguiendo dos procedimientos paralelos. Por una parte se siguió la metódica expuesta en el apartado 2.5.3, eligiendo 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C como condiciones de centrifugación, por las razones que se exponen en el apartado correspondiente del capítulo de resultados y discusión. Por otra parte, se incluyó en esta misma metódica un nuevo paso consistente en un lavado mediante resuspensión del sedimento obtenido tras la centrifugación en suero fisiológico estéril, seguido de una nueva centrifugación en las mismas condiciones citadas, antes de volver a diluir definitivamente en 9 ml de tampón TRIS para realizar la determinación de la actividad aminopeptidásica.

Al igual que en el apartado 2.5.3, las muestras se inocularon con distintas cantidades de los cultivos bacterianos y en algunos casos se procedió al almacenamiento de la muestra en condiciones de refrigeración durante periodos que oscilaron entre 6 h. y 15 días para conseguir cargas bacterianas finales variables, que cubrieran desde muestras con carga baja hasta muestras muy alteradas; datos necesarios para poder elaborar las rectas de regresión correspondientes.

Las bacterias utilizadas fueron *Moraxella bovis* y *Flavobacterium odoratum*, ambas procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo, según se indica en el apartado 2.1.2.

Las contaminaciones de la muestra se hicieron en todos los casos utilizando como material contaminante una sola de las dos especies bacterianas y siguiendo la misma metódica que se expone en el apartado 2.5.3.

Se obtuvieron dos sobrenadantes, a saber, sobrenadante 1º y sobrenadante 2º, procedentes de la primera y de la segunda centrifugación respectivamente. En estos sobrenadantes, al igual que en la muestra, se realizaron los recuentos de microorganismos psicrotrofos viables según el procedimiento del apartado 2.4.2 descartando como temperatura de incubación las óptimas respectivas de cada especie, por las mismas razones que las expuestas en el último párrafo del apartado 2.5.3.

El paso final común a ambos procedimientos paralelos consistió en la determinación de la actividad aminopeptidásica según el procedimiento del apartado 2.4.3.

2.5.5. ESTABLECIMIENTO DE LA CORRELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA Y EL RECuento DE MICROORGANISMOS PSICROTROFOS VIABLES EN CARNE PICADA CONTAMINADA EXPERIMENTALMENTE.

Para estimar el grado de correlación entre la actividad aminopeptidásica generada por las bacterias gram negativas presentes en una muestra de carne picada y el recuento de microorganismos psicrotrofos viables obtenido mediante técnica de recuento en placa tradicional se procedió siguiendo básicamente la misma metodología que se expone en el apartado 2.5.3, si bien en este caso las contaminaciones de la muestra se realizaron con tres especies bacterianas distintas.

Las bacterias utilizadas fueron *Ps. fluorescens*, *Ps. putida* y *Ps. fragi*. Todas ellas procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo según se manifestó en el apartado 2.1.2

Al igual que en los apartados 2.5.3 y 2.5.4, las muestras se inocularon con distintas cantidades de los cultivos bacterianos en agua de peptona y se procedió, en algunos casos, a su análisis inmediato y, en otros, a su almacenamiento en refrigeración con el mismo propósito expuesto en apartados anteriores. Las contaminaciones de la muestra se hicieron, en cada caso, utilizando como material contaminante una sola de las 3 especies bacterianas.

Las condiciones de centrifugación fueron de 12000 g durante 15 minutos a 4 °C.

Los recuentos bacterianos, igual que en el apartado anterior, se realizaron mediante el procedimiento descrito en 2.4.2, descartando como temperatura de incubación las óptimas respectivas de cada especie, ya que éstas hubieran podido generar recuentos que no se corresponden con los reales en condiciones de refrigeración.

2.5.6. PROCESADO DE MUESTRAS COMERCIALES DE CARNE PICADA

Con objeto de obtener datos a partir de muestras reales de carne picada, tal y como se dispensa en los establecimientos comerciales, se aplicó el mismo procedimiento seguido con las muestras contaminadas experimentalmente. Este procedimiento permite establecer la correlación existente entre los recuentos de microorganismos psicrotrofos viables presentes en la muestra y la absorbancia a 390 nm de la p-nitroanilina generada por el desdoblamiento del sustrato, la L-alanina-p-nitroanilida, por parte de las aminopeptidasas de las bacterias gram negativas presentes en la muestra que aleatoriamente llegan a ella y se multiplican durante el almacenamiento bajo refrigeración. Las muestras adquiridas según lo expuesto en el apartado 2.1.1.b tenían, pues, la microbiota bacteriana natural propia del producto.

Siguiendo el mismo criterio que en procedimientos anteriores, algunas muestras fueron tratadas inmediatamente al llegar al laboratorio y otras se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis.

2.5.7. INVESTIGACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL pH Y DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO BACTERIANO EN LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA.

Con objeto de comprobar si las condiciones del medio en que se desarrollan las bacterias modifican en algún sentido la actividad aminopeptidásica que generan, se procedió de acuerdo con las etapas reseñadas en la figura 2.6.

Se trabajó con tres especies bacterianas: *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* y *Flavobacterium odoratum*. Se cultivaron cada una a valores de pH de 5; 5,5; 6 y 6,5, manteniendo constante la temperatura a 7 °C para todos los cultivos. Por otra parte, se realizaron cultivos a 12 °C en medios líquidos ajustados a valores de pH 5,5 y 6.

En todos los casos se utilizó como medio de cultivo TSB (triptone soya broth) preparado de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El ajuste del medio al pH requerido se consiguió añadiendo las cantidades necesarias, en cada caso, de ácido clorhídrico o hidróxido sódico 0,1 M, esterilizándose finalmente a 121 °C durante 10 minutos.

Cada uno de los cultivos (a su temperatura y pH determinado) se dejó en incubación hasta que alcanzó una masa celular capaz de generar una absorbancia de 0,8 UA a 600 nm. Posteriormente, se procedió a tomar una alícuota del cultivo y se ajustó la absorbancia a 600 nm, a valores comprendidos entre 0,6 y 0,7 adicionando tampón TRIS 0,1 M pH 8,0.

Con la finalidad de obtener actividades aminopeptidásicas a partir de cultivos con distinta masa celular, se tomaron, a partir de la dilución ajustada, 3 alícuotas de 8, 2 y 0,4 ml, que se transfirieron a sendos tubos de ensayo; a cada uno de estos tubos se añadieron 24, 18 y 19,6 ml de tampón TRIS 0,1 M pH 8,0, respectivamente consiguiendo de esta forma diluciones de 1/4, 1/10 y 1/50.

Con la adición de tampón TRIS para el ajuste de la primera dilución, así como para la preparación de las siguientes diluciones, se garantizó que las condiciones de pH en que se desarrolla la reacción enzimática fueran las idóneas (Pérez de Castro 1989).

De cada una de las diluciones se tomaron 6 ml y se determinó la actividad aminopeptidásica según el procedimiento expuesto en el apartado 2.4.3

Con los valores obtenidos de masa celular del cultivo, expresada como absorbancia a 600 nm y su correspondiente actividad aminopeptidásica, expresada como absorbancia a 390 nm, se calculó un valor relativo fruto del cociente entre ambos, que se denominó actividad aminopeptidásica específica (AAE).

$$AAE = \frac{\text{Absorbancia a } 390 \text{ nm}}{\text{Absorbancia a } 600 \text{ nm}}$$

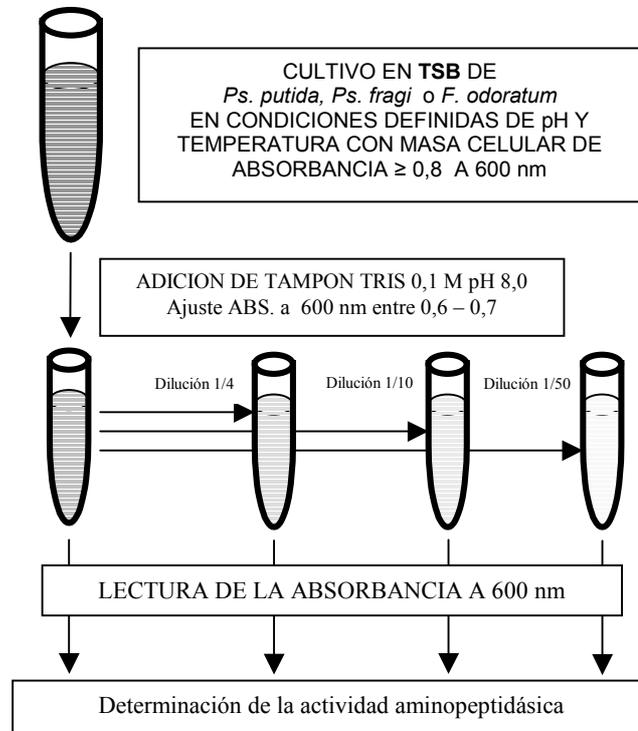


Figura 2.6 Esquema del protocolo de trabajo para determinación de la actividad aminopeptidásica específica

2.6. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizaron las funciones estadísticas y las herramientas de análisis de datos del programa EXCEL de Microsoft.

Las herramientas de análisis de datos utilizadas fueron:

- Estadística descriptiva.
- Coeficiente de correlación.
- Prueba t para medias de dos muestras emparejadas.
- Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales.

- Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales.
- Regresión.
- Análisis de varianza (ANOVA) de un factor.
- Prueba F de Snédecor.

Previo a la realización de cualquier método paramétrico de comparación de medias, se aplicó de forma rutinaria el test de Cochran o prueba de razón de varianzas que informara respecto a la similitud de las varianzas de los grupos a comparar para, de este modo, utilizar la prueba más adecuada en cada caso. Los criterios, documentación y tablas utilizadas fueron los establecidos por Viedma (1976), Carrasco (1989), Pértega y Pita (2001) y Lowry (2002).

Respecto al análisis de varianza, Lowry (2002) mantiene que es una prueba muy robusta, de tal forma que siempre que el tamaño de las muestras a comparar sea idéntico, puede utilizarse generando resultados satisfactorios incluso aunque las varianzas de los grupos no sean similares. En el presente trabajo, dado que en todas las ocasiones en que se ha utilizado esta prueba ha sido sobre muestras de idéntico tamaño, se ha tenido en cuenta este criterio ya que, según el mismo autor, de esta forma se evita la utilización de pruebas no paramétricas, generalmente de menor precisión.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de evitar las repeticiones y las referencias constantes que se producen al tratar los resultados y la discusión de los mismos en capítulos distintos, se ha decidido abordar ambos de forma conjunta en uno solo. El orden de exposición viene determinado por el orden cronológico en el que se realizaron las diferentes experiencias, que por otra parte, coincide con el utilizado en el apartado de material y métodos para la descripción de los protocolos específicos del trabajo realizados.

3.1. ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA, EN PRESENCIA DE CARNE, DE MUESTRAS CON BAJA O NULA CARGA BACTERIANA.

Con esta prueba preliminar se determinó la actividad aminopeptidásica de la muestra siguiendo una metodología similar a la utilizada por Pérez de Castro (1989) para la estimación de bacterias psicotrofas gram negativas en leche y en superficies cárnicas. En este caso, el análisis se realizó en presencia de carne picada y sus jugos y constituyó una prueba previa para evaluar su viabilidad en estas condiciones o bien comprobar si la posible liberación de las aminopeptidasas de origen cárnico durante el picado interferían la reacción y obligaban a una adaptación o modificación del procedimiento.

Siguiendo el protocolo especificado en el apartado 2.5.1, se trabajó con 24 muestras de carne de diferentes especies, previamente tratadas según el procedimiento general 2.4.1 del mismo capítulo. El objetivo de esta metodología fue disminuir la carga microbiana natural para que la actividad aminopeptidásica de origen bacteriano fuera la menor posible y poder así garantizar que, en caso de detectarse actividad, esta, fuera de origen casi exclusivamente cárnico. Los resultados que se obtuvieron se exponen en la tabla 3.1. Los valores medios de actividad aminopeptidásica, expresada como absorbancia a 390 nm y de los recuentos de microorganismos psicotrofos viables fueron de 2,47 UA y de $3,3 \times 10^2$ respectivamente.

A primera vista se puede comprobar que el tratamiento de higienización de la muestra disminuyó la microbiota natural, pero no la eliminó completamente. No obstante, si tenemos en cuenta los datos publicados acerca del tema (Gill 1986, Kraft 1992), que indican que una carne con una tasa inicial del orden de 10^4 ufc/g es de una

Tabla 3.1
Actividad aminopeptidásica de muestras de carne picada
de diferentes especies, con baja o nula carga bacteriana.

Muestra	Especie	Peso de la muestra (mg)	Actividad aminopeptidásica (Abs a 390 nm)	ufc/g de microorganismos psicrotrofos viables	Log ufc/g
1	vacuno	100	2,53	$4,2 \times 10^2$	2,62
	vacuno	500	2,39	$5,1 \times 10^2$	2,71
2	vacuno	100	2,62	$7,4 \times 10^1$	1,87
	vacuno	500	2,44	$6,9 \times 10^2$	2,84
3	vacuno	100	2,36	$5,3 \times 10^1$	1,72
	vacuno	500	2,69	$1,1 \times 10^2$	2,04
4	vacuno	100	2,48	$9,8 \times 10^1$	1,99
	vacuno	500	2,69	$7,1 \times 10^2$	2,85
5	porcino	100	1,98	$9,5 \times 10^0$	0,98
	porcino	500	2,63	$8,0 \times 10^1$	1,90
6	porcino	100	2,23	$9,0 \times 10^2$	2,95
	porcino	500	2,84	$2,1 \times 10^2$	2,32
7	porcino	100	2,45	$3,2 \times 10^2$	2,51
	porcino	500	2,69	$7,6 \times 10^2$	2,88
8	porcino	100	2,85	$2,6 \times 10^1$	1,41
	porcino	500	2,45	$8,9 \times 10^0$	0,95
9	cordero	100	2,42	$2,3 \times 10^3$	3,36
	cordero	500	2,54	$1,3 \times 10^3$	3,11
10	cordero	100	2,83	$6,4 \times 10^2$	2,81
	cordero	500	2,69	$8,9 \times 10^2$	2,95
11	cordero	100	1,99	$8,6 \times 10^1$	1,93
	cordero	500	2,67	$6,8 \times 10^1$	1,83
12	cordero	100	2,15	$1,5 \times 10^2$	2,18
	cordero	500	2,55	$8,9 \times 10^1$	1,95
13	conejo	100	2,52	$3,0 \times 10^2$	2,48
	conejo	500	2,81	$6,0 \times 10^2$	2,78
14	conejo	100	2,41	$9,2 \times 10^1$	1,96
	conejo	500	2,66	$6,7 \times 10^1$	1,83
15	conejo	100	2,60	$5,6 \times 10^1$	1,75
	conejo	500	1,77	$8,7 \times 10^1$	1,94
16	conejo	100	2,58	$1,2 \times 10^2$	2,08
	conejo	500	2,16	$3,1 \times 10^2$	2,49
17	pollo	100	2,31	$3,7 \times 10^2$	2,57
	pollo	500	2,52	$1,1 \times 10^2$	2,04
18	pollo	100	2,49	$8,4 \times 10^2$	2,92
	pollo	500	2,59	$6,2 \times 10^2$	2,79
19	pollo	100	2,47	$6,8 \times 10^1$	1,83
	pollo	500	2,78	$6,7 \times 10^1$	1,83
20	pollo	100	1,97	$1,6 \times 10^2$	2,20
	pollo	500	2,16	$2,4 \times 10^2$	2,38
21	pavo	100	2,34	$6,0 \times 10^2$	2,78
	pavo	500	2,02	$5,4 \times 10^2$	2,73
22	pavo	100	2,38	$7,6 \times 10^1$	1,88
	pavo	500	2,47	$8,6 \times 10^1$	1,93
23	pavo	100	2,67	$6,4 \times 10^1$	1,81
	pavo	500	2,99	$5,7 \times 10^1$	1,76
24	pavo	100	1,88	$1,2 \times 10^1$	1,08
	pavo	500	2,69	$6,5 \times 10^1$	1,81

gran calidad microbiológica, comprobamos que la reducción de la tasa microbiana fue importante, ya que, asumiendo que las muestras tuvieran, en el mejor de los casos, tasas como la indicada, el tratamiento ocasionó, como mínimo, un descenso de aproximadamente dos unidades logarítmicas. Por otra parte, estos resultados son comparables con los obtenidos por otros autores como Yi-mei-Sun y Okerman (2001), quienes aplicando unos tratamientos de higienización de la carne similares en sus trabajos, obtuvieron cargas del orden de 10^2 ufc/g.

La falta de esterilidad de la muestra, no desvirtúa en ningún caso la validez de la experiencia realizada ya que todos los recuentos obtenidos se encuentran muy por debajo del límite de detección de la prueba de la p-nitroanilina, establecido por Pérez de Castro y col. (1988), Pérez de Castro (1989) y Alvarado y col. (1992), en torno a 10^4 - 10^5 ufc/cm² de carne. En estos trabajos se pone de manifiesto que cargas bacterianas del orden de magnitud de las obtenidas en la experiencia que se describe en este apartado no deberían generar actividad aminopeptidásica detectable de acuerdo con las rectas de regresión halladas por Pérez de Castro (1989). Sin embargo, en este caso se obtuvieron valores de absorbancia muy elevados, que no pueden atribuirse a las bacterias presentes en la muestra, sino que, obviamente, provienen de las aminopeptidasas nativas de la carne liberadas durante las operaciones de picado y homogeneización en el stomacher.

Si se comparan las muestras de 100 y 500 mg en cada caso (Tabla 3.1) se observa que, en la mayoría de ellas, la actividad aminopeptidásica desarrollada en presencia de 500 mg de carne fue mayor que la observada cuando se utilizaron 100 mg. No obstante, las diferencias halladas entre ambas no fueron las esperadas. En ningún caso se acercó siquiera la absorbancia de la muestra de 500 mg a ser cinco veces mayor que la de las muestras con 100 mg. Estos resultados hacen pensar que la reacción se encuentra saturada y el color desarrollado (y su correspondiente absorbancia) no es proporcional a los niveles de actividad enzimática procedentes de las bacterias presentes en la muestra. También hay que tener en cuenta la posible pérdida de linealidad que se produce cuando los valores de absorbancia sobrepasan las 1,2 UA.

De todas maneras, estos datos son de utilidad para el trabajo, ya que indican la necesidad de separar la carne y las bacterias de las muestras para determinar la actividad

aminopeptidásica de origen microbiano y así poder cuantificarlas. El coeficiente de correlación de Pearson entre la actividad aminopeptidásica de las muestras de la tabla 3.1, expresada como absorbancia a 390 nm y el logaritmo del recuento de microorganismos psicrotrofos viables de la muestra (ver apartados 2.4.3 y 2.4.2 del capítulo de material y métodos), arrojó valor de 0,11 lo que demuestra que, en estas condiciones, no se puede establecer ninguna correlación entre ambas variables.

La tabla 3.2 recoge, ordenados por especies, los resultados de las muestras en las que se procesaron 100 mg de carne. Los valores obtenidos con 500 mg se han desestimado de acuerdo con las consideraciones hechas anteriormente. Los datos de 100 mg son igualmente elevados y posiblemente también esta cantidad sea suficiente para saturar la reacción, por ello se ha renunciado a realizar con estos datos un estudio estadístico que permitiera ofrecer diferencias entre carnes de las distintas especies. No obstante, los datos que muestra la tabla 3.2 no evidencian grandes diferencias entre los valores obtenidos en cada uno de los grupos.

Tabla 3.2
Actividad aminopeptidásica expresada como absorbancia a 390 nm
generada por muestras de 100 mg de carne de diferentes especies

	vacuno	porcino	cordero	conejo	pollo	pavo
	2,53	1,98	2,42	2,52	2,31	2,34
	2,62	2,23	2,83	2,41	2,49	2,38
	2,36	2,45	1,99	2,60	2,47	2,67
	2,48	2,85	2,15	2,58	1,97	1,88
Media	2,50	2,38	2,35	2,53	2,31	2,31

Los trabajos de Nishimura y col. (1990) o Blanchard y Mantle (1996), informan sobre los distintos niveles de aminopeptidasas presentes en la carne de mamíferos y aves. Ambos autores coinciden en señalar que la carne de pollo, seguida por la de conejo, contiene niveles ligeramente superiores que la de otras especies. No obstante, se comprueba que la realización de la prueba de la p-nitroanilina para la detección de carga bacteriana, en presencia de la carne o sus jugos, incluso en pequeñas cantidades y con

independencia de la especie, satura la reacción haciéndose necesaria una adaptación del método para su aplicación en carnes picadas.

3.2. RELACION ENTRE CARGA BACTERIANA Y ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN.

Una vez comprobado que era imposible tratar de determinar la carga bacteriana de la carne picada con la prueba de la p-nitroanilina en presencia de la carne o sus jugos, la siguiente etapa consistió en localizar la actividad aminopeptidásica nativa de la carne e intentar eliminarla, sin que afectase al número de microorganismos contaminantes. Para ello, se procedió de acuerdo a lo especificado en el apartado 2.5.2, a partir de muestras con muy baja o nula carga bacteriana, preparada según el procedimiento 2.4.1.

Tabla 3.3

Actividad aminopeptidásica y recuentos de microorganismos psicrotrofos viables en las fracciones obtenidas mediante centrifugación a 4000 g del material de lavado y filtrado de muestras de carne picada

Especie	ufc/g de microorganismos psicrotrofos en el sedimento	Actividad aminopeptidásica (abs a 390 nm) en el sedimento	ufc/g de microorganismos psicrotrofos en el sobrenadante	Actividad aminopeptidásica (abs a 390 nm) en el sobrenadante
vacuno	1,0x10 ²	0,11	ND	0,73
vacuno	ND	0,00	ND	0,76
vacuno	6,0x10 ²	0,20	5,0x10 ¹	0,85
vacuno	ND	0,00	ND	0,99
vacuno	4,5x10 ¹	0,09	5,0x10 ⁰	0,84
vacuno	ND	0,05	ND	0,75
vacuno	3,0x10 ¹	0,10	6,0x10 ⁰	0,66
vacuno	ND	0,05	ND	1,05
vacuno	ND	0,00	ND	0,68
vacuno	1,2x10 ²	0,15	4,3x10 ¹	1,23
porcino	2,0x10 ²	0,12	3,5x10 ¹	0,65
porcino	ND	0,01	ND	0,94
porcino	ND	0,03	ND	0,45
porcino	7,0x10 ¹	0,04	ND	0,91
porcino	9,0x10 ¹	0,13	ND	0,71
porcino	ND	0,02	ND	0,79
porcino	6,2x10 ¹	0,14	1,0x10 ¹	0,86
porcino	1,0x10 ²	0,18	5,0x10 ¹	0,96
porcino	4,5x10 ²	0,14	3,0x10 ¹	0,62
porcino	ND	0,05	ND	0,59

ND: No detectado

A partir de las muestras de carne, se realizó un lavado para arrastrar las bacterias contaminantes y mediante centrifugación a 4000 g, se obtuvieron las fracciones de sobrenadante y sedimento, en las que se midió la actividad aminopeptidásica y se realizó el recuento de microorganismos psicrotrofos viables. De acuerdo con el citado protocolo, se procesaron un total de 20 muestras de carne de vacuno y porcino, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 3.3.

En primer lugar, hay que destacar que los resultados del tratamiento para disminuir la carga bacteriana resultaron más eficaces que los obtenidos en el apartado 3.1, con unos recuentos medios ligeramente superiores a 10^1 ufc/g. Estos recuentos más bajos pueden deberse a que, a la vista de los resultados obtenidos en muestras anteriores, se partió de filetes más gruesos, se realizó un tratamiento térmico más intenso y se eliminó la escara hasta una profundidad algo mayor. Así, en un 45 % de los casos fueron totalmente efectivos ya que no se constató crecimiento alguno de microorganismos psicrotrofos.

El sedimento presentó una actividad aminopeptidásica media de 0,08 UA a 390 nm y nunca superior a 0,2 UA, mientras que en el sobrenadante se obtuvo un valor medio de 0,80 UA, lo que supone, numéricamente, una actividad del orden de 10 veces superior. Aparte de estas diferencias tan claras, hay que decir que de todos es sabido que las medidas espectrofotométricas muy cercanas a cero suelen ofrecer un error mucho mayor debido al “ruido” del aparato y otras interferencias, que las determinaciones dentro del intervalo de mayor fiabilidad del equipo de medida habitualmente entre 0,08 y 1,0-1,2 UA. Por tanto, es muy posible que las absorbancias detectadas próximas a cero, sean únicamente ruido y que la diferencia entre la actividad aminopeptidásica del sedimento y del sobrenadante sea aun mayor.

La diferencia de absorbancias no fue proporcional a la diferencia de carga bacteriana existente entre ambas fracciones, que es del mismo orden, y, además, por otra parte en ningún caso alcanzaron el nivel de detección de la prueba de la p-nitroanilina (Pérez de Castro y col., 1988, Pérez de Castro, 1989, Alvarado y col., 1992). Por lo tanto, las diferencias deben tener su origen en los distintos niveles de aminopeptidasas procedentes de la carne que se recogieron en ambas fracciones. Algunos autores como

Blanchard y Mantle (1996) han propuesto una localización citoplasmática y lisosomal de las aminopeptidasas musculares y citan diversos procedimientos para extraerlas mediante picado y exposición a tampones. Esta localización explica los resultados obtenidos, ya que las aminopeptidasas liberadas durante el picado quedan, tras la centrifugación, en la fracción del sobrenadante de forma mayoritaria.

Tomando los valores medios de las 20 muestras y considerando que las medidas espectrofotométricas de la actividad aminopeptidásica del sedimento y del sobrenadante tienen el mismo error, se calcula que el 88,52 % de la actividad aminopeptidásica quedó en el sobrenadante. De todas maneras, ya se ha mencionado antes que el error en las cantidades más pequeñas (inferiores a 0,05) de absorbancia suelen ser mayores que los de las determinaciones en el intervalo de máxima fiabilidad del equipo, por lo que, es probable que el porcentaje real de actividad aminopeptidásica procedente de la carne sea incluso mayor que el expuesto en las líneas precedentes. No obstante, puede tenerse en cuenta que algunas de las muestras no eran estériles, ya que se detectaron bacterias en ellas y, por lo tanto, parte de la actividad aminopeptidásica registrada en el sedimento puede deberse también a la carga bacteriana residual retenida en el mismo. Pero debe decirse que esta actividad, aunque colabore en la suma total de la actividad aminopeptidásica, debería ser casi insignificante. De todas maneras se puede comprobar que, si tenemos en cuenta únicamente los resultados de las muestras en las que no se constató crecimiento bacteriano, las diferencias de actividad entre las fracciones sedimento y sobrenadante se incrementan, localizándose en este último el 97,12 % de la actividad.

Los resultados obtenidos permiten ser razonablemente optimistas, ya que al eliminar el sobrenadante, se elimina la mayor parte de las interferencias debidas a las aminopeptidasas cárnicas. La actividad aminopeptidásica residual del sedimento, menos del 3 % en las muestras en que no se detectaron microorganismos, supone un porcentaje pequeño y además hay que tener en cuenta que este “ruido de fondo” de la reacción procedente de la actividad aminopeptidásica cárnica, tendrá un significado cada vez menor conforme se incremente el número de bacterias presentes en la muestra, pudiendo asumirse, en principio, sin que la prueba tenga por qué verse sustancialmente afectada.

3. 3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE RECUPERACIÓN.

En el apartado anterior se ha comprobado que la centrifugación del resto líquido filtrado procedente del lavado de la muestra y la eliminación posterior del sobrenadante resultaron eficaces para evitar las interferencias debidas a las aminopeptidasas de la carne; no obstante, como la eliminación de la fracción sobrenadante puede suponer la pérdida de microorganismos de la muestra, debe saberse a ciencia cierta cómo pueden influir las condiciones de la centrifugación en la recuperación de microorganismos.

Se procedió de acuerdo a lo especificado en el apartado 2.5.3, del capítulo referente a material y métodos, con 14 muestras de carne de vacuno, porcino y pollo contaminadas *ex profeso* con *Pseudomonas* sp. Las muestras de carne contaminada se lavaron con suero fisiológico estéril y después se filtraron. El material filtrado a través del tamiz de 0,2 mm se centrifugó con diferentes fuerzas centrífugas, en concreto 12.000, 9.000, 6.000 y 4.000 g. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 3.4. a 3.7. Así mismo, las figuras 3.1 a 3.4 muestran las gráficas y los datos de las rectas de regresión ajustadas, entre el logaritmo de las ufc/g obtenidas mediante recuento en placa y las actividades aminopeptidásicas, expresadas como absorbancia a 390 nm, generadas por cada muestra, centrifugando a cada una de las fuerzas centrífugas citadas.

De forma general, las recuperaciones resultaron en todos los casos satisfactorias; no obstante, con los porcentajes de recuperación obtenidos con cada una de las velocidades de centrifugación se abordó la realización de un análisis de varianza de un factor para verificar la existencia de posibles diferencias entre las recuperaciones conseguidas con las cuatro velocidades y así poder determinar si alguna de ellas no era adecuada para alcanzar una máxima recuperación microbiana. Es lógico pensar que a mayor fuerza centrífuga, la sedimentación microbiana tiene que ser mayor, pero, recuérdese que esta prueba está pensada para realizarla en cualquier laboratorio e incluso en condiciones de campo, en las que una centrífuga potente (muy normal en cualquier laboratorio) podría ser difícil de conseguir.

Tabla 3.4
Recuentos microbianos en carne, filtrado y sobrenadante tras centrifugación a 12.000 g y actividades aminopeptidásicas desarrolladas por los microorganismos contenidos en el sedimento del filtrado

Especie	ufc/g en la carne problema	Actividad aminopeptidásica (abs a 390 nm)	ufc/g en el filtrado (dilución 1/10)	ufc/g en el sobrenadante	Recuperación respecto al filtrado (%)
vacuno	3,2x10 ⁸ *	1,16	3,2x10 ⁷	1,1x10 ⁵	99,66
vacuno	1,6x10 ⁶	0,41	1,6x10 ⁵	9,0x10 ²	99,44
vacuno	4,5x10 ⁷	0,53	4,5x10 ⁶	8,0x10 ²	99,98
vacuno	3,0x10 ⁷	0,47	3,0x10 ⁶	1,4x10 ⁵	95,33
vacuno	1,3x10 ⁸	0,93	1,3x10 ⁷	4,7x10 ⁴	99,64
porcino	2,9x10 ⁷	0,87	2,9x10 ⁶	1,7x10 ⁴	99,41
porcino	6,0x10 ⁴	0,05	6,0x10 ³	2,0x10 ²	96,67
porcino	4,5x10 ⁷	0,65	4,5x10 ⁶	1,0x10 ⁴	99,78
porcino	6,9x10 ⁶	0,37	6,9x10 ⁵	4,0x10 ³	99,42
porcino	6,0x10 ⁷	0,46	6,0x10 ⁶	5,4x10 ⁴	99,10
pollo	6,0x10 ⁵	0,35	6,0x10 ⁴	2,8x10 ³	95,33
pollo	3,2x10 ⁹ *	1,17	3,2x10 ⁸	4,0x10 ⁶	98,75
pollo	5,4x10 ⁷	0,95	5,4x10 ⁶	3,1x10 ⁴	99,43
pollo	5,0x10 ⁹ *	1,38	5,0x10 ⁸	1,0x10 ⁵	99,98

* La muestra de carne mostraba signos de alteración

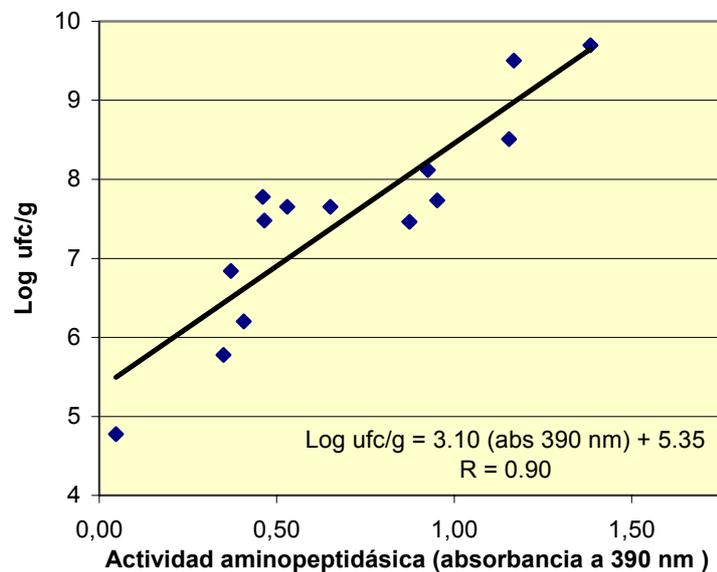


Figura 3.1: Relación entre la actividad aminopeptidásica de las bacterias recogidas a 12.000 g de la suspensión de lavado de carne picada y los recuentos (log ufc/g) de la carne picada

Tabla 3.5
Recuentos microbianos en carne, filtrado y sobrenadante tras
centrifugación a 9.000 g y actividades aminopeptidásicas desarrolladas
por los microorganismos contenidos en el sedimento del filtrado

Especie	ufc/g en la carne problema	Actividad aminopeptidásica (abs a 390 nm)	ufc/g en el filtrado (dilución 1/10)	ufc/g en el sobrenadante	Recuperación respecto al filtrado (%)
vacuno	3,2x10 ⁸ *	1,01	3,2x10 ⁷	5,1x10 ⁴	99,84
vacuno	1,6x10 ⁶	0,37	1,6x10 ⁵	1,3x10 ³	99,19
vacuno	4,5x10 ⁷	0,29	4,5x10 ⁶	2,5x10 ³	99,94
vacuno	3,0x10 ⁷	0,37	3,0x10 ⁶	2,0x10 ⁵	93,33
vacuno	1,3x10 ⁸	0,91	1,3x10 ⁷	6,0x10 ⁴	99,54
porcino	2,9x10 ⁷	0,57	2,9x10 ⁶	3,2x10 ⁴	98,89
porcino	6,0x10 ⁴	0,06	6,0x10 ³	1,0x10 ²	98,33
porcino	4,5x10 ⁷	0,63	4,5x10 ⁶	1,6x10 ⁴	99,64
porcino	6,9x10 ⁶	0,37	6,9x10 ⁵	8,0x10 ³	98,84
porcino	6,0x10 ⁷	0,45	6,0x10 ⁶	8,0x10 ⁴	98,67
pollo	6,0x10 ⁵	0,25	6,0x10 ⁴	3,0x10 ³	95,00
pollo	3,2x10 ⁹ *	1,15	3,2x10 ⁸	5,3x10 ⁶	98,34
pollo	5,4x10 ⁷	0,75	5,4x10 ⁶	4,8x10 ³	99,91
pollo	5,0x10 ⁹ *	1,46	5,0x10 ⁸	1,8x10 ⁶	99,64

* La muestra de carne mostraba signos de alteración

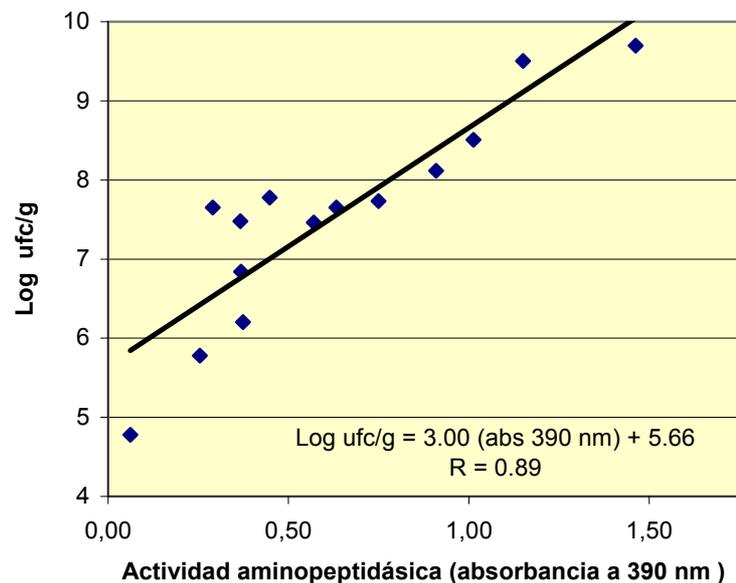


Figura 3.2: Relación entre la actividad aminopeptidásica de las bacterias recogidas a 9.000 g de la suspensión de lavado de carne picada y los recuentos (log ufc/g) de la carne picada.

Tabla 3.6
Recuentos microbianos en carne, filtrado y sobrenadante tras centrifugación a 6.000 g y actividades aminopeptidásicas desarrolladas por los microorganismos contenidos en el sedimento del filtrado

Especie	ufc/g en la carne problema	Actividad aminopeptidásica (abs a 390 nm)	ufc/g en el filtrado (dilución 1/10)	ufc/g en el sobrenadante	Recuperación respecto al filtrado (%)
vacuno	3,2x10 ⁸ *	1,10	3,2x10 ⁷	7,8x10 ⁵	97,56
vacuno	1,6x10 ⁶	0,37	1,6x10 ⁵	3,0x10 ³	98,12
vacuno	4,5x10 ⁷	0,26	4,5x10 ⁶	3,9x10 ³	99,91
vacuno	3,0x10 ⁷	0,45	3,0x10 ⁶	2,2x10 ⁵	92,67
vacuno	1,3x10 ⁸	0,90	1,3x10 ⁷	1,3x10 ⁵	99,00
porcino	2,9x10 ⁷	0,57	2,9x10 ⁶	5,0x10 ⁴	98,28
porcino	6,0x10 ⁴	0,03	6,0x10 ³	4,0x10 ²	93,33
porcino	4,5x10 ⁷	0,60	4,5x10 ⁶	4,2x10 ⁴	99,07
porcino	6,9x10 ⁶	0,33	6,9x10 ⁵	1,5x10 ⁴	97,83
porcino	6,0x10 ⁷	0,39	6,0x10 ⁶	2,0x10 ⁵	96,67
pollo	6,0x10 ⁵	0,21	6,0x10 ⁴	9,0x10 ²	98,50
pollo	3,2x10 ⁹ *	1,12	3,2x10 ⁸	7,0x10 ⁶	97,81
pollo	5,4x10 ⁷	0,72	5,4x10 ⁶	4,6x10 ⁴	99,15
pollo	5,0x10 ⁹ *	1,19	5,0x10 ⁸	4,8x10 ⁵	99,90

* La muestra de carne mostraba signos de alteración

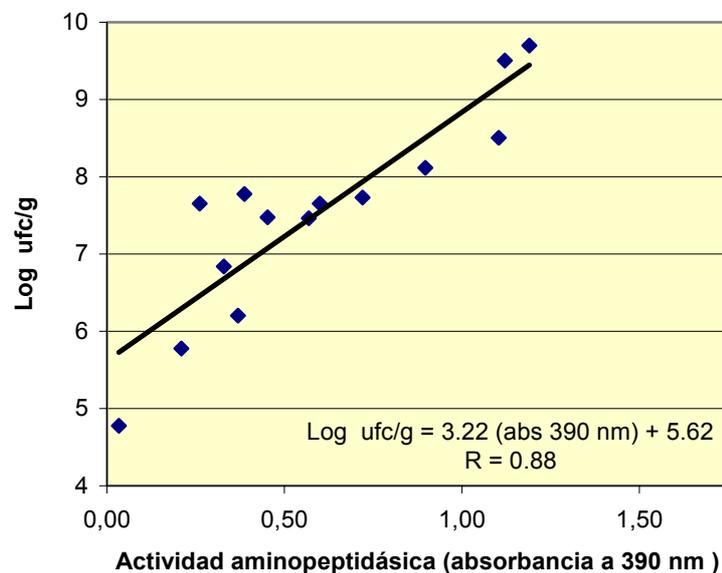


Figura 3.3: Relación entre la actividad aminopeptidásica de las bacterias recogidas a 6.000 g de la suspensión de lavado de carne picada y los recuentos (log ufc/g) de la carne picada.

Tabla 3.7
Recuentos microbianos en carne, filtrado y sobrenadante tras centrifugación a 4.000 g y actividades aminopeptidásicas desarrolladas por los microorganismos contenidos en el sedimento del filtrado

Especie	ufc/g en la carne problema	Actividad aminopeptidásica (abs a 390 nm)	ufc/g en el filtrado (dilución 1/10)	ufc/g en el sobrenadante	Recuperación respecto al filtrado (%)
vacuno	3,2x10 ⁸ *	1,31	3,2x10 ⁷	2,0x10 ⁶	93,75
vacuno	1,6x10 ⁶	0,33	1,6x10 ⁵	7,5x10 ³	95,31
vacuno	4,5x10 ⁷	0,25	4,5x10 ⁶	4,0x10 ³	99,91
vacuno	3,0x10 ⁷	0,42	3,0x10 ⁶	4,0x10 ⁵	86,67
vacuno	1,3x10 ⁸	1,29	1,3x10 ⁷	3,1x10 ⁵	97,61
porcino	2,9x10 ⁷	0,63	2,9x10 ⁶	3,3x10 ⁵	88,62
porcino	6,0x10 ⁴	0,02	6,0x10 ³	7,0x10 ²	88,33
porcino	4,5x10 ⁷	0,59	4,5x10 ⁶	7,1x10 ⁴	98,42
porcino	6,9x10 ⁶	0,31	6,9x10 ⁵	1,6x10 ⁴	97,68
porcino	6,0x10 ⁷	0,33	6,0x10 ⁶	2,3x10 ⁵	96,17
pollo	6,0x10 ⁵	0,20	6,0x10 ⁴	6,0x10 ³	90,00
pollo	3,2x10 ⁹ *	1,09	3,2x10 ⁸	1,0x10 ⁷	96,87
pollo	5,4x10 ⁷	0,73	5,4x10 ⁶	1,8x10 ⁵	96,67
pollo	5,0x10 ⁹ *	1,17	5,0x10 ⁸	3,0x10 ⁶	99,40

* La muestra de carne mostraba signos de alteración

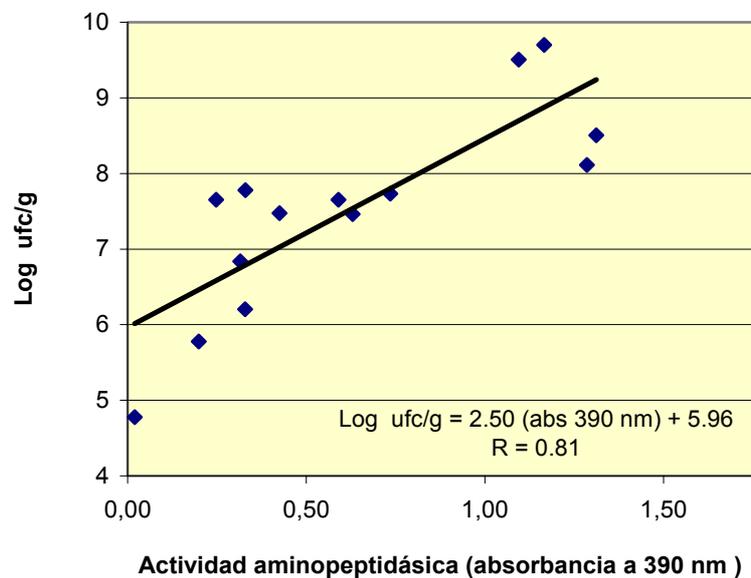


Figura 3.4: Relación entre la actividad aminopeptidásica de las bacterias recogidas a 4.000 g de la suspensión de lavado de carne picada y los recuentos (log ufc/g) de la carne picada.

Los resultados del análisis de varianza se muestran en la tabla 3.8, y la prueba demuestra la existencia de diferencias significativas, ($P=0,001$), entre los porcentajes de recuperación obtenidos a las cuatro velocidades de centrifugación utilizadas, o al menos entre uno de los grupos con respecto a los demás.

Tabla 3.8
Análisis de varianza de los porcentajes de recuperación de microorganismos
obtenidos con diferentes fuerzas centrífugas.

Centrifugación	Número	Suma	Promedio	Varianza		
12.000 g	14	1381,91	98,70	2,7156		
9.000 g	14	1379,12	98,50	3,7947		
6.000 g	14	1367,80	97,70	4,7754		
4.000 g	14	1325,42	94,67	19,7400		
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>	<i>Nivel α de significación</i>
Entre grupos	146,54	3	48,84	6,29	2,78	0,01
Dentro de los grupos	403,33	52	7,75	<i>probabilidad</i>		
Total	549,88	55		0,001		

El porcentaje de recuperación medio y la variabilidad de las muestras procesadas a 4.000 g resultaron ser las más discordantes respecto al resto de los grupos, de tal forma que se realizó otra comparación excluyendo este grupo.

Tomando únicamente los porcentajes de recuperación a 12.000, 9.000 y 6.000 g, los resultados variaron de forma manifiesta (si se comparan con los precedentes, Tabla 3.8), como puede apreciarse en la tabla 3.9. En este caso el valor F experimental, inferior al F crítico ($\infty 0,05$) ($P=0,35$), no permite descartar la hipótesis nula y por lo tanto se acepta la no existencia de diferencias entre los 3 grupos.

El protocolo utilizado, además de generar información acerca de la recuperación de microorganismos, nos proporcionó los datos complementarios de la actividad aminopeptidásica de *Pseudomonas* sp., junto con el recuento correspondiente para cada muestra. El grado de correlación entre estos parámetros se puede utilizar como elemento de decisión adicional para la elección de las mejores condiciones de centrifugación.

Tabla 3.9
Análisis de varianza de los porcentajes de recuperación de microorganismos
obtenidos tras centrifugar a 12000, 9000 y 6000 g.

<i>Centrifugación</i>	<i>Número</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
12000 g	14	1381.91	98.70	2.7156
9000 g	14	1379,12	98.50	3.7947
6000 g	14	1367.80	97.70	4.7754

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>	<i>Nivel α de significación</i>
Entre grupos	7.98	2	3.99	1.06	3.23	0.05
Dentro de los grupos	146.71	39	3.76	<i>probabilidad</i>		
Total	154.69	41		0.35		

Como se desprende de los datos de las cuatro rectas de regresión, las diferencias entre los coeficientes de correlación, la pendiente y el punto de corte con el eje de ordenadas, son bastante pequeñas. Salvo en las muestras sometidas a 4.000 g, los coeficientes de correlación fueron muy elevados y se apreció un ligero incremento de la correlación conforme se incrementó la fuerza de centrifugación. Aunque el mejor coeficiente de correlación se obtuvo con la centrifugación a 12.000 g, fue prácticamente equiparable a los obtenidos a 9.000 y a 6.000 g.

Llama la atención que la mayoría de las muestras analizadas que presentaron cargas bacterianas del orden de $5 \times 10^7 - 10^8$ ufc/g, no mostraron signos evidentes de alteración, con un color y olor dentro de lo aceptable y sin presencia de limo superficial. Estos resultados coinciden con lo expuesto por autores como El-Leithy y Rashad (1989) quienes tampoco evidenciaron signos de alteración en muestras de carne picada con cargas bacterianas similares. La explicación de este hecho, como ya se apuntaba en la introducción, puede estar en que a diferencia de la carne en piezas o fileteada, en la que toda la carga bacteriana se localiza en la superficie, haciendo muy evidente su alteración, en la carne picada se distribuye por toda la masa, con lo que este derivado cárnico es capaz de “aceptar” más carga bacteriana por gramo que la carne en piezas por cm^2 antes de presentar signos de alteración. Se han marcado con un asterisco las muestras que presentaron olores anómalos, indicadores de alteración.

La recolección de microorganismos de la carne picada se realizó sometiendo a la muestra a la acción de un homogeneizador de palas tipo “stomacher”. Algunos trabajos, como el realizado por Rodríguez y col. (1995), han comparado la eficacia de este tipo de homogeneizadores, los “stomacher”, frente a los agitadores tipo “vortex”, en la movilización de microorganismos de la superficie cárnica. Otros sistemas como los hisopos “swabbing” o el rascado “scraping”, que también compararon en ese trabajo, se descartaron *a priori* por ser demasiado dependientes de la variabilidad del operario, y en nuestro caso, inviábiles por tratarse de carne picada. En su trabajo, estos autores concluyen que el “stomacher”, aun con los inconvenientes inherentes a todos los métodos de extracción, incapaces de movilizar todas las bacterias presentes en la muestra, e incluso con recuperaciones ligeramente inferiores a las obtenidas con agitadores tipo vortex, es el sistema más fácilmente estandarizable y reproducible, aspectos estos últimos muy importantes a la hora de la puesta a punto de una técnica microbiológica. Por otra parte, en este mismo trabajo, comprobaron que la extracción mediante homogeneización en “vortex” producía más daño en las fibras musculares, lo que no resulta deseable en nuestro caso por la mayor liberación de aminopeptidasas de origen cárnico que puede provocar, que conllevaría una mayor interferencia en los resultados de la prueba.

Estos mismos autores, Rodríguez y col. (1995), han comprobado que los tratamientos de la muestra, previos a la homogeneización, con detergentes o enzimas como las colagenasas, favorecen la movilización de microorganismos de la superficie cárnica. En el presente caso se ha desechado la utilización de estos métodos para evitar las posibles interferencias que podrían generar esas sustancias en la reacción de las aminopeptidasas con la p-nitroanilina.

Por otra parte, el posible error que se comete al no movilizar todos los microorganismos presentes en la muestra es relativo, ya que los recuentos en placa correspondientes (método de referencia con el que pretendemos comparar nuestra prueba), se ven afectados en igual medida.

Pérez de Castro y col. (1988), Pérez de Castro (1989) y Alvarado y col. (1992) exponen en sus trabajos la dificultad de aplicar la prueba de la p-nitroanilina en carnes

picadas debido a la distribución de la carga bacteriana por toda la masa; no obstante, mediante lavado y arrastre de las bacterias de la muestra, similar al que se realizaría para un recuento en placa, y posterior centrifugado para recogida de los microorganismos (que se ha comprobado efectivo), y eliminación del sobrenadante (en el que se localiza la actividad aminopeptidásica cárnica), se consiguió rescatar a la mayor parte de las bacterias presentes en la carne picada problema y situarlas en una disposición que permitió realizar la prueba de forma similar a como la realizan los citados autores.

A la vista de los resultados obtenidos, se consideró que las condiciones de centrifugación de elección, por los mayores porcentajes de recuperación, así como los mejores datos de correlación, eran 12.000 g y, por lo tanto, esta fue la fuerza de aceleración centrífuga utilizada en el resto de experiencias. Hay que resaltar no obstante, que los resultados obtenidos a 9.000 y 6.000 g fueron muy similares, aunque resulta recomendable no bajar de 6000 g. En el caso de utilizar una centrífuga tecnológicamente más sencilla a 4.000 g para la aplicación como prueba de campo, sería necesario aumentar los tiempos de centrifugación para realizar la prueba eficazmente.

3.4. INFLUENCIA DEL LAVADO DEL SEDIMENTO EN LA RECUPERACIÓN Y LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA.

Con el ánimo de optimizar el protocolo de trabajo seguido hasta el momento, se planteó la posibilidad de incluir un paso adicional, sometiendo a un lavado y subsiguiente centrifugación el sedimento que se obtiene en la centrifugación a 12.000 g. La inclusión de este paso puede eliminar posibles restos de aminopeptidasas cárnicas residuales, aunque también puede suponer la pérdida de microorganismos.

Para valorar la influencia de la inclusión del lavado del sedimento en la recuperación y la actividad aminopeptidásica, se diseñó el procedimiento que se expone en el apartado 2.5.4. De acuerdo con este protocolo se procesaron 28 muestras procedentes de carne de vacuno, porcino y pollo, de las cuales la mitad estaba contaminada con *Moraxella bovis* y la otra mitad con *Flavobacterium odoratum*.

Los resultados obtenidos correspondientes a los porcentajes de recuperación, se muestran en la tabla 3.10. A partir de estos datos, se realizó una comparación de las medias de recuperación obtenidas con y sin la inclusión de la operación de lavado, para lo que se utilizó la prueba t de Student para muestras pareadas.

Los resultados de esta prueba se exponen en la tabla 3.11 y como puede apreciarse, se demuestra la existencia de diferencias significativas, ($P < 0,001$), entre ambos grupos.

A pesar de que estadísticamente puede decirse que se produce una pérdida significativa de microorganismos en el lavado del sedimento y su posterior centrifugación, es de destacar que las pérdidas en términos porcentuales son muy pequeñas, casi insignificantes, aproximadamente del 0,12 %. Desde luego, estas pérdidas podrían asumirse si el lavado supusiera alguna mejora que justificase su inclusión en el protocolo de la prueba.

Tabla 3.10

Porcentajes de recuperación de microorganismos sin y con la operación de lavado del sedimento obtenido por centrifugación a 12.000 g y nueva centrifugación en las mismas condiciones

ufc/g en la carne problema	ufc/g en el 1 ^{er} sobrenadante	Porcentaje de recuperación sin lavado	ufc/g en el 2 ^{er} sobrenadante	Porcentaje de recuperación con lavado
7,0x10 ⁴	1,0x10 ¹	99,86	0,0x10 ⁰	99,86
7,9x10 ⁹ *	2,5x10 ⁵	99,97	2,7x10 ⁴	99,96
4,5x10 ¹⁰ *	3,7x10 ⁶	99,92	9,5x10 ⁵	99,89
2,7x10 ⁶	1,7x10 ³	99,37	5,3x10 ²	99,17
8,0x10 ¹⁰ *	2,0x10 ⁷	99,75	1,7x10 ⁶	99,73
5,0x10 ⁵	8,9x10 ²	98,22	9,0x10 ¹	98,04
5,4x10 ⁹ *	5,9x10 ⁵	99,89	4,1x10 ⁴	99,88
5,4x10 ⁵	2,3x10 ²	99,57	3,7x10 ¹	99,51
4,5x10 ⁶	2,0x10 ³	99,56	6,2x10 ²	99,42
6,4x10 ⁸ *	3,2x10 ⁴	99,95	1,1x10 ³	99,95
4,2x10 ⁹ *	8,0x10 ⁵	99,81	2,6x10 ⁴	99,80
1,7x10 ⁷	2,4x10 ⁴	98,59	7,1x10 ³	98,17
1,8x10 ⁸ *	6,1x10 ⁵	96,61	1,8x10 ⁴	96,51
1,8x10 ¹⁰ *	4,3x10 ⁶	99,76	8,4x10 ⁵	99,71
2,0x10 ⁹ *	3,2x10 ⁶	98,40	4,1x10 ⁵	98,19
4,8x10 ⁸ *	5,1x10 ⁵	98,94	9,8x10 ⁴	98,73
3,7x10 ⁷	1,7x10 ³	99,95	8,1x10 ²	99,93
8,4x10 ⁹ *	9,2x10 ⁵	99,89	1,5x10 ¹	99,89
4,0x10 ⁴	2,3x10 ¹	99,42	0,0x10 ⁰	99,42
8,6x10 ¹⁰ *	1,5x10 ⁷	99,83	5,0x10 ⁶	99,77
3,7x10 ⁶	7,2x10 ³	98,05	6,4x10 ²	97,88
1,4x10 ⁵	5,2x10 ²	96,29	9,9x10 ¹	95,58
2,2x10 ⁷	2,9x10 ⁴	98,68	5,1x10 ³	98,45
6,4x10 ⁴	6,0x10 ¹	99,06	4,0x10 ⁰	99,00
9,1x10 ¹⁰ *	1,0x10 ⁸	98,90	1,0x10 ⁷	98,79
5,1x10 ⁹ *	4,0x10 ⁶	99,22	2,6x10 ⁵	99,16
6,2x10 ⁸ *	3,7x10 ⁵	99,40	8,2x10 ⁴	99,27
2,4x10 ⁶	7,2x10 ³	97,00	4,0x10 ²	96,83

* La muestra de carne mostraba signos de alteración

Tabla 3.11

Comparación, mediante la prueba t de Student, de los porcentajes de recuperación sin y con la operación de lavado del sedimento, recogidos en la Tabla 3.10

	% de recuperación sin lavado	% de recuperación con lavado
Media	99,07	98,95
Varianza	1,0614	1,3064
Observaciones	28	28
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	27	
Estadístico t experimental	4,15	
P (dos colas)	0,0003	
Valor crítico de t α=0,01 (dos colas)	2,77	

La relación entre los recuentos en placa de *Moraxella bovis* y *Flavobacterium odoratum* y las actividades aminopeptidásica de los filtrados centrifugados sin y con la operación de lavado y nueva centrifugación se exponen en las tablas 3.12 y 3.13 y figuras 3.5 y 3.6, respectivamente. Los coeficientes de correlación son altamente significativos, con $P < 0,001$. Las actividades aminopeptidásicas registradas en los casos en los que se incluyó el lavado del sedimento, son ligeramente inferiores a las detectadas cuando no se realizó, lo que se aprecia de forma gráfica en las figuras 3.5 y 3.6. En ambos casos, los coeficientes de correlación son comparables, las pendientes también son muy similares, pero varía el valor de la ordenada en el origen.

Con independencia de la bacteria con la que se contaminó la muestra, se tomaron de forma conjunta todos los resultados obtenidos, sin y con lavado, y se obtuvieron las dos rectas de regresión globales, cuyos datos y representación gráfica se exponen en la figura 3.7, comprobándose el mismo efecto observado por separado en cada una de las especies.

Para evidenciar estadísticamente las diferencias que *a priori* se intuyen, se aplicó una prueba t de Student para muestras pareadas con la que se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 3.14. Los resultados confirmaron las apreciaciones iniciales existiendo diferencias significativas, ($P < 0,001$), entre las actividades aminopeptidásicas de ambos grupos.

La inclusión del lavado no supone una mejora de la correlación entre los recuentos y la actividad aminopeptidásica, y además ocasiona un empeoramiento del límite de detección ya que para obtener una absorbancia determinada, se necesitan recuentos superiores (aunque prácticamente del mismo orden de magnitud) en aquellas muestras en las que se aplica el lavado, que en las que se prescinde del mismo.

En el apartado 3.2 se hacía referencia a la pequeña actividad residual remanente en el sedimento, que suponía menos de un 3 % en las muestras en las que no se detectaba carga bacteriana. Con el lavado era de esperar que esta actividad residual

Tabla 3.12

Recuentos microbianos y actividad aminopeptidásica desarrollada por *Moraxella bovis* en carne picada contaminada y tratada según se describe en 2.5.4 sin y con lavado del sedimento y posterior centrifugación.

Especie de la muestra de carne	Actividad aminopeptidásica (abs a 390 nm) sin lavado	Actividad aminopeptidásica (abs a 390 nm) con lavado	Log ufc/g del recuento en placa de la muestra
vacuno	0,23	0,13	4,84
porcino	0,88	0,67	9,90 *
vacuno	1,30	1,12	10,65 *
porcino	0,68	0,45	6,43
vacuno	1,59	1,40	10,90 *
vacuno	0,63	0,40	5,70
porcino	1,66	1,18	9,73 *
pollo	0,26	0,15	5,73
porcino	0,56	0,33	6,65
porcino	1,13	0,99	8,81 *
pollo	1,12	1,35	9,62 *
pollo	0,68	0,45	7,23
vacuno	0,93	0,82	8,25 *
porcino	1,54	1,36	10,25 *

* La muestra de carne mostraba signos de alteración

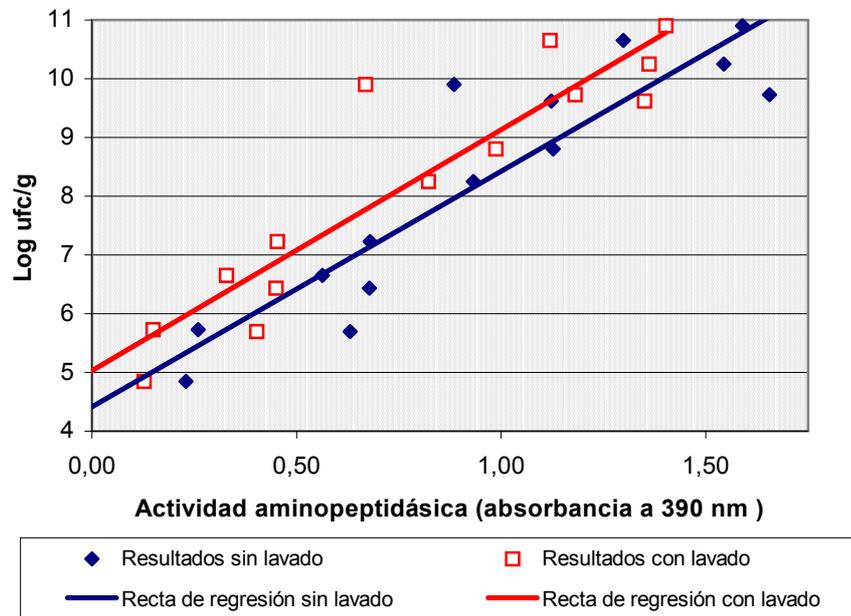


Figura 3.5: Relación entre los recuentos microbianos y la actividad aminopeptidásica desarrollada por *Moraxella bovis* en carne picada contaminada y tratada según se describe en 2.5.4 sin y con lavado del sedimento y posterior centrifugación

Tabla 3.13

Recuentos microbianos y actividad aminopeptidásica desarrollada por *Flavobacterium odoratum* en carne picada contaminada y tratada según se describe en 2.5.4 sin y con lavado del sedimento y posterior centrifugación.

Especie de la muestra de carne	Actividad aminopeptidásica (abs a 390 nm) sin lavado	Actividad aminopeptidásica (abs a 390 nm) con lavado	Log ufc/g del recuento en placa de la muestra
porcino	1,48	1,14	9,30 *
vacuno	0,92	0,71	8,68 *
vacuno	0,75	0,59	7,57
porcino	1,46	1,21	9,92 *
porcino	0,22	0,12	4,60
vacuno	1,69	1,52	10,37 *
vacuno	0,68	0,52	6,57
porcino	0,43	0,28	5,15
porcino	0,61	0,54	7,34
pollo	0,31	0,19	4,81
pollo	1,94	1,84	10,05 *
vacuno	1,28	0,95	9,71 *
porcino	1,13	0,93	8,79 *
vacuno	0,53	0,41	6,38

* La muestra de carne mostraba signos de alteración

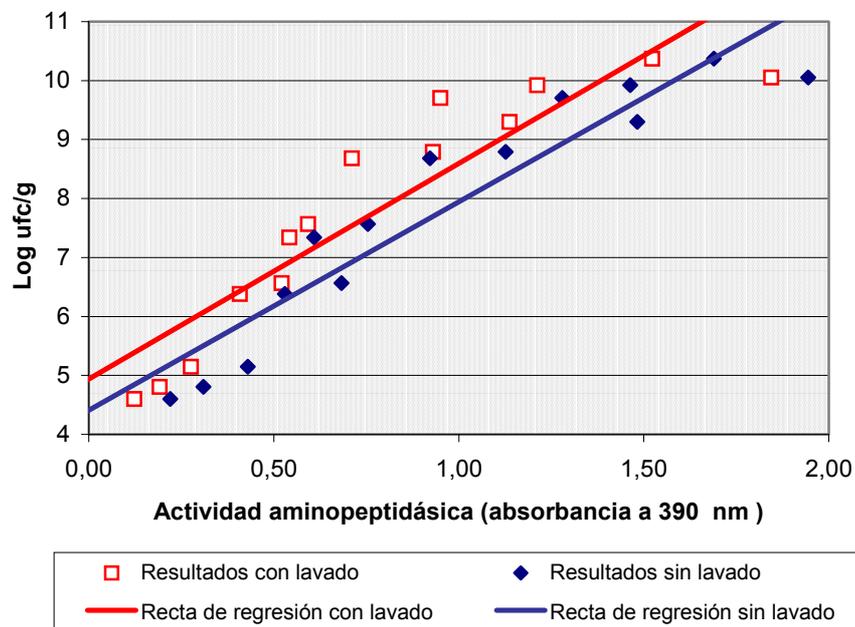


Figura 3.6: Relación entre los recuentos microbianos y la actividad aminopeptidásica desarrollada por *Flavobacterium odoratum*, en carne picada contaminada y tratada según se describe en 2.5.4 sin y con lavado del sedimento y posterior centrifugación

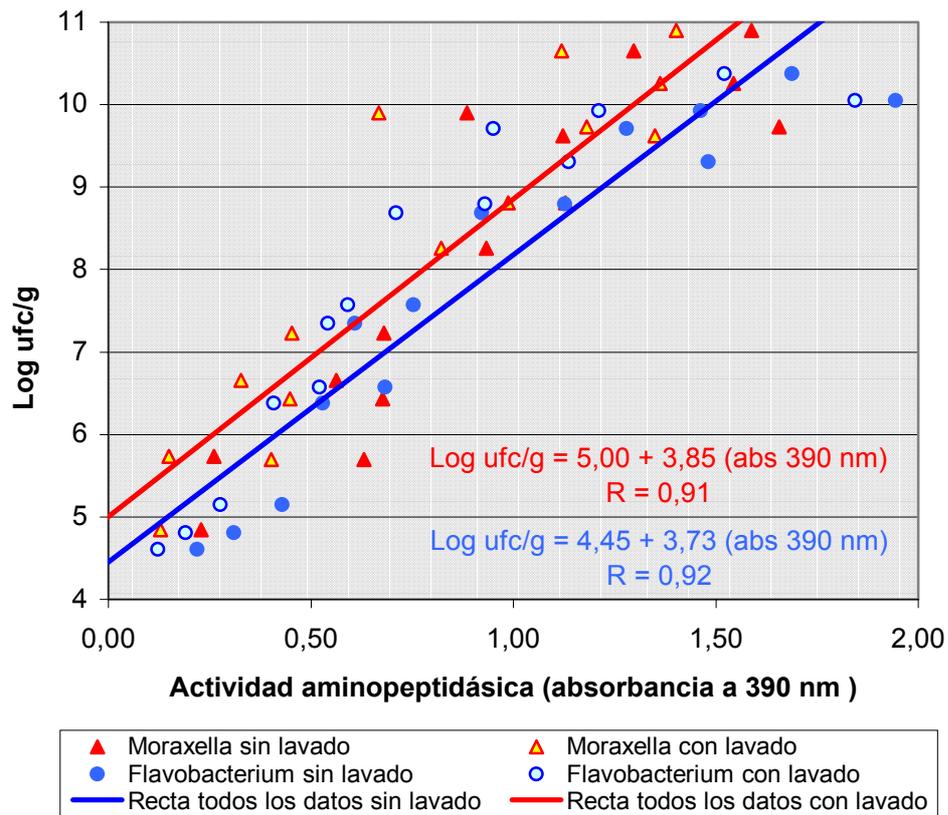


Figura 3.7: Relación entre los recuentos microbianos y la actividad aminopeptidásica desarrollada por *M. bovis* y *F. odoratum* en carne picada contaminada y tratada según se describe en 2.5.4 sin y con lavado del sedimento y posterior centrifugación .

Tabla 3.14

Comparación mediante test t de Student de las actividades aminopeptidásicas desarrolladas por *M. bovis* y *F. odoratum* en carne picada contaminada y tratada según se describe en 2.5.4 sin y con lavado del sedimento y posterior centrifugación.

	Actividad aminopeptidásica sin lavado (abs a 390 nm)	Actividad aminopeptidásica con lavado (abs a 390 nm)
Media	0.95	0.77
Varianza	0.2473	0.2278
Observaciones	28	28
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	27	
Estadístico t	7.85	
P(T<=t)	1.91×10^{-8}	
Valor crítico de t	2.77	

disminuyera, pero la pérdida de bacterias, aunque pequeña, que supuso el segundo lavado no compensó la posible eliminación de esos restos de actividad aminopeptidásica cárnica que, por otra parte, como ya se dijo en el apartado 3.2, cuando la muestra tenga una carga bacteriana apreciable, supondrá un porcentaje cada vez menor, conforme la concentración microbiana aumente y, por tanto, prácticamente será despreciable a los niveles de contaminación habitual de la carne picada.

Así pues, a la vista de los resultados, se comprobó que el lavado del sedimento no aportaba ninguna ventaja especial y, por el contrario, complicaba el procedimiento, disminuía la sensibilidad de la prueba y alargaba el tiempo de la misma, por lo que se descartó su inclusión como un paso adicional en el resto de las experiencias.

3.5. CORRELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA Y EL RECUENTO DE MICROORGANISMOS PSICROTROFOS VIABLES EN CARNE PICADA CONTAMINADA EXPERIMENTALMENTE. DIFERENCIAS INTERESPECÍFICAS.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo a seguir para el desarrollo de la prueba de la p-nitroanilina en carnes picadas, se procedió según lo expuesto en el apartado 2.5.5 a la realización de esta prueba en carnes contaminadas experimentalmente con *Pseudomonas putida*, *Ps. fragi* y *Ps. fluorescens*.

La actividad aminopeptidásica generada en la prueba, expresada como UA de absorbancia a 390 nm, y el logaritmo de las ufc/g de carne obtenidos mediante recuento en placa, se exponen en las tablas 3.15, 3.16 y 3.17 para *Pseudomonas putida*, *Ps. fragi* y *Ps. fluorescens*, respectivamente. A partir de estos datos se calculó la relación existente entre ambos parámetros según puede observarse en las figuras 3.8, 3.9 y 3.10. Los coeficientes de correlación obtenidos en las tres rectas, resultaron en todos los casos altamente significativos con $P < 0,001$.

El análisis de varianza de la regresión proporcionó unos valores de F experimental de 30,36, 37,29 y 27,26 para las rectas calculadas con los datos obtenidos de *Ps. putida*, *Ps. fragi* y *Ps. fluorescens*, respectivamente; todos ellos superiores al valor crítico F de Snédecor (10,0 con 10 y 1 grados de libertad), lo que nos permite afirmar que las pendientes de las tres rectas son significativas con $P < 0,01$.

A la vista de estos datos se puede decir que las tres rectas de regresión resultan satisfactorias, no obstante presentan diferencias entre sí como se puede ver de forma gráfica en la figura 3.11, en la que se muestran de forma superpuesta. Se ha añadido la recta de regresión obtenida en el apartado 3.3 para *Pseudomonas* sp. utilizando 12.000 g, para utilizarla también con fines comparativos dado que los datos proceden de experimentos realizados bajo las mismas condiciones.

Tabla 3.15

Recuentos microbianos y actividad aminopeptidásica desarrollada por *Pseudomonas putida* en carne picada contaminada y tratada según se describe en 2.5.5

Recuento en placa	Actividad aminopeptidásica (absorbancia a 390 nm)
$8,1 \times 10^7$	0.41
$1,6 \times 10^8$	0.57
$2,5 \times 10^9$ *	0.95
$1,2 \times 10^7$	0.50
$4,8 \times 10^7$	0.84
$1,2 \times 10^7$	0.91
$2,0 \times 10^6$	0.51
$3,0 \times 10^5$	0.34
$3,2 \times 10^9$ *	1.23
$2,1 \times 10^{10}$ *	1.61
$8,1 \times 10^9$ *	1.34
$1,8 \times 10^6$	0.39

* La muestra de carne mostraba signos de alteración

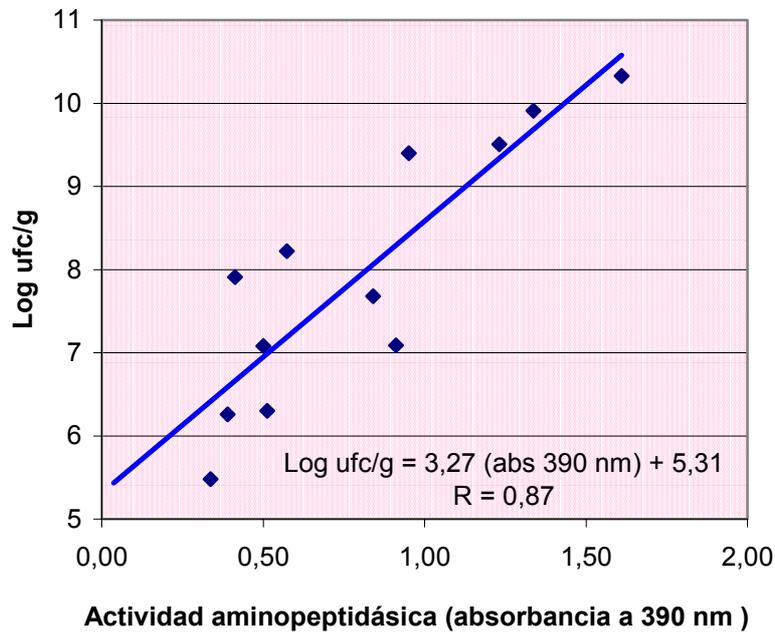


Figura 3.8: Relación entre los recuentos microbianos y la actividad aminopeptidásica desarrollada por *Pseudomonas putida* en carne picada contaminada y tratada según se describe en 2.5.5

Tabla 3.16

Recuentos microbianos y actividad aminopeptidásica desarrollada por *Pseudomonas fragi* en carne picada contaminada y tratada según se describe en 2.5.5

Recuento en placa	Actividad aminopeptidásica (absorbancia a 390 nm)
$1,7 \times 10^8$	0,81
$8,7 \times 10^9$ *	1,08
$5,0 \times 10^9$ *	1,19
$8,9 \times 10^7$	0,63
$8,9 \times 10^7$	0,78
$1,8 \times 10^7$	0,61
$2,8 \times 10^6$	0,57
$6,3 \times 10^8$ *	0,96
$2,9 \times 10^8$ *	0,66
$2,5 \times 10^9$ *	1,05
$6,0 \times 10^8$ *	1,21
$2,0 \times 10^6$	0,37

* La muestra de carne mostraba signos de alteración

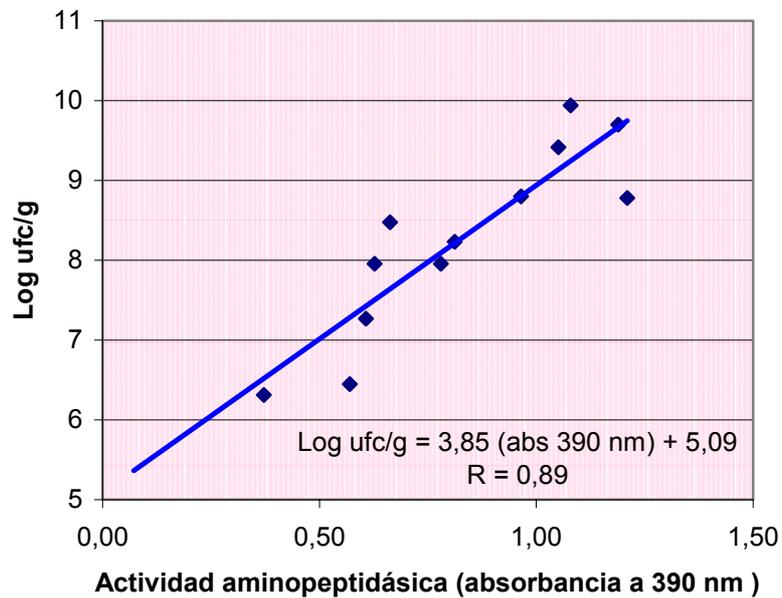


Figura 3.9: Relación entre los recuentos microbianos y la actividad aminopeptidásica desarrollada por *Pseudomonas fragi* en carne picada contaminada y tratada según se describe en 2.5.5

Tabla 3.17

Recuentos microbianos y actividad aminopeptidásica desarrollada por *Pseudomonas fluorescens* en carne picada contaminada y tratada según se describe en 2.5.5

Recuento en placa	Actividad aminopeptidásica (absorbancia a 390 nm)
$2,0 \times 10^8$	0,73
$2,9 \times 10^7$	0,76
$3,5 \times 10^8$ *	0,77
$1,6 \times 10^8$	0,85
$1,3 \times 10^{10}$ *	1,26
$3,1 \times 10^{10}$ *	1,67
$4,0 \times 10^8$ *	0,95
$1,1 \times 10^9$ *	1,13
$4,3 \times 10^8$ *	0,49
$6,8 \times 10^7$	0,54
$8,3 \times 10^8$ *	1,29
$1,1 \times 10^6$	0,33

* La muestra de carne mostraba signos de alteración

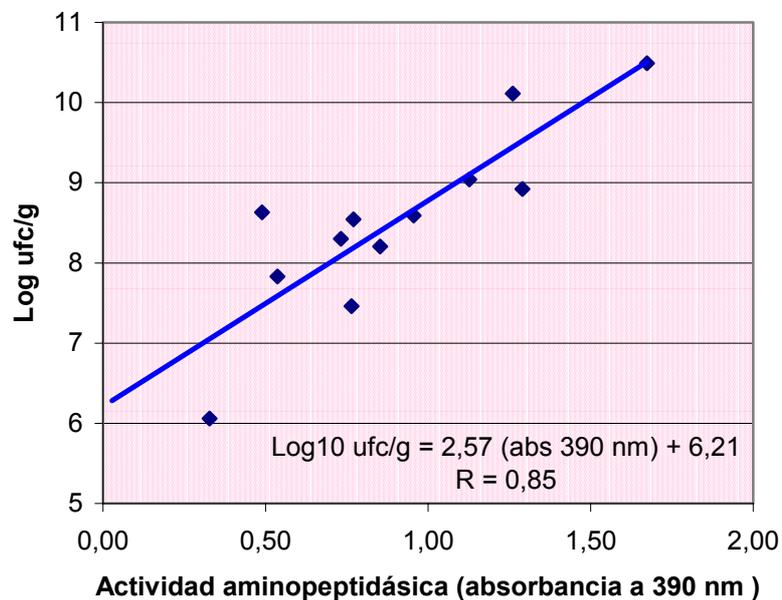


Figura 3.10: Relación entre los recuentos microbianos y la actividad aminopeptidásica desarrollada por *Pseudomonas fluorescens* en carne picada contaminada y tratada según se describe en 2.5.5

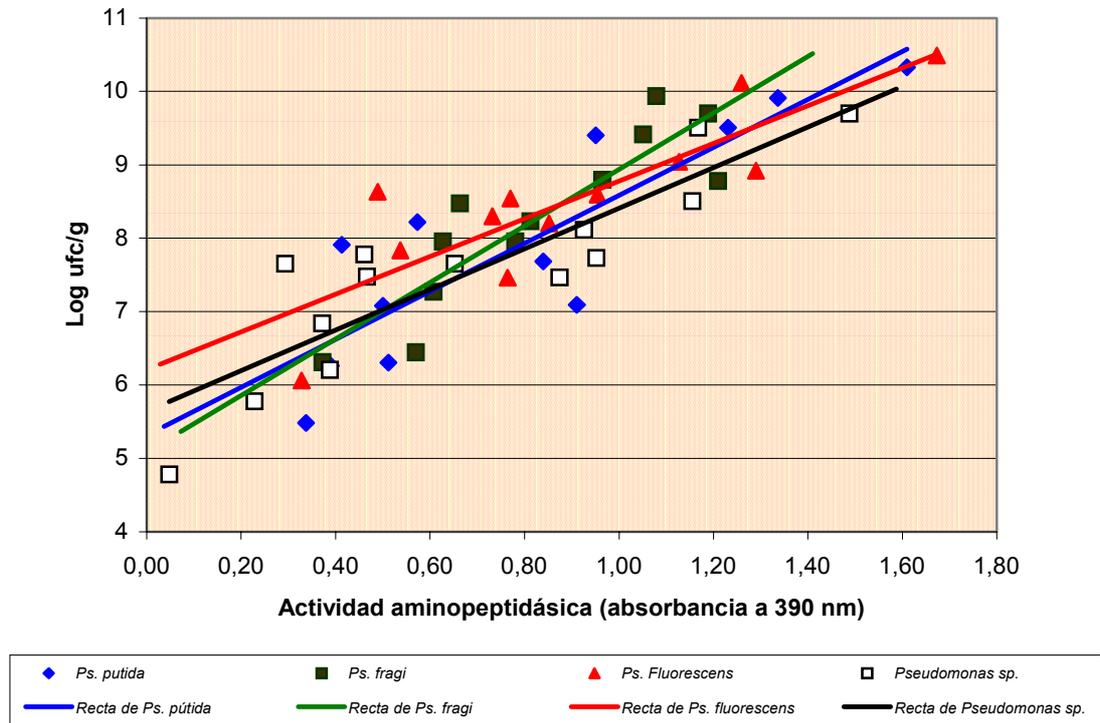


Figura. 3.11: Relación entre los recuentos microbianos y la actividad aminopeptidásica desarrollada por *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. fragi* y *Pseudomonas sp.* en carne picada contaminada y tratada según se describe en 2.5.5

Para valorar el grado de similitud o diferencia entre las rectas, se diseñó una prueba en la cual se pretendía sustituir todas ellas por una única recta que las unificara.

Se elaboraron dos modelos de predicción distintos. Uno de ellos se convino en denominarlo “modelo complejo”, en el que se utilizó para la estimación de los logaritmos de las ufc/g de una especie bacteriana determinada, su recta de regresión particular. Este modelo se puede resumir en una ecuación introduciendo una variable “dummy” (D). La ecuación sería la siguiente:

$$\text{Log ufc/g} = aD_1 + bD_1(\text{abs } 390 \text{ nm}) + cD_2 + dD_2(\text{abs } 390 \text{ nm}) + eD_3 + fD_3(\text{abs } 390 \text{ nm}) + gD_4 + hD_4(\text{abs } 390 \text{ nm})$$

Donde:

a =	Ordenada en el origen de la recta de <i>Ps. putida</i>	(5,31)
c =	“ “ “ “ “	<i>Ps. fragi</i> (5,09)
e =	“ “ “ “ “	<i>Ps. fluorescens</i> (6,21)
g =	“ “ “ “ “	<i>Pseudomonas</i> sp (5,35)
b =	Pendiente (tag α) de la recta de <i>Ps. putida</i>	(3,27)
d =	“ “ “ “ “	<i>Ps. fragi</i> (3,85)
f =	“ “ “ “ “	<i>Ps. fluorescens</i> (2,57)
h =	“ “ “ “ “	<i>Pseudomonas</i> sp (3,10)

D puede tomar los siguientes valores:

$D_1 = 1$ Si la bacteria es una *Ps. putida*

$D_1 = 0$ Si la bacteria es cualquiera de las otras

$D_2 = 1$ Si la bacteria es una *Ps. fragi*

$D_2 = 0$ Si la bacteria es cualquiera de las otras

$D_3 = 1$ Si la bacteria es una *Ps. fluorescens*

$D_3 = 0$ Si la bacteria es cualquiera de las otras

$D_4 = 1$ Si la bacteria es una *Pseudomonas* sp.

$D_4 = 0$ Si la bacteria es cualquiera de las otras

El otro modelo predictivo se denominó “modelo sencillo” y consistió en la utilización de una recta común a las cuatro especies, generada con todos los puntos y que respondería a la ecuación:

$$\text{Log ufc/g} = 3,07 (\text{abs } 390 \text{ nm}) + 5,59$$

Tabla 3.18

Resumen de diferencias residuales de los modelos de predicción sencillo y complejo

Modelo sencillo		Modelo complejo	
Sumas parciales de los cuadrados de las diferencias residuales a la recta común	Cuadrado de las diferencias residuales a la recta común	Cuadrado de las diferencias residuales a la recta de <i>Ps. putida</i>	Sumas parciales de los cuadrados de las diferencias residuales a las rectas particulares
	1,0976	1,5531	
	0,7511	1,0672	
	0,7861	0,9548	
	0,0025	0,0171	
	0,2415	0,1434	
	1,6916	1,4450	
	0,7484	0,4712	
	1,3204	0,8748	
	0,0176	0,0278	
	0,0426	0,0616	
<i>Ps putida</i>	0,0450	0,0507	<i>Ps putida</i>
7,0272	0,2828	0,1080	6,7746
		Cuadrado de las diferencias residuales a la recta de <i>Ps. fragi</i>	
	0,0206	0,0002	
	1,0678	0,4841	
	0,2072	0,0010	
	0,1894	0,2042	
	0,0012	0,0189	
	0,0352	0,0241	
	0,8046	0,6983	
	0,0594	0,0000	
	0,7184	0,6990	
	0,3537	0,0779	
<i>Ps. fragi</i>	0,2790	0,9379	<i>Ps. fragi</i>
3,9167	0,1802	0,0433	3,1888
		Cuadrado de las diferencias residuales a la recta de <i>Ps. fluorescens</i>	
	0,2114	0,0449	
	0,2309	0,5073	
	0,3436	0,1277	
	0,0000	0,0373	
	0,4255	0,4475	
	0,0571	0,0002	
	0,0043	0,0050	
	0,0001	0,0038	
	2,3545	1,3570	
	0,3477	0,0596	
<i>Ps. fluorescens</i>	0,4016	0,3624	<i>Ps. fluorescens</i>
4,6699	0,2932	0,9834	3,9363
		Cuadrado de las diferencias residuales a la recta de <i>Pseudomonas sp.</i>	
	0,2138	0,0031	
	0,3381	0,2623	
	0,6637	0,3556	
	1,3436	1,4385	
	0,9235	0,9924	
	0,2044	0,2975	
	0,1041	0,0078	
	0,0033	0,0431	
	0,0111	0,0287	
	0,5906	0,7400	
	0,2667	0,2462	
	0,1062	0,4024	
<i>Pseudomonas sp.</i>	0,6147	0,2935	<i>Pseudomonas sp.</i>
5,7861	0,4023	0,1087	5,2199
Suma total de las diferencias residuales en el modelo sencillo	21.4000	Suma total de las diferencias residuales en el modelo complejo	19.1196

Una vez establecidos estos modelos se calcularon las predicciones de la recta (log ufc/g estimados) para cada una de las absorbancias experimentales y se restaron del valor (log ufc/g experimental) para obtener las diferencias residuales. Con las diferencias residuales elevadas al cuadrado (para evitar valores negativos) obtenidas con uno y otro modelo se realizó un test F en el que se estableció como hipótesis nula la no existencia de diferencias entre ambos modelos.

Como se puede apreciar en la tabla 3.18 las diferencias residuales medias a las rectas particulares de cada especie son, en todos los casos como cabía esperar, menores que a la recta común. La mayor diferencia se halló en el caso de *Ps. fluorescens*. No obstante, las diferencias de predicción entre ambos modelos son pequeñas y, de hecho, el test F, cuyos resultados se muestran en la tabla 3.19, generó un estadístico F experimental de 0,83 (P=0,55) y, por tanto, se aceptó la hipótesis nula.

Tabla 3.19

Resultados del test F para la comparación entre los modelos de predicción “sencillo” y “complejo” de *Pseudomonas* sp., *Ps. putida*, *Ps. fragi* y *Ps. fluorescens*.

Parámetro	Valor
Suma de los cuadrados de las diferencias residuales (SCR) del modelo sencillo.	21,40
Grados de libertad en el modelo sencillo	48
Suma de los cuadrados de las diferencias residuales (SCR) del modelo complejo	19,11
Grados de libertad en el modelo complejo	42
F experimental:	
$F = \frac{[(SCR \text{ .mod .sen cillo}) - (SCR \text{ .mod .complejo})] * (G.l. \text{ mod .complejo})}{[(G.l. \text{ mod .sen cillo}) - (G.l. \text{ mod .complejo})] * (SCR \text{ .mod .complejo})}$	0,83
Valor F crítico ($\alpha = 0,05$)	2,32
Valor de probabilidad P asociado al F experimental	0,55

Estos resultados apuntan la idea de que, en nuestras condiciones de trabajo, la actividad aminopeptidásica desarrollada por las cuatro pseudomonas utilizadas, es muy similar y de hecho la utilización de una recta de regresión común como la que se muestra en la figura 3.12, sería adecuada, ya que las rectas particulares de cada especie no son significativamente mejores.

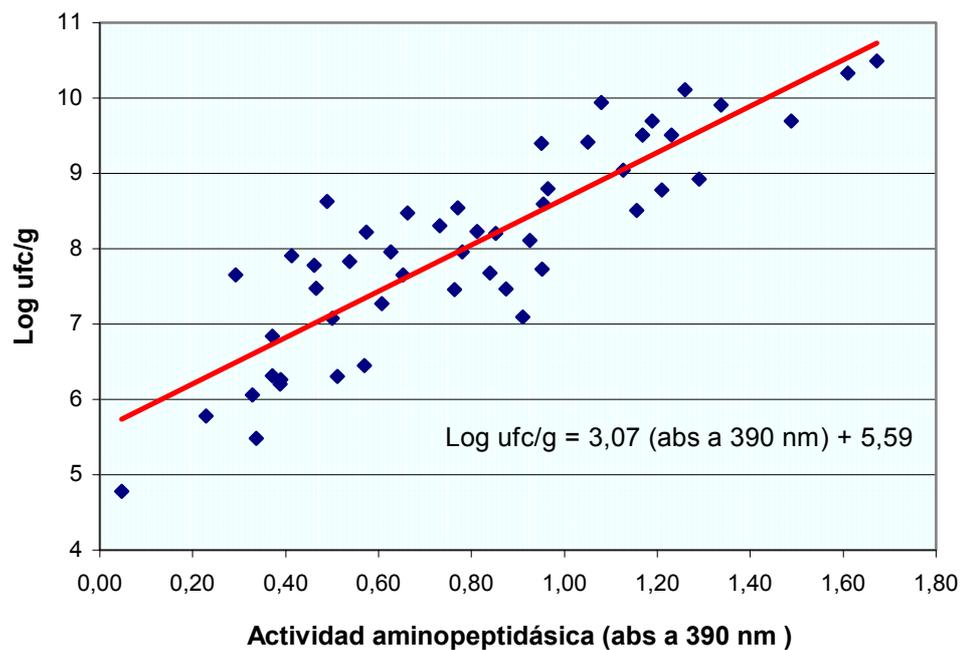


Figura 3.12: Relación entre los recuentos microbianos y la actividad aminopeptidásica desarrollada por *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. fragi* y *Pseudomonas* sp. en carne picada contaminada y tratada según se describe en 2.5.5. Los datos de las cuatro pseudomonas se han tratado conjuntamente.

Pérez de Castro y col. (1988) y Pérez de Castro (1989), trabajando con las cepas de pseudomonas DC-7 y JU-7 del “cluster” 1, DC-5 y P-4 del “cluster” 2 y NT-19 y P-2 del “cluster” 3, comprobaron que algunas de estas cepas presentaban distinto grado de actividad aminopeptidásica aunque no encontraron una relación entre el grado de actividad y el “cluster” de pertenencia. De las bacterias utilizadas en esta experiencia, *Ps. fragi* pertenece al “cluster” 2 (Shaw y Latty 1981) y *Ps. putida* y *Ps. fluorescens* no se encuadran exactamente en ninguno de estos clusters, si bien esta última presenta gran similitud con las del “cluster” 3, y como se ha comprobado, no presentaron diferencias significativas entre sus actividades aminopeptidásicas.

La misma comparación de modelos “sencillo” y “complejo” llevada a cabo entre las cuatro pseudomonas se repitió incluyendo además los resultados descritos en 3.4 para *Moraxella bovis* y *Flavobacterium odoratum*.

Tabla 3.20

Resultados del test F para la comparación de los modelos “sencillo” y “complejo” de predicción de ufc/g de *Pseudomonas* sp., *Ps. putida*, *Ps. fragi*, *Ps. fluorescens*, *M. bovis* y *F. odoratum*.

Parámetro	Valor
Suma de los cuadrados de las diferencias residuales (SCR) del modelo sencillo.	45.79
Grados de libertad en el modelo sencillo	76
Suma de los cuadrados de las diferencias residuales (SCR) del modelo complejo	34.62
Grados de libertad en el modelo complejo	66
F experimental	2.13
Valor F crítico ($\alpha=0,05$)	1,97
Valor de probabilidad P asociado al F experimental	0.03

Los resultados que se apuntan en la tabla 3.20 demuestran que, en este caso, sí existieron diferencias significativas entre las diferencias residuales de, al menos una de las rectas particulares, respecto a la recta común. Como se observa, el estadístico F experimental es superior al F crítico ($P < 0,05$).

Estas pequeñas diferencias no impiden que estos datos puedan tenerse en cuenta para la elaboración de una recta de regresión global representativa de la contaminación natural de la carne en general y de la carne picada en particular, ya que en la microbiota alterante de la carne en aerobiosis y refrigeración, además de las pseudomonas, también participan otros grupos de bacterias gram negativas y, aunque estas últimas lo hagan en proporciones menores, la naturaleza mixta de la microbiota natural recomienda tenerlos presentes para la elaboración de posibles rectas que estimen la carga de microorganismos psicrotrofos a partir de las actividades aminopeptidásicas. Este criterio se corresponde, por otra parte, con el aplicado por Pérez de Castro y col. (1988) y Pérez de Castro (1989). Estos autores asumen las diferencias de actividad aminopeptidásica apreciadas en algunas de las cepas de pseudomonas estudiadas, ya que consideran que la combinación de diferentes cepas en la microbiota definitiva dará como resultado una actividad aminopeptidásica homogénea, que puede asemejarse a la que presente la contaminación de una carne mantenida en refrigeración. En el presente caso, además de

las pseudomonas, se han incluido otras especies gram negativas con actividad aminopeptidásica demostrada y frecuentes contaminantes de las carnes y otros alimentos perecederos

De acuerdo a este criterio se elaboró una recta de regresión general con todos los datos disponibles obtenidos en las mismas condiciones con todas las especies bacterianas que se ensayaron, incluyendo los datos de las cuatro especies de pseudomonas y los correspondientes a *M. bovis* y *F. odoratum*. La gráfica de la recta y su ecuación se recogen en la figura 3.13.

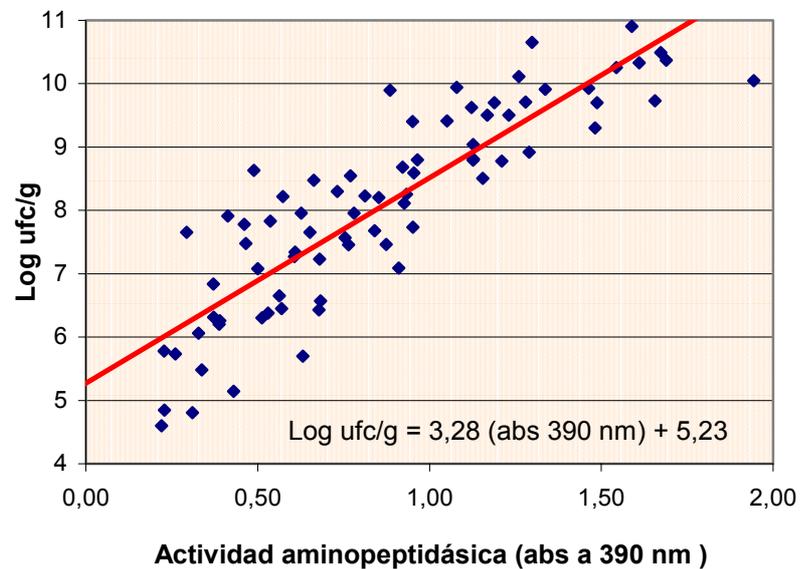


Figura 3.13: Relación entre los recuentos microbianos y la actividad aminopeptidásica desarrollada por *M. bovis* y *F. odoratum*, *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. fragi* y *Pseudomonas* sp. en carne picada contaminada y tratada según se describe en 2.5.5. Los datos de las seis especies se han tratado conjuntamente.

Hasta el momento, para construir las rectas de regresión se ha utilizado el logaritmo de las ufc/g de carne y la actividad aminopeptidásica expresada como absorbancia a 390 nm. A efectos de comparación entre las distintas especies bacterianas o entre diferentes condiciones de trabajo, el ajuste es adecuado. No obstante, en la parte de la recta con absorbancias de aproximadamente 0,4 o inferiores se apreció cierta

desviación de los puntos respecto a la recta. Desde el punto de vista estadístico es poco probable que todos los puntos caigan por debajo de la misma. Esta tendencia, junto con el aspecto general de la nube de puntos, hace pensar que pueda ser necesario un ajuste no lineal con el objeto de utilizar la ecuación de forma predictiva con las mayores garantías posibles.

Pérez de Castro y col. (1988) y Pérez de Castro (1989), al enfrentar el logaritmo de las ufc en abscisas, con las absorbancias a 390 nm en ordenadas, obtuvieron un modelo exponencial. En este trabajo, esta tendencia no ha sido tan manifiesta, hasta tal punto que el ajuste lineal ha resultado adecuado en la mayoría de las experiencias, tal como se viene demostrando. Posiblemente el reducido número de determinaciones con cargas bajas ha sido el origen de que esta tendencia quedase amortiguada.

Al realizar un ajuste logarítmico se obtuvo la gráfica y la ecuación que se muestran en la figura 3.14. Como puede comprobarse, este nuevo ajuste continúa siendo adecuado en el rango medio y alto de la función, pero además resulta mejor en el rango más bajo.

Cambiando en el eje de abscisas los valores de las absorbancias por los del logaritmo natural de las mismas, la representación gráfica vuelve a ser lineal como puede apreciarse en la figura 3.15.

Comparando la suma de los cuadrados de las diferencias residuales, como se aprecia en la tabla 3.21, se comprueba que se obtiene un valor inferior y, por lo tanto, mejor, con la recta obtenida a partir de los logaritmos naturales de las absorbancias y, en consecuencia, será esta forma de expresar la actividad aminopeptidásica la que se seguirá en las siguientes experiencias.

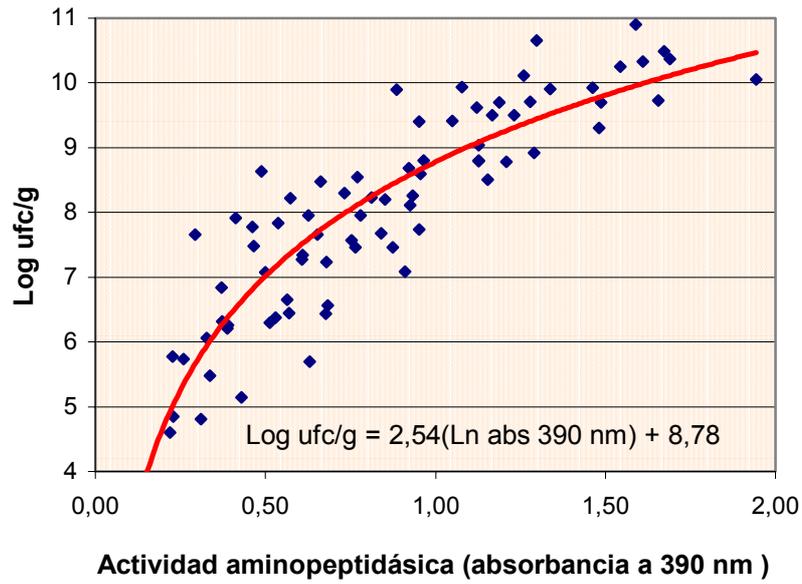


Figura 3.14: Ajuste logarítmico entre los recuentos de la carne picada (log de ufc/g) y la actividad aminopeptidásica desarrollada por las bacterias (absorbancias a 390 nm)

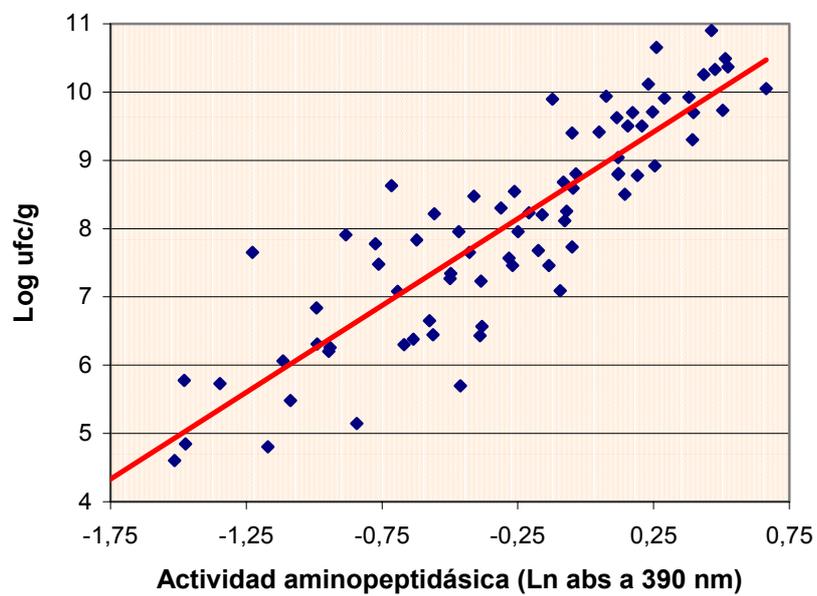


Figura 3.15: Relación entre los recuentos de la carne picada (log ufc/g) y la actividad aminopeptidásica desarrollada por las bacterias (ln abs 390 nm).

Tabla 3.21
Sumas de los cuadrados de las diferencias residuales de las rectas
obtenidas a partir de las absorbancias y del logaritmo natural
de la absorbancias (figuras 3.13 y 3.15)

Parámetros a partir de los que está elaborada la recta	Suma de los cuadrados de las diferencias residuales
Ln de la absorbancia a 390 nm / Log ufc/g	41,96
Absorbancia a 390 nm / Log ufc/g	45,41

3.6 ESTIMACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA EN MUESTRAS COMERCIALES DE CARNE PICADA.

El fin último de la prueba cuyo desarrollo se está describiendo es su utilización en carnes picadas comerciales. Hasta el momento, en los apartados anteriores se ha reseñado el trabajo realizado partiendo de muestras contaminadas experimentalmente con una sola especie bacteriana. En este apartado se han analizado muestras comerciales con su microbiota natural.

Tabla 3.22

Recuentos microbianos y actividad aminopeptidásica desarrollada por la microbiota natural de carnes picadas adquiridas en el comercio.

Especie	Actividad aminopeptidásica (absorbancia a 390 nm)	Actividad aminopeptidásica (Ln absorbancia a 390 nm)	Recuento en placa de microorg. psicrotrofos
vacuno	0.21	-1.58	6.8x10 ⁴
vacuno	0.29	-1.25	5.2x10 ⁵
vacuno	0.43	-0.84	1.4x10 ⁷
vacuno	0.64	-0.44	1.8x10 ⁸
vacuno	0.60	-0.51	1.4x10 ⁷
vacuno	1.24	0.21	6.6x10 ⁸ *
vacuno	1.05	0.05	6.6x10 ⁸ *
vacuno	1.01	0.01	6.6x10 ⁸ *
vacuno	1.01	0.01	6.6x10 ⁸ *
vacuno	0.99	-0.02	6.6x10 ⁸ *
vacuno	0.23	-1.48	6.3x10 ⁵
vacuno	0.28	-1.27	2.1x10 ⁵
porcino	0.28	-1.28	8.0x10 ⁶
porcino	0.42	-0.86	1.0x10 ⁷
porcino	0.76	-0.28	3.0x10 ⁷
porcino	0.72	-0.33	1.6x10 ⁸
porcino	0.78	-0.25	6.3x10 ⁸ *
porcino	0.23	-1.46	7.0x10 ⁴
porcino	1.38	0.32	4.2x10 ⁹ *
porcino	0.17	-1.76	2.8x10 ⁴
porcino	0.25	-1.40	1.6x10 ⁵
porcino	0.30	-1.21	2.2x10 ⁶
porcino	0.33	-1.10	1.3x10 ⁶
porcino	0.35	-1.05	2.5x10 ⁶
mezcla	0.23	-1.46	1.4x10 ⁶
mezcla	0.37	-1.00	4.5x10 ⁵
mezcla	0.64	-0.45	4.7x10 ⁷
mezcla	0.84	-0.17	8.4x10 ⁸ *
mezcla	0.27	-1.30	1.0x10 ⁶
mezcla	0.34	-1.07	3.1x10 ⁶
mezcla	0.44	-0.81	2.0x10 ⁶
mezcla	0.47	-0.75	1.7x10 ⁷

* La muestra de carne mostraba signos de alteración

Siguiendo el protocolo al que se hace referencia en el apartado 2.5.6, se estudiaron 32 muestras de carne picada de vacuno, porcino y mezcla de ambas. Se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 3.22

A partir de estos resultados se elaboró la recta de regresión que se muestra en la figura 3.16 cuya ecuación aparece en la misma. Tanto el coeficiente de correlación ($r=0,95$), como la pendiente (2,31) resultaron significativos ($P<0,001$). Se procuró procesar un número suficiente de muestras en las que, por su aspecto sensorial (visual y olfativo), se esperasen cargas bacterianas relativamente bajas para obtener puntos en el intervalo bajo de la recta y complementar de este modo los resultados obtenidos en apartados anteriores de forma experimental. Aun así, algunas presentaron signos evidentes de alteración (véase tabla 3.22). Por otra parte, este intervalo de la recta es el más interesante a la hora de discernir entre carnes de calidad y carnes en la fase inicial de la alteración.

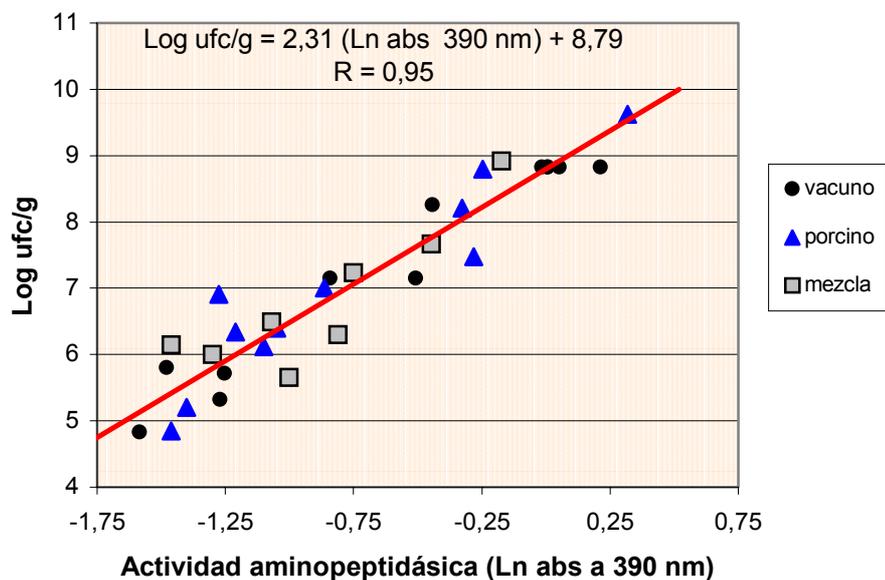


Figura 3.16: Relación entre los recuentos microbianos (log ufc/g) y la actividad aminopeptidásica (ln abs 390 nm) desarrollada por las bacterias en muestras de carne picada adquiridas en el comercio

Abundando en lo expuesto en el apartado 3.5 respecto a la mejoría que se obtiene al considerar el logaritmo natural de las absorbancias en vez de la absorbancia directamente, se compararon los resultados con ambos ajustes y se comprobó que la suma de los cuadrados de las diferencias residuales con el ajuste a partir de los logaritmos naturales de las absorbancias fue de 5,99 frente a 10,00, al utilizar las absorbancias. En este caso las diferencias fueron más acentuadas que las que se reflejaron en la tabla 3.21, ya que hay un mayor número de puntos en el intervalo bajo, zona en la que el ajuste logarítmico resulta más adecuado.

Un hecho a destacar es la similitud entre las rectas obtenidas tanto con las muestras con su microbiota natural como con las contaminadas experimentalmente. Las diferencias en la pendiente son irrelevantes, 2,54 para la recta obtenida con contaminaciones experimentales, frente a 2,31 de la recta generada a partir de las muestras con su microbiota natural. Las ordenadas en el origen son prácticamente coincidentes, 8,78 y 8,79 para la experimental y la natural, respectivamente. Así, para tres absorbancias dadas, por ejemplo 0,4, 0,8 y 1,3, la recta obtenida con contaminaciones experimentales supondría unos recuentos de $2,8 \times 10^6$, $1,6 \times 10^8$ y $2,8 \times 10^9$, mientras que los estimados por la recta obtenida con las muestras con su microbiota natural serían de $4,7 \times 10^6$, $1,9 \times 10^8$ y $2,5 \times 10^9$ respectivamente, pudiéndose apreciar que los recuentos son del mismo orden con ambas rectas en cada uno de los casos.

En alguna de las muestras procesadas, en las que se obtuvieron actividades aminopeptidásicas y recuentos dentro de lo esperado, se observó la presencia de colonias que por su aspecto pudieran tratarse de levaduras, lo que se confirmó mediante tinción de gram y examen microscópico. A este respecto, algunos autores como Achstetter y col. (1984) han demostrado la capacidad hidrolítica de ciertas levaduras sobre las uniones 4-anilidas. Otros autores han aislado y caracterizado el gen AAP1 que codifica en levaduras la alanina/arginina aminopeptidasa, que presenta un 40 % de similitud con la aminopeptidasa humana, la de la rata y la del ratón (Caprioglio y col. 1993). Así pues, la presencia de levaduras en la microbiota contaminante de la carne también puede ponerse de manifiesto probablemente mediante la prueba que se ha desarrollado. La aplicación de la prueba de la p-nitroanilina para la detección y cuantificación de levaduras y su

posible aplicación en el control de determinados procesos industriales constituye un posible trabajo que merezca la pena desarrollar en el futuro.

Al igual que ocurría en las experiencias realizadas con inoculaciones experimentales, en este caso se observó también que a tasas de bacterias psicrotrofas muy elevadas, del orden de 5×10^7 , 10^8 ufc/g, e incluso algo superiores, algunas muestras no presentaron signos claros de alteración. Este hecho supone que cargas bacterianas del orden de 10^8 ufc/g en carne picada, puedan pasar casi inadvertidas a los sentidos, aunque puedan constituir un riesgo higiénico-sanitario considerable. La prueba que venimos desarrollando permite detectar sin problemas cargas bacterianas de ese orden y menores, constituyendo una herramienta muy útil a la hora de la toma de decisiones.

3.7 INFLUENCIA DEL pH Y DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO BACTERIANO EN LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA.

Como todas las enzimas, la actividad de las aminopeptidasas sobre el sustrato de p-nitroanilida se ve afectada por el pH y la temperatura a la que se verifica la reacción. Pérez de Castro (1989), en el trabajo en el que desarrolló esta prueba, estableció las condiciones óptimas de la misma, concluyendo que la mayor actividad aminopeptidásica se obtenía a pH 8,0 y 37 °C. Estas condiciones son las que se han venido utilizando en todas las experiencias realizadas hasta el momento. Esta aclaración viene al caso antes de exponer los siguientes resultados para evitar posibles confusiones, ya que en el presente apartado no se pretende valorar la influencia de estos factores en la reacción enzima-sustrato, sino evaluar si las condiciones en las que se produce el crecimiento bacteriano condicionan de alguna manera la producción final de aminopeptidasas o la actividad de las mismas.

La microbiota alterante de la carne conservada en refrigeración y aerobiosis, tal como se ha citado en otros apartados, es muy similar en todas las carnes de las especies de abasto. Sin embargo, es bien sabido que el pH de la carne, el sustrato donde los microorganismos se multiplican, varía de unas especies a otras, siendo más ácido en las carnes de vacuno y porcino que en las de pollo o pavo. Además, dentro de la misma especie, el pH se ve muy influido por las condiciones higiénicas del animal y, sobre todo, por las condiciones por las que atraviesa antes de su sacrificio. Un estrés prolongado hace que el pH de la carne sea menos ácido. También deben considerarse las condiciones de temperatura en que pueden encontrarse las canales o las piezas cárnicas o la carne picada y que permiten el desarrollo de los microorganismos en el alimento. El término refrigeración puede englobar temperaturas demasiado diferentes, desde 0°C hasta el límite superior que puedan presentar ciertas “neveras”. Los microorganismos que se desarrollan en condiciones tan variables pueden generar actividades aminopeptidásicas distintas, lo que podría conducir a que la prueba de la p-nitroanilina presentara unos errores que no serían deseables o, quizás, los datos obtenidos con la prueba pudiesen presentar un sesgo más o menos intenso que, quizás, pudiera permitirse, si se conocieran el pH de la carne fresca o las condiciones térmicas de almacenamiento de la carne.

La carne de vacuno a las 24 h del sacrificio, una vez verificada la transformación del glucógeno en ácido láctico, en condiciones normales y con un tratamiento *ante mortem* del animal adecuado, alcanza unos valores de pH en torno a 5,7 (Tarrant y Sherington 1980) ó 5,8 (Barriada 1995, Beltrán y col. 1997). Si bien otros autores como Moreno y col. (1999) citan haber encontrado porcentajes del 42 al 48 % de las canales de vacuno con pH superiores a 5,8. La carne de porcino, a las 24 h del sacrificio, también tiene un pH aproximado de 5,8 (Lengerken y col. 2002) mientras que la de las aves como el pollo o el pavo tienden a tener un pH ligeramente superior, sobre 5,85-5,90.

Dependiendo de diferentes factores, entre los que se encuentra el estrés perimortal como uno de los más determinantes, estos valores de pH pueden variar dando lugar a diferentes tipos de carne a las que ya se hizo referencia en la introducción. Así, en las carnes PSE, en las que se produce un rápido descenso del pH, éste alcanza unos valores de 5,4 a 5,6. Este tipo de carne es relativamente frecuente en porcino y cada vez aparece con más frecuencia en carne de aves (Lengerken y col. 2002). Por el contrario las carnes DFD, condición que se presenta tanto en vacuno como en porcino o aves, tienen valores de pH superiores a 6,2.

Estas condiciones variables de pH, unidas a las temperaturas de refrigeración, también variables en la práctica y que condicionan notablemente la tasa de crecimiento bacteriano, hacen que los microorganismos deban adaptarse, pudiendo modificar en determinados casos ciertos procesos metabólicos. Frank y col. (1972) demostraron la capacidad de las pseudomonas de mantener constante su tamaño, composición y ciertas actividades enzimáticas a temperaturas entre 2 y 30 °C, siendo esta capacidad de adaptación uno de los factores que favorecen su versatilidad.

Dado que el presente trabajo pretende utilizar la prueba de la p-nitroanilina en carne picada, independientemente del pH de la misma, y mantenida en condiciones variables de refrigeración, se consideró oportuno valorar las posibles influencias que pudieran tener la variación de estos factores en la producción de aminopeptidasas por parte de las bacterias habitualmente implicadas en la alteración de la carne.

3.7.1. EVALUACIÓN DEL ÍNDICE DE ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA ESPECÍFICA (AAE) A DIFERENTES VALORES DE pH.

Se procedió de acuerdo a lo especificado en el apartado 2.5.7 obteniéndose los resultados que se exponen en las tablas 3.23 a 3.28.

Como se desprende de los datos de la tabla 3.23 y de los del análisis de varianza de la tabla 3.24, los resultados medios de los índices de actividad aminopeptidásica específica (AAE) obtenidos con *Ps. putida* a diferentes pH no tienen mucha diferencia entre sí y no indican ninguna tendencia. Este dato se confirmó estadísticamente, ya que el valor F experimental (2,49), aún con una probabilidad baja (P=0,07) sigue siendo superior a 0,05 y por lo tanto aceptamos la hipótesis nula de que no existen diferencias entre los índices de AAE a los diferentes valores de pH a los que se ha trabajado.

Tabla 3.23

Índices de actividad aminopeptidásica específica de *Ps. putida* a diferentes pHs.

pH 5	pH 5,5	pH 6	pH 6,5
1,74	1,61	2,00	1,74
1,71	1,64	1,98	1,70
1,72	1,66	2,07	1,69
1,72	1,66	1,98	1,78
1,49	1,27	2,23	1,82
1,66	1,31	2,18	1,70
1,60	1,32	2,46	1,85
1,81	1,38	2,15	1,58
1,28	1,15	1,79	1,41
1,94	1,18	1,82	1,61
1,78	1,24	1,98	1,10
1,87	1,38	1,64	2,18
1,07	1,33	0,41	1,63
1,11	1,37	0,85	1,88
1,24	1,38	0,70	2,01
1,60	1,51	0,95	1,75

Tabla 3.24

Análisis de varianza de los índices de actividad aminopeptidásica específica a diferentes pH de *Ps. putida* (datos de la Tabla 3.23)

<i>pH</i>	<i>Número</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
5	16	25,35	1,58	0,0724	
5,5	16	22,39	1,40	0,0284	
6	16	27,17	1,70	0,3814	
6,5	16	27,43	1,71	0,0585	
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F experimental</i>	<i>Valor crítico de F (α= 0,05)</i>
Entre grupos	1,01	3	0,34	2,49	
Dentro de los grupos	8,11	60	0,13	<i>probabilidad</i>	2,76
Total	9,13	63		0,07	

Tabla 3.25

Índices de actividad aminopeptidásica específica de *Ps. fluorescens* a diferentes pHs.

pH 5	pH 5,5	pH 6	pH 6,5
2,27	1,64	1,57	2,16
2,37	1,67	1,59	2,02
2,23	0,89	1,64	2,03
2,31	0,89	1,59	1,93
1,44	2,61	2,11	1,78
1,55	2,46	2,15	1,97
1,47	2,58	2,22	1,74
1,77	2,43	2,13	1,77
0,94	2,22	2,04	2,26
1,23	2,20	1,89	2,34
1,31	2,36	2,02	1,75
1,32	2,27	2,03	1,76
1,10	1,08	1,81	0,94
0,94	1,11	2,78	1,47
1,29	0,71	1,70	0,91
1,43	0,93	0,75	1,63

Tabla 3.26

Análisis de varianza de los índices de actividad aminopeptidásica específica a diferentes pH de *Ps fluorescens* (datos de la Tabla 3.25)

pH	Número	Suma	Promedio	Varianza	
5	16	24,98	1,56	0,2367	
5,5	16	28,05	1,75	0,5064	
6	16	30,01	1,88	0,1875	
6,5	16	28,48	1,78	0,1638	
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F experimental	Valor crítico de F ($\alpha= 0,05$)
Entre grupos	0.84	3	0.28	1.02	
Dentro de los grupos	16.41	60	0.27	probabilidad	2.76
Total	17.25	63		0.39	

Tabla 3.27

Índices de actividad aminopeptidásica específica de *F. odoratum* a diferentes pHs.

pH 5	pH 5,5	pH 6	pH 6,5
1,015	1,319	1,161	1,292
0,910	1,202	1,174	1,144
1,017	1,420	1,187	1,207
1,005	1,115	1,081	1,175
1,943	1,379	1,798	1,908
1,473	1,405	1,830	1,724
1,588	1,356	1,846	1,657
1,708	1,446	1,632	1,712
1,775	1,254	1,187	1,346
1,242	1,297	1,240	0,956
2,008	1,469	1,313	1,584
1,450	1,189	1,140	1,451
1,354	1,711	0,541	0,960
1,308	1,867	0,894	1,031
2,015	1,311	1,178	1,210
1,338	1,133	0,639	1,388

Tabla 3.28

Análisis de varianza de los índices de actividad aminopeptidásica específica a diferentes pH de *F. odoratum* (datos de la Tabla 3.27)

<i>pH</i>	<i>Número</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
5	16	23,15	1,45	0,1345
5,5	16	21,87	1,37	0,0393
6	16	19,84	1,24	0,1473
6,5	16	21,74	1,36	0,0844

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F experimental</i>	<i>Valor crítico de F (α= 0,05)</i>
Entre grupos	0,35	3	0,12	1,14	
Dentro de los grupos	6,08	60	0,10	<i>probabilidad</i>	2.76
Total	6,43	63		0,34	

Como se puede comprobar en las tablas 3.25 a 3.28, se obtuvieron resultados similares, incluso todavía más acentuados, tanto en el caso de *Ps. fluorescens* $F = 1,02$ ($P = 0,39$), como en *F. odoratum* $F = 1,14$ ($P = 0,34$). Se demostró, por tanto, que las condiciones de pH que se han utilizado para el crecimiento bacteriano, que cubren tanto los valores de pH normales de las carnes, como los de las de pH anormales, no han provocado índices de AAE significativamente diferentes en ninguna de las tres especies estudiadas.

3.7.2. EVALUACIÓN DEL ÍNDICE DE AAE A DIFERENTES TEMPERATURAS.

La temperatura, junto con el pH y la actividad de agua es uno de los factores que condicionan el crecimiento bacteriano. De acuerdo a lo establecido en el Real Decreto 147/1993 de 29 de enero, por el que se establece las condiciones higiénicas de producción y comercialización de carnes frescas y por el Real Decreto 2483/1986 de 14 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria sobre condiciones generales de transporte terrestre de alimentos y productos alimenticios a temperatura regulada, el límite entre las temperaturas de refrigeración y no refrigeración, de forma general, se puede establecer en los 12 °C, aunque las carnes frescas refrigeradas, según la primera norma, no deben sobrepasar los 7 °C y las carnes picadas

preparadas por industrias y destinadas a ser comercializadas en territorio nacional no deben sobrepasar los 4 °C según el Real Decreto 1916/1997.

De acuerdo al mismo protocolo del apartado 2.5.7 se procedió a obtener los índices de AAE a 12 °C con cada una de las especies para compararlos con los obtenidos a 7 °C. En este caso, al haber comprobado previamente que el pH de crecimiento no afectaba significativamente a los índices de AAE, se obtuvieron datos solamente en el intervalo de pH habitual de la carne, 5,5 y 6, obviando los pH más extremos de 5 y 6,5. Los índices de AAE y los resultados de las pruebas t de Student comparando los resultados a 7 y 12 °C en cada una de las especies se muestran en las tablas 3.29 a 3.32.

Tabla 3.29

Índices de AAE a 12 °C de *Ps. putida*, *Ps. fluorescens* y *F. odoratum*

	<i>Ps putida</i>	<i>Ps. fluorescens</i>	<i>F. odoratum</i>
pH 5,5	1,74	1,55	1,22
"	1,91	1,45	1,10
"	1,98	1,38	1,12
"	1,63	1,80	1,40
"	1,27	1,45	1,43
"	1,52	1,44	1,31
"	1,64	1,62	1,86
"	1,29	1,77	1,63
"	1,61	1,81	1,75
"	1,55	2,26	1,55
"	1,48	1,97	1,79
"	1,65	1,59	1,00
"	1,24	1,32	1,45
"	1,45	2,48	0,95
"	1,49	2,05	0,98
"	1,58	1,48	1,26
pH 6	2,05	1,73	1,23
"	2,11	1,54	1,07
"	2,23	2,17	1,67
"	1,91	2,10	1,39
"	2,26	1,84	2,04
"	2,07	1,97	1,72
"	1,29	1,52	2,15
"	1,78	1,78	1,88
"	1,95	1,44	1,04
"	1,80	1,81	1,17
"	1,86	1,48	1,30
"	2,18	2,27	1,72
"	1,33	0,99	1,18
"	1,01	1,15	1,16
"	1,32	2,10	1,17
"	1,11	1,80	0,97

A 12° C en los casos de *Ps. putida* y *F. odoratum*, se obtuvieron valores medios ligeramente superiores que a 7° C, mientras que *Ps. fluorescens* presentó valores medios ligeramente inferiores. A pesar de estas pequeñas diferencias, estadísticamente no se pudo demostrar en ninguna de las tres especies estudiadas. la existencia de diferencias significativas, ($P>0,05$) entre los índices de AAE a las dos temperaturas de crecimiento utilizadas,

Tabla 3.30
Comparación mediante la prueba t de Student de las AAE
a 7 y 12 °C desarrolladas por *Ps. putida*

	Índice de AAE a 7 °C	Índice de AAE a 12 °C
Media	1,55	1,66
Varianza	0,2214	0,1156
Observaciones	32	32
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	62	
Estadístico t experimental	1,12	
P (dos colas)	0,26	
Valor crítico de t $\alpha=0,05$ (dos colas)	2,00	

Tabla 3.31
Comparación mediante la prueba t de Student de las AAE
a 7 y 12 °C desarrolladas por *Ps. fluorescens*

	Índice de AAE a 7 °C	Índice de AAE a 12 °C
Media	1,81	1,72
Varianza	0,3396	0,1164
Observaciones	32	32
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	62	
Estadístico t experimental	0,78	
P (dos colas)	0,44	
Valor crítico de t $\alpha=0,05$ (dos colas)	2,01	

Tabla 3.32
Comparación mediante la prueba t de Student de las AAE
a 7 y 12 °C desarrolladas por *F. Odoratum*

	Índice de AAE a 7 °C	Índice de AAE a 12 °C
Media	1,30	1,39
Varianza	0,0945	0,1123
Observaciones	32	32
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	62	
Estadístico t experimental	1,13	
P (dos colas)	0,26	
Valor crítico de t $\alpha=0,05$ (dos colas)	1,99	

También se realizaron incubaciones a 2° C. No obstante, a esta temperatura los cultivos no alcanzaron masas celulares suficientes para generar absorbancias de 0,6 UA a 600 nm. Aún así se realizaron algunas determinaciones cuyos resultados se exponen en la tabla 3.33, pero al no haber sido obtenidos siguiendo estrictamente el mismo protocolo que los de 7 y 12 °C no se han incluido en el análisis de varianza, si bien los pocos datos obtenidos a 2 °C no presentan diferencias destacables respecto a los índices de AAE obtenidos a 7 y 12 °C y no hacen pensar en la existencia de diferencias significativas.

Tabla 3.33
Índices de AAE a 2 °C de *Ps. putida*, *Ps. fluorescens* y *F. odoratum*

pH	<i>Ps. putida</i>	<i>Ps. fluorescens</i>	<i>F. odoratum</i>
5,5	1.65	1.76	1.35
5,5	1.39	1.54	1.22
5,5	1.59		

3.7.3. EVALUACIÓN DEL ÍNDICE DE AAE POR ESPECIES.

Respecto a las diferencias de AAE entre las tres especies de bacterias que se utilizaron, *Ps. fluorescens* presentó valores medios ligeramente superiores a los de *Ps. putida* y ésta a su vez algo superiores que los de *F. odoratum*. Los resultados del análisis

de varianza que se muestran en la tabla 3.34 demostraron que los índices de AAE, en al menos una de las tres especies, presentaron diferencias significativas ($P < 0,001$).

Tabla 3.34

Análisis de varianza de los índices de AAE de *F. odoratum*, *Ps. putida* y *Ps. fluorescens*

<i>Especie</i>	<i>Número</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
<i>F. odoratum</i>	96	131,23	1,37	0,1047	
<i>Ps. putida</i>	96	155,60	1,62	0,1347	
<i>Ps. fluorescens</i>	96	166,58	1,74	0,2197	
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F experimental</i>	<i>Valor crítico de F ($\alpha = 0,05$)</i>
Entre grupos	6,82	2	3,41	22,27	
Dentro de los grupos	43,62	285	0,15	<i>probabilidad</i>	3,03
Total	50,44	287		< 0,001	

Realizando las comparaciones entre especies, dos a dos mediante una prueba t, cuyos resultados se exponen en las tablas 3.35, 3.36 y 3.37, se comprobó que *F. odoratum* presentaba diferencias significativas en sus índices de AAE tanto con respecto a *Ps. putida* como a *Ps. fluorescens* ($P < 0,001$).

Tabla 3.35

Comparación mediante la prueba t de Student de los índices de AAE de *F. odoratum* y *Ps. putida*

	<i>F. odoratum</i>	<i>P. putida</i>
Media	1,37	1,62
Varianza	0,1047	0,1345
Observaciones	96	96
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	187	
Estadístico t experimental	5,08	
P (dos colas)	< 0,001	
Valor crítico de t $\alpha = 0,01$ (dos colas)	2,60	

Sin embargo, al comparar los índices de AAE entre *Ps. putida* y *Ps. fluorescens*, aunque se obtiene una probabilidad de 0,06, sólo ligeramente superior al límite de 0,05

no se puede rechazar la hipótesis nula, aceptando, por lo tanto, la no existencia de diferencias significativas entre sus índices de AAE.

Tabla 3.36
Comparación mediante la prueba t de Student de los
índices de AAE de *F. odoratum* y *Ps. fluorescens*

	<i>F. odoratum</i>	<i>P. fluorescens</i>
Media	1,37	1,74
Varianza	0,1047	0,2197
Observaciones	96	96
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	169	
Estadístico t experimental	6,33	
P (dos colas)	< 0,001	
Valor crítico de t $\alpha= 0,01$ (dos colas)	2,60	

Tabla 3.37
Comparación mediante la prueba t de Student de los
índices de AAE de *Ps. putida* y *Ps. fluorescens*

	<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescens</i>
Media	1,62	1,74
Varianza	0,1345	0,2197
Observaciones	96	96
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	180	
Estadístico t experimental	1,88	
P (dos colas)	0,06	
Valor crítico de t $\alpha= 0,05$ (dos colas)	1,97	

Los resultados obtenidos en este apartado apuntan la idea de que algunos factores tales como el pH y la temperatura a la que crecen las bacterias no juegan un papel importante en la posterior actividad aminopeptidásica desarrollada por las mismas, siendo ésta una característica más condicionada por la especie que por el medio en el que se desarrolla la bacteria.

3.8 CARACTERÍSTICAS DE LA PRUEBA DE LA P-NITROANILINA PARA LA ESTIMACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA EN CARNE PICADA CONSERVADA EN AEROBIOSIS Y REFRIGERACIÓN.

Con todos los datos disponibles obtenidos en las mismas condiciones, tanto mediante contaminación experimental, como los realizados a partir de muestras comerciales y con el ajuste que se ha demostrado más adecuado, se elaboró una recta definitiva que se propone para su utilización como herramienta de predicción de la carga bacteriana en carne picada. La recta propuesta responde a la ecuación y a la gráfica que se expone en la figura 3.17.

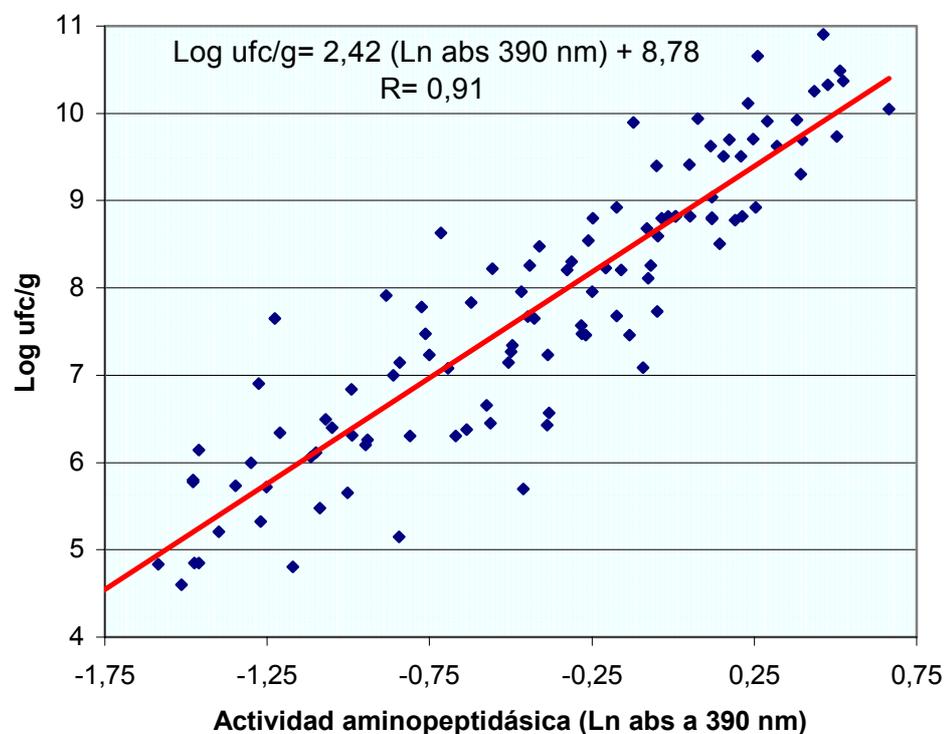


Figura 3.17: Recta de regresión definitiva para estimar la carga bacteriana de carnes picadas a partir de la actividad aminopeptidásica bacteriana.

Como se apuntó en la introducción, la prueba de la p-nitroanilina, aunque presenta unas características comparables y en ocasiones mejores que las de otros métodos rápidos de detección y cuantificación de carga bacteriana en alimentos, no es una prueba que haya alcanzado gran difusión, o al menos no existen muchas referencias

bibliográficas de su utilización práctica. Pero, habida cuenta de los resultados aquí obtenidos y de su rapidez y bajo costo, no se puede más que recomendar su utilización y aceptar un compromiso para tratar de que este método tenga la difusión que se merece y tanto la industria como la administración, como cualquier otro ente a quien le pueda interesar, al menos la conozca y pueda decidir con criterio acerca de su aplicación.

3.8.1. CORRELACIÓN Y LINEALIDAD.

La recta fue elaborada con un total de 110 muestras, de las cuales 78 se correspondieron con muestras contaminadas experimentalmente con diferentes bacterias gram negativas y 32 con muestras con su microbiota natural.

Se observó una relación lineal en el intervalo comprendido entre cargas de 10^4 y 5×10^{10} ufc/g, sin que la prueba se viese afectada por la especie de la muestra de carne utilizada.

Tanto el coeficiente de correlación ($r=0,91$), como la pendiente, ($\text{tag } \alpha = 2,42$) resultaron significativos ($P < 0,001$) consiguiéndose unos resultados, por tanto, comparables con los de otros autores que citan haber obtenido coeficientes de correlación de $r=0,96$ trabajando a partir de superficies de piezas íntegras de carne (Pérez de Castro y col. 1988), de $r=0,93$ en leche (Pérez de Castro 1989) o de $r=0,88$ en la superficie de carne y pescado (Alvarado y col. 1992, Ordóñez y García de Fernando 1996). Hay que resaltar que los trabajos en los que se obtuvieron coeficientes de correlación de $r=0,88$, al igual que en nuestro caso están realizados con un número de muestras de 5 a 6 veces superior a las procesadas por Pérez de Castro en los trabajos iniciales de desarrollo de la prueba, así pues, aunque sean coeficientes más bajos pueden ser más representativos de la correlación real de la prueba.

3.8.2. SENSIBILIDAD

Se ha comprobado que las muestras con cargas bacterianas de 5×10^4 ufc/g generan suficiente actividad aminopeptidásica para poder detectarse y estimar a partir de ellas, recuentos fiables. Por debajo de estas cargas, alrededor de 10^2 - 10^3 ufc/g, en

alguno de los apartados de optimización del método se apreció que también se generaba cierta actividad aminopeptidásica; no obstante, se consideró que la cuantificación a estos niveles no resulta fiable.

Los resultados recogidos en esta memoria coinciden básicamente con los niveles de sensibilidad para la prueba obtenidos por Pérez de Castro y col. (1988) y Pérez de Castro (1989) que la establecen en cargas bacterianas entre 10^4 y 5×10^5 ufc/cm². Alvarado y col. (1992) y Ordóñez y García de Fernando (1996) citan en sus trabajos que muestras con cargas bacterianas de 5×10^3 a 5×10^4 ufc/cm² presentaron suficiente actividad aminopeptidásica como para liberar cantidades de p-nitroanilina pequeñas, pero cuantificables.

Las pequeñas diferencias de sensibilidad entre los distintos autores pueden tener su origen en los diferentes procedimientos y tratamientos utilizados para la recogida de los microorganismos de la muestra. Así Pérez de Castro (1989) trabajando con leche, utilizó 150 ml de muestra que sometió a dos centrifugaciones, a 13.000 y 4.000 g, seguidas cada una de ellas de una resuspensión del sedimento, mientras que en el caso de la carne en superficie se hace un lavado de una superficie de 16 cm² en un caso (Pérez de Castro y col. 1988), 32,8 cm² en otro (Pérez de Castro 1989) o arrastre mediante hisopo de 16 cm² en un tercero (Alvarado y col. 1992, Ordóñez y García de Fernando 1996). Cabe la posibilidad que difiera algo la eficacia de cada uno de estos métodos, si bien, todos ellos son utilizados en multitud de métodos rutinarios.

3.8.3. EXACTITUD Y PRECISIÓN.

Antes de exponer los resultados parece oportuno aclarar algunos aspectos de los conceptos de exactitud y precisión. El término “exactitud” informa acerca de la desviación del resultado generado por la prueba respecto al valor teórico real, mientras que el de precisión establece la dispersión de los datos, independientemente de lo “acertados” que estén respecto al valor real. La precisión se puede estimar en condiciones de repetibilidad (mismo operario, mismo día, mismo equipo) o en condiciones de reproducibilidad (distintos operarios, distintos días, distintos equipos). Estas aclaraciones vienen al caso porque en alguno de los trabajos citados, a juicio del

autor, estos conceptos no se tratan de forma adecuada, pudiendo llevar a confusión a la hora de comparar los resultados obtenidos.

Para comprobar la exactitud de la prueba, considerando los recuentos en placa como valores teóricos reales, se enfrentaron los logaritmos de los recuentos estimados con los de los recuentos experimentales realizados en placa y se obtuvo la recta de regresión que se muestra en la figura 3.18.

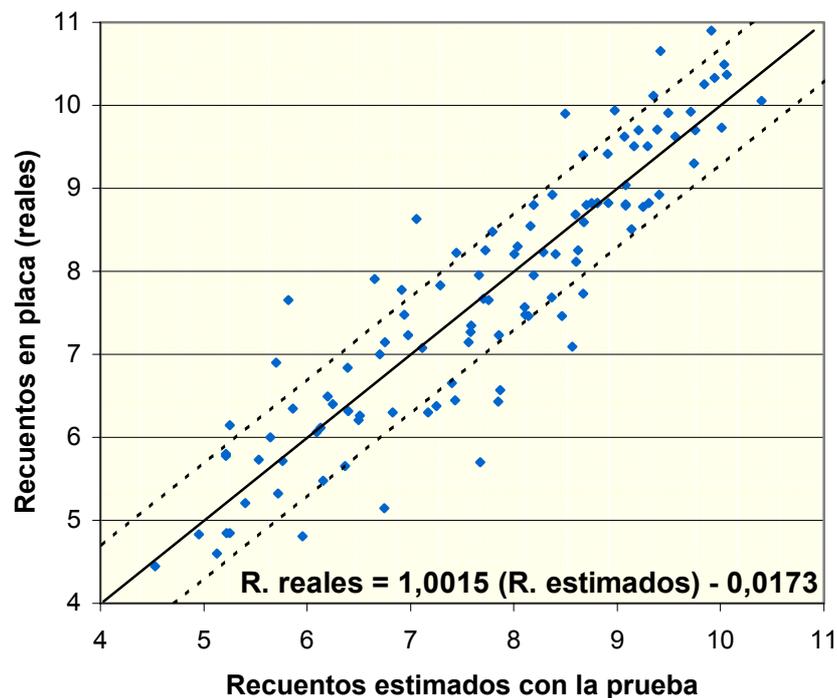


Figura 3.18: Relación entre los recuentos estimados por la prueba y los recuentos en placa

La recta generada tiene un coeficiente de correlación significativo de $r=0,91$ ($P<0,001$) y responde a la ecuación $y = 1,0015 (x) - 0,0173$ coincidiendo básicamente con la bisectriz del primer cuadrante. La pendiente, prácticamente igual a 1, indicó una estrecha relación entre los recuentos reales y los estimados y, por tanto, se demostró que la prueba de la p-nitroanilina es un método exacto sin sesgo o error sistemático. El error típico que se comete al dar un resultado a partir de los recuentos estimados, se corresponde con el error típico del corte con el eje de ordenadas, que es igual a 0,35. En la figura se ha marcado el intervalo de confianza comprendido entre \pm dos veces el error

típico ($\pm 0,70$) que incluiría el 95 % de los casos que se estimen con la recta. Este valor es ligeramente superior a los obtenidos por Pérez de Castro y col. (1988) ($\pm 0,50$) y por Alvarado y col. (1992) y Ordóñez y García de Fernando (1996) ($\pm 0,60$) para carnes en superficies y similar al obtenido por Pérez de Castro (1989) en leche. La dificultad inherente a la recuperación de las bacterias de la carne, al igual que ocurre en el caso de la leche redundante en una ligera, aunque asumible, disminución de la exactitud.

Para calcular la precisión en condiciones de repetibilidad, se realizó la prueba con la misma muestra de carne 5 veces el mismo día por el mismo operario. Para un único valor real (recuento en placa) de 7×10^8 , se obtuvieron las absorbancias y los recuentos estimados que se exponen en la tabla 3.38. La absorbancia media fue de 1,06 con una desviación típica de 0,1. Interpolando en la recta, supone un logaritmo de las ufc/g de $8,93 \pm 0,25$, resultando un valor intermedio a los obtenidos (en valor absoluto) por Pérez de Castro (1989), quien estimó la precisión en $\pm 0,37$ en el caso de la carne en superficie y en $\pm 0,22$ para la leche. De todas maneras, téngase en cuenta que ambas precisiones se calcularon, en un intervalo de valores diferentes. La precisión calculada en esta memoria supone un % de coeficiente de variación (CV) de 2,8 % respecto al logaritmo de las ufc/g. En el caso de Pérez de Castro (1989) supone un CV del 6,57 % en la carne, calculado en torno a $5,63 \text{ ufc/cm}^2$ y un CV del 3,36 % en la leche, calculado en este caso con cargas bacterianas de $5,63 \text{ ufc/ml}$.

Conviene hacer la puntualización de que al expresar la precisión como porcentaje de coeficiente de variación (desviación típica relativa), se tiene en cuenta el valor de la media, relativizando el valor, por lo que influye el punto del intervalo donde ésta se ha calculado. Así pues, se consideró más adecuado expresar la precisión del método como un porcentaje (2,8 %) y aplicarlo a cada punto que se estime oportuno y no como un valor absoluto, tal y como expresan la repetibilidad otros autores (Pérez de Castro 1989, Alvarado y col. 1992, Ordóñez y García de Fernando 1996) con los que se viene comparando los resultados.

Tabla 3.38
Cálculo de la precisión de la prueba

Actividad aminopeptidásica (abs a 390 nm) (Log abs a 390 nm)	Log ufc/g	
1,23	0,21	9,29
1,05	0,05	8,90
1,01	0,01	8,80
1,01	0,01	8,80
0,98	-0,02	8,73
Media	1,06	0,05
Desviación típica	0,1	0,09
Coefficiente de variación		2,80 %

Así por ejemplo, aplicando el % de coeficiente de variación a una muestra en la que se hubiera estimado un logaritmo de las ufc/g de 6,70 (5×10^6 ufc/g), el valor real se encontraría en el intervalo de $6,70 \pm$ el 2,8 % de ese valor ($\pm 0,19$), es decir, entre 6,89 y 6,51 ($7,7 \times 10^6$ y $3,2 \times 10^6$), lo que supone un intervalo de confianza de la media satisfactorio para un recuento bacteriano.

3.8.4. INCERTIDUMBRE DE LA LECTURA ESPECTROFOTOMÉTRICA.

En el apartado 2.4.4 del capítulo de material y métodos, se hacía referencia a la incertidumbre de la lectura de la absorbancia. La tabla 3.39 muestra los resultados medios de las lecturas semestrales de los filtros patrón de 440 y 635 nm así como las incertidumbres obtenidas. A primera vista pueden parecer unos valores altos, no obstante, la contribución a la incertidumbre por la imprecisión e inexactitud del equipo suponen porcentajes muy pequeños que pueden despreciarse y no considerarse a la hora de calcular la precisión de la prueba. No obstante, las buenas prácticas de laboratorio y el hecho de que el laboratorio donde se ha desarrollado esta investigación se encuentre actualmente acreditado por la *Entidad Nacional de Acreditación* (ENAC) de acuerdo a la norma ISO 17025 para determinadas técnicas físico-químicas y microbiológicas, ha llevado al autor de esta memoria a ser consciente de la importancia de, al menos, conocer y vigilar estos parámetros.

Tabla 3.39

Lecturas medias de los filtros patrón e incertidumbres obtenidas.

Tipo de filtro y n° de serie	FILTRO F3 (E 190)		FILTRO F4 (E 092)	
Longitud de onda de lectura	440 nm	635 nm	440 nm	635 m
Lecturas experimentales de absorbancia obtenidas	0,502	0,486	0,975	0,919
	0,502	0,486	0,974	0,919
	0,501	0,486	0,974	0,920
	0,502	0,487	0,975	0,919
	0,501	0,486	0,975	0,920
	0,502	0,487	0,974	0,919
	0,502	0,486	0,974	0,919
	0,501	0,486	0,975	0,919
	0,502	0,487	0,974	0,919
	0,501	0,486	0,974	0,920
Absorbancia teórica del filtro	0,502	0,486	0,974	0,920
Incertidumbre	0,079	0,079	0,096	0,096
Contribución a la incertidumbre por la imprecisión y la inexactitud del equipo	1,8x10⁻⁶	1,4x10⁻⁶	1,8x10⁻⁶	2,9x10⁻⁶

3.8.5. COMPARACIÓN DE LA PRUEBA DE LA P-NITROANILINA CON OTROS MÉTODOS RÁPIDOS DE ESTIMACIÓN DE CARGA BACTERIANA EN ALIMENTOS.

Aunque en la introducción se hizo una exposición de las características de los métodos rápidos microbiológicos de forma pormenorizada, a continuación se comparan aquellas características más destacables de los métodos que pueden competir con la prueba que se ha desarrollado.

Como método rápido que es, uno de los factores principales a comparar y que más se valorará, es el tiempo necesario para realizarlo. La prueba de la p-nitroanilina permite obtener resultados en aproximadamente 2 horas y media, tiempo inferior al requerido por otros métodos como la impedimetría que, dependiendo de la carga inicial, puede tardar entre 3 y 7 horas (González y col. 1994), la PCR que precisa unas 3-4 horas (Venkitanarayanan y col. 1996), la radiometría que necesita unas 4 ó 5 horas (Reasoner y Geldreich 1989), o la turbidimetría y la microcalorimetría en los que se requieren entre 16 y 24 horas para obtener resultados (Schulz y col. 1988, Jacob y col. 1989). Otros

métodos, por el contrario, resultan más rápidos. Así, el método del lisado del *Límulus* concluye en alrededor de 1 hora (Jay 1986), la DEFT en unos 20-35 minutos (Pettipher y col. 1983, Jarvis y Easter 1987) y la bioluminiscencia o medida del ATP que en tan solo de 10 a 20 minutos (Gonzalez y col. 1994) se obtiene el resultado.

Respecto a la sensibilidad de la prueba de la p-nitroanilina para carnes picadas, se ha comprobado que puede detectar y cuantificar cargas bacterianas del orden de 10^4 - 10^5 ufc/g, sensibilidad similar a la de la bioluminiscencia (Littel y col. 1986), al método del *Límulus* (Jay 1981), a la microcalorimetría (Gram y Sogaard 1985) o la prueba de la catalasa (Fung 1997). La DEFT resulta ligeramente más sensible, alrededor de 10^3 ufc/ml (Pettipher y Rodríguez 1982), al igual que la citometría de flujo, capaz de detectar entre 10^3 y 10^4 ufc/g (Malacrino y col. 2001). La sensibilidad práctica de la impedimetría, aunque teóricamente puede detectar la presencia de una sola bacteria, se encuentra entorno a 10^3 - 10^4 ufc/ml (Gonzalez y col. 1994). Otros métodos como la PCR resultan sumamente más sensibles pudiendo detectar incluso una sola copia del material genético objetivo. Aunque, por el momento, esta técnica presenta un problema, ya que no puede saberse si el material genético detectado procede de células vivas viables, de células vivas no viables o incluso de microorganismos muertos.

La correlación con el método de referencia de recuento en placa obtenida en el presente trabajo para carnes picadas con la prueba de la p-nitroanilina ha sido de $r=0,91$, mientras que otros autores como Pérez de Castro (1989) han llegado a obtener correlaciones de hasta $r=0,96$ en superficies de carne. Estos valores son comparables con los obtenidos mediante otros métodos; para la impedimetría se citan correlaciones de $r=0,85$ (Hartman y col. 1992) ó de $r=0,95$ (Firstenber-Eden y Tricarico 1983); con la técnica de la DEFT, Graham y Pettipher (1989) citan correlaciones de $r=0,91$ en carne y pescado y Vivegnis y col. (1996) de $r=0,80$ a $0,95$ para la detección de *Staphilococcus aureus* en carne picada y de $r=0,99$ para el recuento de bacterias totales en carne picada de cerdo. Utilizando la citometría de flujo se han obtenido correlaciones de $r=0,94$ (Malacrino y col. 2001). La PCR presenta coeficientes de correlación de $r=0,91$ (Venkitanarayanan y col. 1996) a $0,95$ (Gutierrez y col. 1998) y para la bioluminiscencia se citan coeficientes de $r=0,94$ (Oblinger 1985) y $0,97$ (Littel y col. 1986). El método del *Límulus* presenta correlaciones más bajas que la prueba de la p-nitroanilina, así Byrne y

Bishop (1990) obtuvieron valores de $r=0,78$ y Stolle y col. (1994) de $r=0,62$ para bacterias totales y de $r=0,77$ para las gram negativas.

Las figuras 3.19 y 3.20 muestran de forma gráfica alguno de los aspectos que se vienen considerando.

La prueba de la p-nitroanilina carece de la especificidad de otros métodos como la impedimetría, la radiometría, la citometría de flujo, la DEFT combinada con anticuerpos monoclonales, los métodos inmunológicos y por supuesto la de la PCR. No obstante, la finalidad de la misma es la predicción de la alteración de la carne picada refrigerada en aerobiosis. Esta alteración se debe, preferentemente, a la acción de las bacterias gram negativas y, recuérdese, que la prueba sí puede poner de manifiesto de forma específica a esta microbiota. Otros métodos como la bioluminiscencia, con una especificidad incluso inferior, se utilizan profusamente en el control microbiológico rutinario en la industria.

Uno de los aspectos más destacables de esta prueba es el bajo coste de la misma. Frente a otros métodos como la impedimetría, la bioluminiscencia, la PRC, la citometría de flujo o la DEFT que exigen una inversión elevada en equipos específicos, o pruebas como la del Límulus, que requieren reactivos costosos, la prueba de la p-nitroanilina puede realizarse con los equipos habituales en cualquier laboratorio y con un coste por prueba, en lo referente a reactivos, muy bajo. Para la realización de la prueba se ha utilizado en el presente trabajo una ultracentrífuga (centrifugando a 12000 g) y un espectrofotómetro de ultravioleta-visible que, aun disponibles en muchos laboratorios, pueden llevar a pensar al lector que la prueba exige cierta inversión. Sin embargo, en el apartado 3.3 se comprobó que la centrifugación a 4000 g, aunque obtiene recuperaciones ligeramente menores que con fuerzas centrífugas mayores, prolongando los tiempos de centrifugación puede ser suficiente para su aplicación como prueba de campo, al menos con carácter semicuantitativo. Además, el espectrofotómetro puede ser sustituido por un colorímetro o incluso con el ánimo de la máxima simplificación, utilizar la prueba de forma cualitativa mediante apreciación visual del color amarillo generado. En este caso la prueba permitiría distinguir entre carnes de buena calidad microbiológica, que no

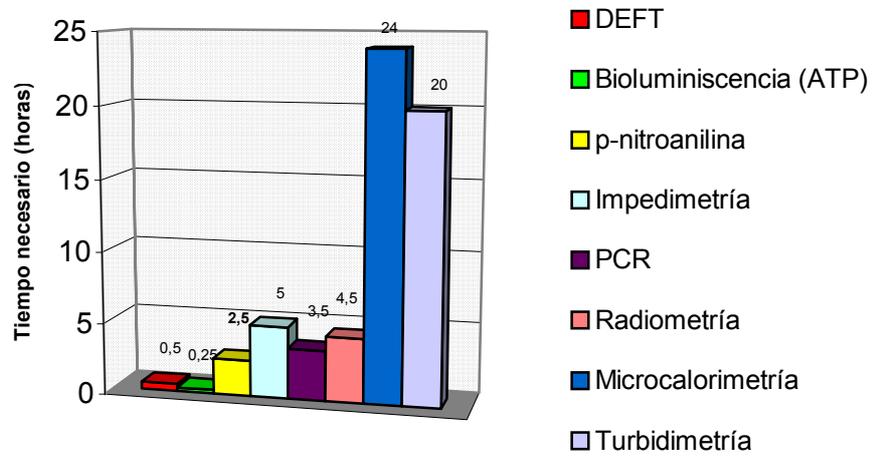


Figura 3.19: Tiempos necesarios para la realización de diferentes métodos rápidos

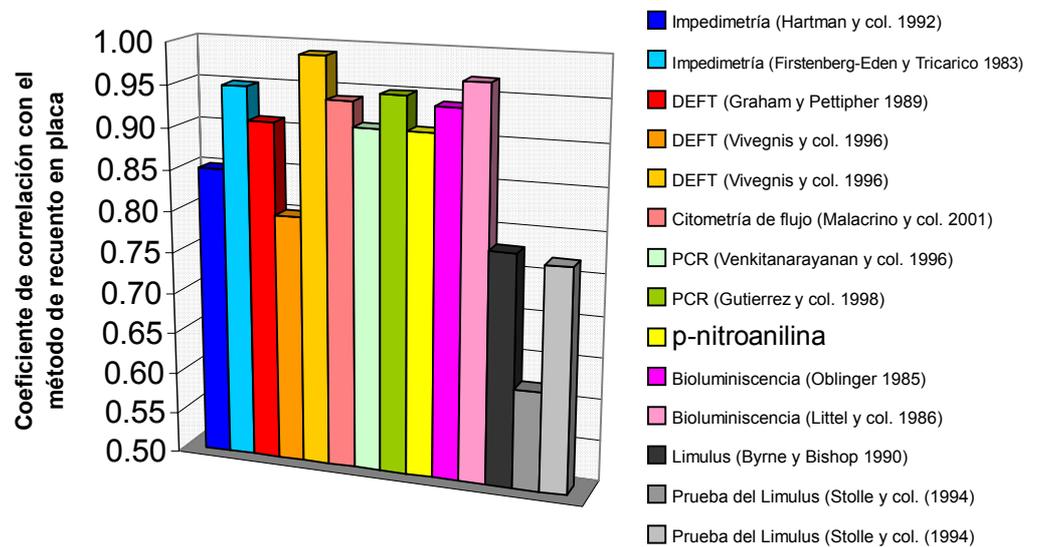


Figura 3.20: Correlación de diversos métodos rápidos con los recuentos en placa.

generan color amarillo o este es incipiente (aproximadamente 5×10^4 ufc/g), y carnes alteradas, que generan un marcado color amarillo final ($>10^8$ ufc/g). Las tonalidades ligeramente amarillas pudieran ser dudosas pero el resultado de la prueba, incluso en estos casos, complementa la información obtenida mediante la inspección de los caracteres organolépticos u otras pruebas rápidas como la determinación del pH y ayuda a la toma de decisiones rápidas y adecuadas respecto a la utilización de un producto tan perecedero como la carne picada.

A la vista de los resultados presentes y la discusión realizada se comprobó que las características de la prueba de la p-nitroanilina se encuentran a la altura de los principales métodos rápidos disponibles actualmente, siendo merecedora de tenerse en cuenta para el control microbiológico de alimentos como la carne en superficie, la leche, el pescado y ahora, como se ha demostrado, la carne picada.

4. CONCLUSIONES

1. Para cuantificar la carga microbiana de la carne picada mediante la técnica de la p-nitroanilina es imprescindible eliminar la actividad aminopeptidásica nativa de la carne ya que ésta interfiere con la determinación analítica. Esto se consigue mediante la filtración de la muestra de carne suspendida en un tampón y homogeneizada en el “stomacher” y su posterior centrifugación y eliminación del sobrenadante, sin necesidad de un posterior lavado del sedimento.
2. La recuperación de microorganismos en las condiciones señaladas en la conclusión anterior es apropiada para el desarrollo de la prueba de la p-nitroanilina o cualquier otra técnica microbiológica.
3. La actividad aminopeptidásica de las cuatro pseudomonas estudiadas (*Ps. putida*, *Ps. fragi*, *Ps. fluorescens* y *Pseudomonas* sp) es similar, no habiéndose detectado diferencias significativas entre ellas. Existen no obstante, ciertas diferencias entre la actividad aminopeptidásica de estas pseudomonas y la de otras bacterias gram negativas como *Moraxella bovis* o *Flavobacterium odoratum*. De todas maneras, estas diferencias son tan pequeñas que se recomienda obviarlas y considerar la actividad aminopeptidásica de las bacterias gram negativas como un todo, al menos para la aplicación de la prueba de la p-nitroanilina. Por tanto, se recomienda la utilización de todos los datos obtenidos con diferentes especies para la confección de una recta de regresión que pueda utilizarse para la estimación de la carga microbiana de la carne picada mediante la prueba de la p-nitroanilina.
4. Las condiciones de pH y de temperatura en que se desarrollan las bacterias gram negativas no afectan a su capacidad aminopeptidásica, por lo que puede afirmarse que los resultados de la prueba de la p-nitroanilina serán fiables independientemente de las condiciones, al menos de pH y temperatura, en que se hayan desarrollado las bacterias gram negativas en la carne.

5. La prueba de la p-nitroanilina puede utilizarse para la estimación de los recuentos bacterianos de carnes picadas conservadas en aerobiosis y refrigeración aplicando la siguiente ecuación:

$$y = 8,78 + 2,42 x$$

Donde:

y = Logaritmo decimal de las ufc/g

x = Logaritmo natural de la absorbancia a 390 nm.

6. La prueba de la p-nitroanilina (a) es muy fiable porque presenta una elevada correlación con el método tradicional de recuento en placa ($r = 0,91$; $n = 110$); (b) es sensible, porque puede detectar niveles de 5×10^4 ufc/g; (c) es de gran exactitud porque el 95% de los resultados estimados están dentro del intervalo de $\pm 0,70$ veces el logaritmo decimal de las ufc/g de los recuentos reales; (d) es precisa porque este parámetro, estimado en condiciones de repetibilidad y expresado como coeficiente de variación, supone el 2,8 % y (e) es rápida porque puede aplicarse en un tiempo de 2 horas y 30 minutos.

5. RESUMEN

La prueba de la p-nitroanilina fue desarrollada por Pérez de Castro en 1988 para estimar la carga bacteriana de leche, piezas cárnicas y pescado. Se basa en la actividad aminopeptidásica de las bacterias gram negativas, principales responsables de la alteración de los productos conservados en refrigeración y capaces de transformar la l-alanina-p-nitroanilida (incolora) en p-nitroanilina (de color amarillo), detectable por espectrofotometría UV a 390 nm. Estos autores manifestaron la dificultad de utilizar esta técnica en carnes picadas debido a los problemas de recuperación de las bacterias y, sobre todo, por la liberación de las aminopeptidasas endógenas de la carne que interfieren con la reacción.

Basándose en estos antecedentes, se planteó como objetivo principal poner a punto la técnica de la p-nitroanilina para carnes picadas desarrollando un procedimiento que recuperase un número suficiente de bacterias y que eliminase la actividad aminopeptidásica propia de este producto. Adicionalmente, se planteó demostrar que la prueba de la p-nitroanilina predice con exactitud la calidad microbiológica de los alimentos, independientemente de las especies predominantes o de las condiciones de temperatura y pH en que las bacterias se hayan desarrollado.

Todos los objetivos marcados se han alcanzado. Se ha demostrado que existe una correlación lineal entre los logaritmos naturales de las absorbancias a 390 nm (actividad aminopeptidásica de la contaminación microbiana de carnes picadas), y los logaritmos decimales de los recuentos en placa de dicha carga, que responde a la ecuación: $\text{Log ufc/g} = 2,42 (\text{Ln abs } 390 \text{ nm}) + 8,78$. Además se ha observado que las diferencias entre la actividad aminopeptidásica de las bacterias alterantes de la carne son mínimas, siendo esta actividad independiente de las condiciones de crecimiento.

Se concluye que el procedimiento desarrollado permite aplicar la prueba de la p-nitroanilina para estimar la carga bacteriana de la carne picada conservada en refrigeración y aerobiosis. La correlación con el método de recuento en placa ($r = 0,91$; $n = 110$), es comparable a la de otros métodos rápidos; es sensible, porque detecta niveles a partir de 5×10^4 ufc/g; es de gran exactitud, porque el 95% de los resultados estimados están dentro del intervalo de $\pm 0,70$ veces el log ufc/g de los recuentos reales; es precisa, con un CV del 2,8 % y es rápida, porque puede finalizarse en unas 2 horas y

media. Todo ello la hacen merecedora de tenerse en cuenta como herramienta de control microbiológico de la carne picada y otros alimentos, especialmente aquellos más perecederos, que exigen decisiones rápidas y acertadas respecto a su destino.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ABDEL-AZIZ, S., HUSSEIN, L., ESMAIL, S. y EL-AWADI, N. (1997). In vivo rat assay for true protein digestibility and protein quality of beef and meat products extended with soy protein. *Int. J. Food. Sci. Nutr.*, **48**: 51-56.
- ABDEL-BAR, N.M. y HARRIS, N. (1984). Inhibitory Effect of *Lactobacillus bulgaricus* on Psychrotrophic Bacteria in Associative Cultures and in Refrigerated Foods. *J. Food Prot.*, **47**: 61-64.
- ACHSTETTER, T., EMTER, O., EHMANN, C. y WOLF, D.H. (1984). Proteolysis in eukariotic cells. Identification of multiple proteolytic enzymes in yeast. *J. Biol. Chem.*, **259**: 13334-13343.
- AHVENAINEN, R., WIRTANEN, G. y MANNINEN, M. (1989). Ultrasound imaging a non destructive method for monitoring the microbiological quality of aseptically packed milk products. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, **22**: 382-386.
- AKIHIKO, I., HITOSHI, S., HIROYUKI, W., SUGIO, W. y YOSHIMI, M. (1999). Microcalorimetric análisis of fermentation of natto, a traditional Japanese food. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. **46**: 279-284.
- ALVARADO, F.J., GONZALEZ, C. WONG, C., GUTIERREZ, L., SEPULVEDA, J. y KUMATE, J. (1994). Identification of *Vibrio cholerae* O1 by flow cytometry. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **36**:283-293.
- ALVARADO, R., RODRIGUEZ-YUNTA, M.A., HOZ, L., GARCIA DE FERNANDO, G.D. y ORDÓÑEZ, J.A. (1992). Rapid p-nitroaniline test for assessing microbial quality of refrigerated meat. *J. Food Sci.*, **57**: 1330-1331.
- ANG, C.Y.W., LIU, F., TOWNSED, W.E. y FUNG, D.Y.C. (1994). Sensitive catalase test for end-point temperature of heated chicken meat. *J. Food Sci.*, **59**: 494-497.
- ANTOLÍN, A., GONZÁLEZ, I., GARCÍA, T., HERNÁNDEZ, P. E. y MARTÍN, R. (2001) *Arcobacter* spp. enumeration in poultry using a combined PCR-ELISA assay. *Meat Sci.* **59**: 169-174.
- APPL, C.P. y MARSHALL, R.T. (1984). Detachment of *Pseudomonas fluorescens* P26 from beef rinsed in salt and acid solutions. *J. Food Prot.*, **47**: 537- 541.
- ASENSIO, M.A.; ORDÓÑEZ, J.A., y SANZ, B. (1988). Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on the shelf-life of refrigerated pork packed in plastic bags. *J. Food Sci.* **51**: 356-360.
- ASGHAR, A. y BHATTI, A.R. (1987). Endogenous proteolytic enzymes in skeletal muscle: their significance in muscle physiology during post mortem aging events in carcasses. *Advances in Food Research*, **31**: 345-451.
- AYRES, J.C. (1960). Temperature relationship and some other characteristics of the microbial developing on refrigerated beef. *Food Research*, **25**; 1-18.

- BAIN, N. y SHEWAN, J.M. (1968). Identification of Aeromonas, Vibrio and related organisms. En: *Identification Methods for Microbiologists, Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser. N° 2, Part B.* (eds.: Gibbs, B.M. y Shapton, D.A.). Ed.: Academic Press, New York p:79.
- BANERJEE, S.K., PANDIAN, S., TODD, E.C. y FARBER, J.M. (2002). A rapid and improved method for the detection of Vibrio parahaemolyticus y Vibrio vulnificus strains grown on hydrophobic grid membrane filters. *J. Food Prot.* **65**: 1049-1053.
- BANWART, G.J. (1989). Control of microorganisms by destruction. En: *Basic Food Microbiology 2ª ed.* (ed.: Van Nostrand Reinhold). Ed.: AVI Book, New York. pp: 283-312.
- BARNEY, M y KOT, E. (1992). A comparison of rapid microbiological methods for detecting beer spoilage microorganisms. *Technical Quarterly Masters Brewers Association of the Americas*, **29**: 91-95.
- BARRET, A.J. (1980). The classification of proteinases. En: *Protein Degradation in Health and Disease (Ciba Foundation Symposium 75)*. (eds.: Evered, D. y Whelan, J.). Ed.: Excerpta Medica. Amsterdam. pp: 5-32.
- BARRIADA, M. (1995). Variables que determinan la calidad de la canal y de la carne en vacuno. *Bovis*, **66**: 95-111.
- BARRY, R., OWEN, J. y McMEEKIN, T.A. (1984). Genus *Flavobacterium*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1.(eds.: Krieg, N.R. y Holt, J.G.). Ed.: Williams & Wilkins, Baltimore. pp: 353-361.
- BAYOUDH, A., GHARSALLH, N., CHAMKHA, M., DHOUIB, A., AMMAR, S. y NASRI, M. (2000). Purification and characterization of alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1. *J. of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **24**: 291-295.
- BELL, W.N. y SHELEF, L.A. (1978). Availability and microbial stability of retail beef-soy blends. *J. Food Sci.*, **43**: 315-318.
- BELTRAN, J.A., JAIME, I., SANTOLARIA, P., SAÑUDO, C., ALBERTI, P. y RONCALES, P. (1997). Effect of stress-induced high post mortem pH on protease activity and tenderness of beef. *Meat Sci.*, **15**: 201-207.
- BENDALL, J.R. (1973). Post mortem changes in muscle. En: *Structure and function of muscle* Vol. 2, 2ª ed.. (ed.: Bourne, G.H.). Ed.: Academic Press, New York. pp: 243-309.
- BENEDICT, R.C., SCHULTS, F.J. y JONES, S.B. (1991). Attachment and removal of *Salmonella* spp. on meat and poultry tissues. *J. Food Safety*, **11**: 135-148.

- BERGAN, T. y KOCUR, M. (1986). Genus II. *Stomatococcus*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 2. (eds.: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G.). Ed.: Williams & Wilkins, Baltimore. pp: 1008-1013
- BEYER, K. y SINELL, H.J. (1981). Psychrotrophic microorganisms in vacuum packaged chilled beef trimmings. En: *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*. (eds.: Roberts, T.A., Hobbs, G., Christian, J.H.B. y Skovgaard, N.). Ed.: Academic Press, Nueva York. pp: 191-198.
- BISHOP, J.R., WHITE, C.R. y FIRSTENBERG-EDEN, R. (1984). A rapid impedimetric method for determining the potential shelf-life of pasteurized whole milk. *J. Food Sci.*, **47**: 471-475.
- BISHOP, J.R. y WHITE, C.H. (1985). Estimation of potential shelf-life of cottage cheese utilizing bacterial numbers and metabolites. *J. Food Sci.*, **48**: 663-667.
- BISHOP, J.R. y WHITE, C.H. (1986). Assessment of Dairy Product Quality and Potential Shelf-life: a Review. *J. Food Prot.*, **49**: 739-753.
- BLAIR, I.S. y McDOWELL, D.A. (1995). Detection of extracellular proteinase of *Pseudomonas fragi* by enzyme-linked immunosorbent assay. *Current Microbiology*, **31**: 180-185.
- BLANCHARD, P.J. y MANTLE, D. (1996). Comparison of Proteolytic Enzyme Levels in Chicken, Pig, Lamb and Rabbit Muscle at Point of Slaughter: Role in Meat Tenderisation post mortem. *J. of Science Food and Agricultural*, **71**: 83-91.
- BLIXT, Y. y BORCH, E. (2002). Comparison of shelf life of vacuum-packed pork and beef. *Meat Science*, **60**: 371-378.
- BOISEN, F., SKOVGAARD, N., EWALD, S., OLSSON, G. y WIRTANEN, G. (1992). Quantitation of microorganisms in raw minced meat using the direct epifluorescent filter technique: NMLK collaborative study. *J. AOAC Int.* **75**: 465-473.
- BOSTEL, W. y STROH, R. (1995). Applications and evaluation of the Limulus test for egg products experiences from routine analices. *Getreide Mehl Brot*, **49**: 243-246.
- BOTHA, W.C., LÜCK, H. y JOOSTE, P.J. (1986). Determination of Bacterial ATP in Milk- The Influence of Adenine Triphosphate-Hydrolyzing Enzymes from Somatic Cells and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Food Prot.* **49**: 822-825.
- BOVENIZER, J.S., JACOBS, M.B., O'SULLIVAN, C.K. y GUILBAUT, G.G. (1998). The detection of *Pseudomonas aeruginosa* using the quartz crystal microbalance. *Analytical Letters*, **31**:1287-1295.
- BOVRE, K. (1984). Genus II *Moraxella*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1. (eds.: Krieg, N.R. y Holt, J.G.). Ed.: Williams & Wilkins, Baltimore. pp: 296-303.

- BRAEUNIG, I. y TRENNER, P. (1996). Studies on the limiting value problem with application of the Lightning Registered bioluminescence method. *Fleischwirtschaft*, **76**: 1127-1130.
- BRAUN, P., KLUG, C. y FEHLHABER, K. (1998). Investigation into the heat stability of bacterial proteases and lipases. *Archiv fuer Lebensmittelhygiene*, **49**: 139-145.
- BRADBURY, J.F. (1984). Genus *Xantomonas*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1. (eds: Krieg, N.R. y Holt, J.G.) Ed.: Williams & Wilkins, Baltimore. pp:201-211.
- BROWNLIE, L.E. (1966). Effect of some environment factors on psychrotrophic microbacteria. *J. of Applied Bacteriol*, **29**: 447-454.
- BULTE, M. y REUTER, G. (1984). Impedance Measurement as a Rapid Method for the Determination of the Microbial Contamination of Meat Surfaces, Testing Two Different Instruments. *Int. J. Food Microbiol.*, **1**: 113-125.
- BYRNE, R.D. y BISHOP, J.R. (1990). The Limulus Amoebocyte Lysate Assay and the Direct Epifluorescent Filter Technique as estimators of potential shelf-life of pasteurized fluid milk. *J. Food Prot.*, **53**: 151-153.
- CADY, P. (1978). Progress in impedance measurements in microbiology. En: *Mechanizing Microbiology*. (eds.: Sharpe, A.N. y Clark, D.S.). Ed.: Charles C. Thomas, Springfield, Illinois. pp: 199-204.
- CAHAN, R., AXELRAD, I., SAFRIN, M., OHMAN, D.E. y KESSLER, E. (2001). A secreted aminopeptidase of *Pseudomonas aeruginosa*. Identification, primary structure and relationship to the other aminopeptidases. *J. of Biological Chemistry*, **276**: 43645-43652.
- CAPRIOGLIO, D.R., PADILLA, C y WERNER-WASHBURNE, M. (1993). Isolation and characterization of AAP1. A gene encoding an alanine/arginine aminopeptidase in yeast. *J. Biol. Chem.*, **268**: 14310-14315
- CARL, K.E. (1975). Oregon's experience with microbiological standards for meat. *J. Milk Food Technol.*, **38**: 483-486.
- CARRASCO, J.L. (1989). El método estadístico en la investigación médica. (ed.: Carrasco, J.L.). Ed.: Ciencia 3, S.A. Madrid.
- CERNY, G. (1972). Selective freisetzung periplasmatischer proteine aus Gram-negativen bakterien durch polymyxin B als neues kriterium fur de lokalisierung von proteiene im periplasmatischen raum. Diss. T.U. München.
- CERNY, G. (1976). Method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *European J. Appl. Mirobiol.*, **3**: 223-225.

- CERNY, G. (1978). Studies on the aminopeptidase test for the distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *European J. Appl. Microbiol.*, **5**: 113-122.
- CHAMPAGNE, C.P., GARDNER, N.J., FONTAINE, J. y RICHARD, J. (1997). Determination of viable bacterial populations in raw milk within 20 minutes by using a direct epifluorescent filter technique. *J. Food Prot.*, **60**: 874-876.
- CHANDLER, R.E. y McMEEKIN, T.A. (1989). Modelling the growth response of *Staphylococcus xylosus* to changes in temperature and glycerol concentration/water activity. *J. Appl. Bacteriol.*, **66**: 543-548.
- CHEN, J. (2000). ATP bioluminescence: a rapid indicator for environmental hygiene and microbial quality of meats. : *Dairy Food Environ. San.*, **20**: 617-620.
- COLEMAN, G., BROWN, S. y STORMONTH, D.A. (1975). A model for the regulation of bacterial extracellular enzyme and toxin biosynthesis. *J. of Theoretical Biology*, **52**:143-148.
- COLLINS, M.D., HUTSON, R.A., GRANT, I.R. y PATTERSON, M.F. (2000). Phylogenetic characterization of a novel radiation-resistant bacterium from irradiated pork: description of *Hymenobacter actinosclerus* sp. nov.. *Int. J. of Systematic Evolution Microbiology*, **2**: 731-734.
- CORDOBA. M.G., CORDOBA, J.J. y JORDANO, R. (1998). Evaluation of microbial hazards during processing of Spanish prepared flamenquin. *J. Food Prot.* **61**: 693-699.
- COSTERTON, J.W., CHENG, K.J., GEESY, G.G., LADD, T.I., NICKEL, J.C., DASGUPTA, M. y MARRIET, T.J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.*, **41**:435-464.
- COSTERTON, J.W., MARRIET, T.J. y CHENG, K.J. (1985). Phenomena of bacterial adhesion. En: *Bacterial Adhesion Mechanisms and Physiological Significance*. (ed.: Savage D.C.). Ed.: Plenum Press, Nueva York. p:3.
- COSTIN, J.D., KAPPNER, M. y SCHMIDT, W. (1983). Differenzierung von grampositiven und gramnegativen Bakterien mit dem L-alanin-Aminopeptidase-Test. *Forum Mikrobiologie*, **6**: 351-353
- COWMAN, R.A. y BARON, S.S. (1993). Comparison of aminopeptidase activities in four strains of mutans group oral streptococci. *Infect. Immun.*, **61**: 182-186.
- CRAVEN, S.E. y MERCURI, A.J. (1977). Total aerobic and coliform counts in beef-soy and chicken-soy patties during refrigerated storage. *J. Food Prot.* **40**: 112-115.
- CURIALE, M.S., SONS, T., FANNING, L., LEPPER, W., McIVER, D. GARRAMONE, S. y MOZOLA, M. (1994). Deoxyribonucleic acid hybridization

- method for the detection of *Listeria* in dairy products, seafoods and meats: collaborative study. *J. AOAC Int.* **77**: 602-617.
- DAINTY, R.H. (1996) Chemical/biochemical detection of spoilage. *Int. J. Food Microbiol.*, **33**: 19-34.
- DAINTY, R.H. y HIBBARD, C.M. (1980). Aerobic metabolism of *Brochotrix thermosphacta* growing on meat surfaces and in laboratory media. *J. Appl. Bacteriol.*, **48**: 387-396.
- DAINTY, R.H. y HIBBARD, C.M. (1983). Precursors of mayor end products of aerobic metabolism of *Brochotrix thermosphacta*. *J. Appl. Bacteriol.*, **55**: 127-133.
- DAINTY, R.H., SHAW, B.G., DE BOER, K.A. y SCHEPS (1975). Protein changes caused by bacterial growth on beef. *J. Appl. Bacteriol.*, **39**: 73-81.
- DAINTY, R.H., SHAW, B.G. y ROBERTS, T.A. (1983). Microbial and chemical changes in chill stored red meats. En *Food Microbiology: Advances and Prospects*. (eds. Roberts, T.A. y Skinner, F.A.). Ed.: Academic Press Inc, London. pp: 151-178.
- D'AOUST, J.Y., SEWELL, A.M., GRECO, P., MOZOLA, M.A. y COLVIN, R.E. (1995). Performance assessment of the GENE-TRAK colorimetric probe assay for the detection of foodborne *Salmonella* spp. *J. Food Prot.*, **58**: 1069-1076.
- DAWSON, C.; BELLOCH, C.; GARCIA LOPEZ, M.D. y URUBURU, F. (1990). Colección Española de Cultivos Tipo. Catálogo de cepas . 3ª Ed..
- DEIBL, J., PAULSEN, P. y BAUER, F. (1999). Rapid enumeration of total aeróbic microbial counts on meta and in meta products by means of the direct epifluorescence filter technique. *Wiener Tieraerzliche Monatsschrift*, **85**: 327-333.
- DeGRAFT-HANSON, J.A. y HEATH, J.L. (1990). Effect of D-mannose on motility, presence of flagella and attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to chicken skin cells. *Poultry Sci.*, **69**: 1404-1409.
- DELAQUIS, P.J., GARIEPY, C., MONTPETIT, D. (1992). Confocal scanning laser microscopy of porcine muscle colonized by meat spoilage bacteria. *Food Microbiology*, **9**:147-153.
- DELAQUIS, P.J. y McCURDY, A.R. (1990). Colonitacion of Beef Muscle Surfaces by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi*. *J. Food Sci.*, **55**: 898-902.
- DELPASSAND, E.S., CHARI, M.V., STAGER, C.E., MORRISETT, J.D., FORD, J.J. y ROMAZI, M. (1995). Rapid identification of common human pathogens by high resolution proton magnetic resonance spectroscopy. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 1258-1262.

- DENIS, M., REFREGIER-PETTON, J., LAISNEY, M.J., ERMEL, G. y SALVAT, G. (2001). Campylobacter contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Camp. Coli*. *J. Appl. Microbiol.* **91**: 255-267.
- DICKSON, J.S. y KOOHMARAIE, M. (1989). Cell surface characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 832-836.
- DRAUGHON, F.A., MELTON, C.C. y STANSBURY, J.B. (1982). Growth of bacteria in soy-extended ground beef stored at three temperatures. *J. Food Prot.*, **45**: 699-702.
- DUITSCHAEVER, C.L., ARNOTT, D.R. y BULLOCK, D.H. (1973). Bacteriological quality of raw refrigerated ground beef. *J. Milk Food Technol.*, **36**:375-383
- DUZHII, D.E. y ZAVIL'GEL'SKII, G.B. (1994). Bacteriophage lambda:lux: design and expression of bioluminescence in *E. coli* cells. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* **3**: 36-38.
- EASTER, M.C. y GIBSON, D.M., (1989). Detection of microorganisms by electrical measurements. En: *Rapid methods in food microbiology*. (eds.: Adams, M.R. y Hope, C.F.A.). Ed.: Elsevier Science Publishers. Amsterdam. pp: 57-100.
- EDWARDS, R.A., DAINY, R.H. y HIBBARD, C.M. (1985). Putrescine and cadaverine formation in vacuum packed beef. *J. Appl. Bacteriol.*, **58**: 13-19.
- EGAN, A.F. y GRAU, F.H. (1981). Environmental conditions and the role of *Brochothrix thermosphacta* in the spoilage of fresh and processed meat. En: *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*. (eds.: Roberts, T.A., Hobbs, g., Christian, J.H.B. y Skovgaard, N.). Ed.:Academic Press, Nueva York. pp: 211-221.
- EDDY, B.P. (1960). The use and meaning of the term "psychrophilic". *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 189-190.
- EDMISTON, A.L. y RUSSELL, S.M. (2000). Specificity of a conductance assay for enumeration of *Escherichia coli* from broiler carcass rinse samples containing genetically similar species. *J. Food Prot.*, **63**: 264-267.
- EISEL, W.G., LINTON, R.H. y MURIANA, P.M. (1997). A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a red meta processing plant. *Food Microbiology*, **14**: 273-282.
- EL-LEITHY, A. y RASHAD, M. (1989). Bacteriological Studies on Ground Meat and its Products. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **40**: 58-61.
- ELLERBROEK, L., NGOG LINH DAM-LU; KRAUSE, P. y WEISE, E. (1998). Higiene monitoring in poultry meat production. Use of bioluminescence ATP assay. *Fleischwirtschaft* **78**:486-487.

- ENTIS, P. y BOLESZCZUK, P. (1990). Direct enumeration of coliforms and *Escherichia coli* by hydrophobic grid membrane filter in 24 hours using MUG. *J. Food Prot.*, **53**: 948-952.
- ENTIS, P. y LERNER, I. (1996). Two-day and yeast and mold enumeration using *ISO-GRID*-membrane filtration system in conjunction with YM-11 agar. *J. Food Prot.*, **59**: 416-419.
- ENTIS, P., FUNG, D.Y.C., GRIFFITHS, M.W., McINTRE, L., RUSSELL, S., SHARPE, A.N. y TORTORELLO, M.L. (2001). Rapid Methods for Detection, Identification, and Enumeration. En: *Compendium of Methods for the Microbial Examination of Foods* 4ª Ed. (eds.: Pouch, F. e Ito, K.). Ed.: American Public Health Association. Washington. pp: 89-126.
- ERIBO, B.E., y JAY, J.M. (1985). Incidence of *Acinetobacter* spp. and other gram negative bacteria in fresh and spoiled ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 256-257.
- ERIBO, B.E., LALL, S.D. y JAY, J.M. (1985). Incidence of *Moraxella* and other gram-negative oxidase-positive bacteria in fresh and spoiled ground beef. *Food Microbiology* **2**: 237-240.
- ESKIN, N.A.M., HENDERSON, H.M. y TOWNSED, A.J. (1971). Microbiological deterioration of proteins and protein foods. En: *Biochemistry of foods*. (eds.: Eskin, N.A.M., Henderson, H.M. y Townsed, A.J.). Ed.: Academic Press, New York. pp:183-217.
- ETHERINGTON, D.J. (1984). The contribution of proteolytic enzymes to post mortem changes in muscle. *J. Anim. Sci.* **59**:1644-1650.
- FARR, L. (1986). Microbiological control. Giving rapid results. *Meat Industry*, **59**: 11-13.
- FERNANDEZ DE PALENCIA, P., LOPEZ DE FELIPE, F., REQUENA, T. y PELAEZ, C. (2000). The aminopeptidase C (PepC) from *Bacillus helveticus* CNRZ32. A comparative study of PepC from lactic acid bacteria. *European Food Research and Technology*, **212**: 89-94.
- FIRSTENBERG-EDEN, R. (1983). Rapid estimation of the number of microorganisms in raw meat by impedance measurement. *Food Technol.*, **37**: 64-70.
- FIRSTENBERG-EDEN, R. (1985). Electrical impedance method for determining microbial quality of foods. En: *Rapid Methods and Automatitation in Microbiology and Immunology*. (ed.: Habermehl, K.O.). Ed.: Springer-Verlag. Berlin. pp: 679-687.
- FIRSTENBERG-EDEN, R., NOTERMANS, S. y SCHOTHORST, M. (1979). Attachment of certain bacterial strains to chicken and beef meat. *J. of Food Safety*, **1**: 217-228.

- FIRSTENBERG-EDEN, R., y TRICARICO, M.K. (1983). Impedimetric determination of total, mesophilic and psychrotrophic counts in raw milk. *J. Food Sci.*, **48**: 1750-1754.
- FLORES, M., ARISTOY, C., TOLDRA, F. (1998). Feedback inhibition of porcine muscle alanyl and arginyl aminopeptidase in cured meat products. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 4982-4986.
- FLORES, M., ARISTOY, M.C., TOLDRA, F. (1993). HPLC purification and characterization of porcine muscle aminopeptidase B. *Biochemie.*, **75**: 861-867.
- FLORES, M., ARISTOY, M.C., TOLDRA, F. (1997). HPLC purification and characterization of soluble alanyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, **44**: 2578-2583.
- FLORES, M., ARISTOY, M.C., TOLDRA, F. (1999). Hydrolysis of alanine oligopeptides by porcine muscle alanyl aminopeptidase. *European Food Research and Technology*, **208**: 264-266.
- FLORES, M., MARINA, M., TOLDRA, F. (2000). Purification and characterization of a soluble methionyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. *Meat Science*, **56**: 247-254.
- FOSTER, J.F., HUNDERFUND, R.C. FOWLER, J.L., FRUIN, J.T. y GUTHERZ, L.S. (1978). Bacterial populations of ground beef, textured soy protein and ground beef extended with soy protein after 3 and 10 days of refrigerated storage. *J. Food Prot.*, **41**: 647-653.
- FRANK, H.A., REID, A., SANTO, L.M., LUM, N.A. y SANDLER, S.T. (1972). Similarity in several properties of psychrophilic bacteria grown at low and moderate temperatures. *Appl. Microbiol.*, **24**: 571-574.
- FRICKE, B. y AURICH, H. (1993). Periplasmic aminopeptidases in *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Basic Microbiol.*, **33**: 291-299.
- FRIES, R. y GRAW, C. (1999). Water and air in two poultry processing plants chilling facilities a bacteriological survey. *Br. Poult. Sci.*, **40**: 52-58
- FUNG, D.Y.C. (1997). Overview of Rapid Methods of Microbiological Analysis. En: *Food Microbiological Analysis New Technologies*. (eds.: Tortorello, M.L. y Gendel, S.M.). Ed.: Marcel Dekker, Inc.. New York. pp: 1-25.
- FURUHATA, K., MATSUMOTO, A., FUKUYAMA, M. y TABUCHI, K. (1992). Endotoxin level in drinking water measured with a chromogenic limulus test. *J. Antibacterial Antifungal Agents Japan*. **20**: 519-523.

- GAL-GARBER, O., UNI, Z. (2000). Chicken intestinal aminopeptidase: partial sequence of the gene, expression and activity. *Poultry Science*, **79**: 41-45.
- GARCIA, M.J., ZÚÑIGA, M. y URRUBURU, F. (1991). Métodos directos de medida de crecimiento bacteriano. *Alimentaria*, **9**: 31-34.
- GARDE, S., GAYA, P., MEDINA, M. y NÚÑEZ, M. (2002). Autolytic behaviour of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *L. lactis* subsp. *lactis* wild isolates from ewes' raw milk cheeses. *Milchwissenschaft*, **57**: 143-147.
- GARDNER, G.A. (1965). The aerobic flora of stored meat with particular reference to the use of selective media. *J. Appl. Bacteriol.*, **28**: 252-264.
- GARDNER, G.A. (1981). *Brochotrix thermosphacta* (*Microbacterium thermosphacta*) in the spoilage of meats: A review. En: *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity* (eds.: Roberts, T.A., Hobbs, G., Christian, J.H.B., y Skovgaard, N.). Ed.: Academic Press, Londres. pp: 139-173.
- GARDNER, G.A., CARSON, A. W. y PATTON, J. (1967). Bacteriology of prepackaged pork with reference to the gas composition within the pack. *J. Appl. Bacteriol.*, **30**: 321-333.
- GARDINI, F. GUERZONE, M.E., LANCIOTTI, R. y ABDULLAH, B. (1999). Microbiological method for presumptive identification of irradiated poultry meat. *Industria Alimentari*, **38**: 1423-1433.
- GARIBALDI, J.A., IJICHI, K. y BAYNE, H.G. (1969). Effect of pH and chelating agents on the heat resistance and viability of *Salmonella typhimurium* Tm-1 y *Salmonella seftenberg* 775W in egg white. *J. Appl. Microbiol.*, **18**: 318-322.
- GAUTAM-SATYENDRA., ARUN-SHARMA. y THOMAS, P. (1998). Improved bacterial turbidimetric method for detection of irradiated spices. *J. Agric. Food Chem.*, **46**: 5110-5112.
- GAUTHIER, G., GAUTHIER, M. y CHRISTEN, R. (1995). Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella* and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. Nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. of Systematic Bacteriology*, **45**: 755-761.
- GENNARI, M., PARINI, M., VOLPON, D. y SERIO, M. (1992). Isolation and characterization by conventional methods and genetic transformation of *Psychrobacter* and *Acinetobacter* from fresh and spoiled meat, milk and cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, **15**: 61-75.
- GEORNARAS, I., DE JESUS, A.E. y VON HOLY, A. (1998). Bacterial populations associated with the area of a South African poultry abattoir. *J. Food Prot.*, **61**: 700-703.

- GILL, C. O. (1976). Substrate limitation of bacterial growth at meat surfaces. *J. Appl. Bacteriol.*, **41**: 401-410.
- GILL, C. O. (1979). Intrinsic bacteria in meat. *J. Appl. Bacteriol.*, **47**, 367-378.
- GILL, C.O. (1980). Total and intramuscular bacterial population of carcasses and cuts. Proceedings of the 33rd Annual Reciprocal Meat Conference. *American Meat Science Association*, **33**: 47-53.
- GILL, C.O. (1983). Meat Spoilage and Evaluation of the Potential Storage Life of Fresh Meat. *J. Food Prot.*, **5**: 444-452.
- GILL, C.O. (1986). The control of microbial spoilage in fresh meats. En: *Advances in Meat Research. Meat and Poultry Microbiology*. Vol. 2. (eds.: Pearson and T.R. Dutson). Ed.: AVI Publishing Co., Westport, CT. pp.49-88.
- GILL, C.O. (1986a). The microbiology of chilled meat storage, Proceedings of the 24th Meat Industry Research Conference, Hamilton, New Zealand, MIRINZ publication **852**: 210-213.
- GILL, C.O. y BRYANT, J. (1992). The contamination of pork with spoilage bacteria during commercial dressing, chilling and cutting of pig carcasses. *Int. J. Food Microbiol.*, **16**: 51-62.
- GILL, C.O. y MCGINNIS, C. (1993). Changes in the microflora on commercial beef trimmings during their collection, distribution and preparation for retail sale as ground beef. *Int. J. Food Microbiol.*, **18**: 321-323.
- GILL, C.O. y NEWTON, K.G. (1977). The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol.*, **43**: 189-195
- GILL, C.O. y NEWTON, K.G. (1979). Spoilage of vacuum-packaged dark, firm, dry meat at chill temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**: 362-364.
- GILL, C.O. y NEWTON, K.G. (1980). Growth of bacteria on meat at room temperatures. *J. Appl. Bacteriol.*, **49**: 315-323.
- GILL, C.O. y NEWTON, K.G. (1982). The effect of lactic concentration on the growth on meat of Gram negative psychrotrophs from a meat works. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**: 284-288.
- GILL, C.O. y PENNEY, N. (1977). Penetration of bacteria into meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**: 1284-1286.
- GILL, C.O. y PENNEY, N. (1979). Survival of bacterial in carcasses. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**: 667-669.

- GIROTTI, S., FERRI, E.N., FINI, F., RIGHETTI, S., BOLELLI, L., BUDINI, R., LASI, G., ROUBAL, P., FUKAL, L., HOCHÉL, I. y RAUCH, P. (1997). Determination of microbial contamination in milk by ATP assay. *Czech J. Food Sci.*, **15**: 241-248
- GLASSMOYER, K.E. y RUSSELL, S.M. (2001). Evaluation of a selective broth for detection of *Staphylococcus aureus* using impedance microbiology. *J. Food Prot.*, **64**: 44-50.
- GLENN, A.R. (1976). Production of extracellular proteins by bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **30**: 41-62.
- GODA, F.F., WASSEF, N.A., IBRAHIM, A.A. y ROUSHDY, S. (1986). Studies on microorganisms secured from different organs of slaughtered sheep with special reference to the microbial load in certain muscles. *Beitr Trop Landwirtsch Veterinarmed*, **24**: 85-95.
- GONZÁLEZ, I., GARCÍA, T., ANTOLÍN, A., HERNÁNDEZ, P. E. y MARTÍN, R. (2000). Development of a combined PCR-culture technique for the rapid detection of *Arcobacter* spp. in chicken meat. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**: 207-212.
- GONZÁLEZ, I., GARCÍA, T., FERNÁNDEZ, A., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P. E. y MARTÍN, R. (1999). Rapid enumeration of *Escherichia coli* in oysters by a quantitative PCR-ELISA. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 231-236.
- GONZÁLEZ, I., GRANT, K. A. RICHARDSON, P. T. PARK, S. F. y COLLINS, M. D. (1997). Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 759-763.
- GONZALEZ, I., MARTIN, R., GARCIA, T., MORALES, P., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1994). Técnicas rápidas para la detección de microorganismos en alimentos. (I) Técnicas Físico-Químicas. Alimentación Equipos y Tecnología, **13**: 97-101.
- GOODRIDGE, L., CHEN, J. y GRIFFITHS, M. (1999). The use of a fluorescent bacteriophage assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated ground beef and raw milk. *Int. J. Food Microbiol.*, **47**:43-50.
- GRAHAM, L. y PETTIPHER, G.L. (1989). The direct epifluorescence filter technique. En: *Rapid methods in food microbiology*. (eds.: Adams, M.R. y Hope, C.F.A.). Ed.: Elsevier Science Publishing Company Inc. New York. pp: 19-56.
- GRAM, L. (1993). Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 2197-2203.
- GRAM, L. y SOGAARD, H. (1985). Microcalorimetry as a Rapid Method for Estimation of Bacterial Levels in Ground Meat. *J. Food Prot.*, **48**: 341-345.

- GRAU, F.H. (1980). Inhibition of anaerobic growth of *Brochotrix thermosphacta* by lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**: 433-436.
- GREASER, M.L. y FRITZ, J.D. (1995). Post Mortem Changes in Miofibrillar Proteins in Relation to Meat Quality. (eds.: Ouali, A., Demeyer, D.I. y Smulders, F.). Ed.: ECCEAMSI, Utrech, The Netherlands. pp: 293-339.
- GREEN, T.A., RUSSELL, S.M. y FLETCHER, D.L. (1999). Effect of chemical cleaning agents and commercial sanitizers on ATP bioluminescence measurements. *J. Food Prot.*, **62**: 86-90.
- GREER, G.C. (1989). Red meats, poultry and fish. En: *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. (eds.: R.C. McKellar). Ed.: CRC Press, Boca Raton, Florida. pp: 268-292.
- GUPTA, L.K. y NAGAMOHINI, Y. (1993). Penetration of poultry meat by *Pseudomonas* and *Lactobacillus* spp.. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **8**: 212-213.
- GUTIERREZ, R., GARCIA, T., GONZALEZ, I., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P. y MARTÍN, R. (1997). A quantitative PCR-ELISA for the rapid enumeration of bacteria in refrigerated milk. *J. Appl. Microbiol.*, **83**: 518-523.
- GUTIERREZ, R., GARCIA, T., GONZALEZ, I., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P. y MARTÍN, R. (1998). Quantitative detection of meta spoilage bacteria by using the polymerase chain reaction (PCR) and an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Lett. Appl. Microbiol.*, **28**: 372-378.
- HAN, K.J. y YANG, X.L. (1999). Adherence of bacteria to the surface of meats. *Food Science China*, **20**: 9-11.
- HARDY, D., KRAEGER, S.J., DUFOUR, S.W. y CADY, P. (1977). Determination of Microbial Contamination in Frozen Vegetables Using Automatic Impedance Measurement. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**: 14-17.
- HARMAYANI, E., SOFOS, J.N. y SCHMIDT, G.R. (1991). Growth and Amonipeptidase Activity of *Pseudomonas fragi* in presence of Phosphates. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, **24**: 350-354.
- HARMAYANI, E., SOFOS, J.N. y SCHMIDT, G.R. (1991a). Effect of sodium lactate, calcium lactate and sodium alginate on bacterial growth and aminopeptidase activity. *J. of Food Safety*, **11**: 269-283.
- HARRISON, M.A., MELTON, C.C. y DRAUGHON, F.A. (1981). Bacterial flora of ground beef and soy extended ground beef during storage. *J. Food Sci.*, **46**: 1088-1090.

- HARTMAN, P.A., SWAMINATHAN, B., CURIALE, M.S., FIRSTENBERG-EDEN, R., SHARPE, A.N., COX, N.A., FUNG, D.Y.C. y GOLDSCHMIDT, M.C. (1992). Rapid methods and automatization. En: *Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods*. 3ª Ed. (eds.: Vanderzant, C. y Splittstoesser, D.F.). Ed.: American Public Health Association. Washington, D.C.. pp: 665-746.
- HATCHER, W.S., DIBENEDETTO, S. TAYLOR, L.E. y MURDOCK, D.I. (1977). Radiometric Analysis of Frozen Concentrate Orange Juice for Total Viable Microorganisms. *J. Food Sci.* **42**: 636-639.
- HAYES, P.R. (1977). A taxonomic study of flavobacteria and related Gram negative yellow pigmented rods. *J. Appl. Bacteriol.*, **43**: 345-367.
- HELPS, C.R., HARBOUR, D.A. y CORRY, J.E. (1999). PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *Clostridium estertheticum* causing spoilage in vacuum-packed chill-stored beef. *Int. J. Food Microbiol.* **52**: 57-65.
- HENDRIE, M.S. y SHEWAN, J.M. (1966). The identification of certain *Pseudomonas* species. En: *Identification Methods for Microbiologists, Soc. Appl. Bacteriol, Tech. Ser. N1, Part A*. (eds: Gibbs, B.H. y Skimer, F.A.). Ed.: Academic Press, Inc. New York. p:1.
- HERBERT, R.A. (1981). A comparative study of the physiology of psychrotrophic and psychrophilic bacteria. En: *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*. (eds: Roberts, T.A., Hobbs, G., Christian, J.H.B. y Skovgaard, N.) Ed.: Academic Press, New York. pp: 3-16.
- HERBRAUD, M., DUBOIS, E., POTIER, P. y LABADIE, J. (1994). Effect of growth temperatures on the protein levels in a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas fragi*. *J. of Bacteriology*, **176**: 4017-4024.
- HEREDIA, N., GARCIA, S., ROJAS, G. y SALAZAR, L. (2001). Microbiological condition of ground meat retailed in Monterrey, Mexico. *J. Food Prot.*, **64**: 1249-1251.
- HERMES, H.F.M., SONKE, T., PETERS, P.J.H., BALKEN, J.A.M.-VAN, KAMPHUIS, J., DIJKHUIZEN, L. y MEIJER, E.M. (1993). Purification and characterization of an L-aminopeptidase from *Pseudomonas putida* ATCC 12633. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 4330-4334.
- HERMIDA, M., TABOADA, M., MENÉNDEZ, S. y RODRÍGUEZ-OTERO, J.L. (2000). Semi-automated direct epifluorescent filter technique for total bacterial count in raw milk. *J. AOAC Int.*, **83**: 1345-1348.
- HERRER, M. (1995). La calidad de carnes frescas picadas de bovino, ovino, porcino y similares. *Alimentaria*, sept.: 83-85.

- HITCHNER, B.J., EGAN, A.F. y ROGERS, P.J. (1979). Energetics of *Microbacterium thermosphactum* in glucose limited continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**: 1047-1052.
- HOLLEY, R.A. y MILLARD, G.E. (1988). Use of MRSD medium and the hydrophobic grid membrane filter technique to differentiate between pediococci and lactobacilli in fermented meat and starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.*, **7**: 87-102.
- INGRAM, M. (1972). Meat preservation past, present and future. *Royal Society Health Journal*, **92**: 121-130.
- INGRAM, M. y DAINTY, R.H. (1971). Changes caused by microbes in spoilage of meats. *J. Appl. Bacteriol.*, **34**: 21-39.
- INGRAM, M. y SIMONSEN, B. (1980). Meats and meat products. En: *Microbial Ecology of Foods*, Vol 2. (eds.: Silliker, J.H., Elliott, R.P., Baird-Parker, A.C., Bryan, F.L., Christian, J.H.B., Clark, D.S., Olson, J.C., Jr. y Roberts, T.A.). Ed.: Academic Press, New York. pp: 421-469.
- INGRAHAM, J.L. y STOKES, J.L. (1959). Psychrotrophic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **23**: 97-108.
- ISMAIL, S.A., DEAK, T., EL-RAHMAN, H.A., YASSIEN, M.A. y BEUCHAT, L.R. (2000). Presence and changes in population of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **5**: 113-121.
- JAKOB, R., LIPPERT, S. y BAUMGART, J. (1989). Automated turbidimetry for the rapid differentiation and enumeration of bacteria in food. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **189**: 147-148.
- JAMES, C., NICOLAON, M. y JAMES, S.C. (1999). Review of Microbial Contamination and Control Measures in Abattoirs, Food Refrigeration and Process Engineering Research Centre. Universidad de Bristol.
- JAMES, S.C. y JAMES, C. (2002). Microbiology of refrigerated Meat. En: *Meat Refrigeration*. (eds: James S.C. y James C.). Ed.: CRC Press. Boca Raton, Florida. pp: 3-16.
- JAMES, S.C. y JAMES, C. (2002a). Chilled and frozen retail display; consumer handling. En: *Meat Refrigeration*. (eds: James S.C. y James C.). Ed.: CRC Press. Boca Raton, Florida. pp: 231-255.
- JARVIS, B. (1982). Rapid methods in food microbiology: a practical approach. *Food Technol. Aust.*, **34**: 518-524.
- JARVIS, B. y EASTER, M.C. (1987). Rapid methods in the assessment of microbial quality; experiences and needs. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 115-126.

- JAWAD, G. M., MARROW, T. y ODUMERU, J.A. (1998). Assessment of impedance microbiological method for the detection of *Escherichia coli* in foods. *J. Rapid Meth. Autom. Microbiol.*, **6**: 297-305.
- JAY, J.M. (1981). Rapid estimation of microbial numbers in fresh ground beef by use of the Limulus test. *J. Food Prot.*, **44**: 275-278.
- JAY, J.M. (1996). *Modern Food Microbiology* 5ª ed. Chapman & Hall, New York. pp: 328-346.
- JAY, J.M. (1996a). Microorganisms in fresh ground meats: The relative safety of products with low versus high numbers. *Meat Science*, **43**: s59-s-66.
- JENSCH, T. y FRICKE, B. (1997). Localization of alanyl aminopeptidase and leucyl aminopeptidase in cells of *Pseudomonas aeruginosa* by application of different methods for periplasm release. *J. Basic Microbiol.*, **37**: 115-128.
- JIMENEZ, S.M., SALSI, M.S., TIBURZI, M.C., RAFAGHELLI, R.C., TESSI, M.A. y COUTAZ, V.R. (1997). Spoilage microflora in fresh chicken breast stored at 4 degrees C: influence of packaging methods. *J. Appl. Microbiol.*, **83**: 613-618.
- JOHNSON, J. L., BROOKE, C.L. y FRTSCHEL, S.L. (1998). Comparison of the BAX for screening/E. Coli O157:H7 method with conventional methods for detection of extremely low levels of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4390-4395.
- JONES, K.L., McPHEE, S., TURNER, A. y BETTS, R.P. (1997). The DEFT/APC screening method for the detection of irradiated frozen stored foods: a collaborative trial. *Food Sci. Tech. Today*, **10**: 175-176.
- JORGENSE, H.L. y SCHULZ, E. (1985). Turbidimetric Measurement as a Rapid Method for the Determination of the Bacteriological Quality of Minced Beef. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **2**: 177-183.
- JUNI, E. (1984). Genus III, *Acinetobacter*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1. (eds.: Krieg, N.R. y Holt, J.G.). Ed.: Williams & Wilkins, Baltimore. pp: 303-307.
- JUNI, E. y HEYM, A. (1986). *Psychrobacter immobilis* gen. Nov., sp. Nov.: genospecies composed of gram-negative, aerobic, oxidase-positive coccobacilli. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**: 388-391.
- KANDLER, O. y NORBERT, W. (1986). Genus *Lactobacillus*. En: *Bergey,s Manual of Systematic Bacteriology*. (eds.: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G.). Ed.: Williams & Wilkins, Baltimore, pp:1209-1234.
- KANNER, J., HAREL, S., GRANIT, R. (1994). Oxidative process in meat and meat products: quality implications. *Meat Science*, **36**: 169-189.

- KENNEDY, J.E. JR. y OBLINGER, J.L. (1985). Application of Bioluminescence to Rapid Determination of Microbial Levels in Gound Beef. *J. Food Prot.* **48**: 334-340.
- KERSTERS, K. y DE LEY, J. (1984). Genus *Alcaligenes*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1. (eds.: Krieg, N.R. y Holt, J.G.). Ed.: Williams & Wilkins, Baltimore. pp: 361-365.
- KITZMAN, P. (1997). Prediction of total count of aerobic microorganisms in meat and meat products by automated turbidimetry. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **3**: 125-132.
- KLOOS, W.E. y SCHLEIFER, K.H. (1986). Genus IV. *Staphylococcus*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 2. (eds.: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G.). Ed.: Williams & Wilkins, Baltimore. pp: 1013-1015.
- KOCUR, M. (1986). Genus I. *Micrococcus*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 2. (eds.: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G.). Ed.: Williams & Wilkins, Baltimore. pp: 1004-1005
- KOCUR, M. (1986a). Genus III. *Planococcus*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 2. (eds.: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G.). Ed.: Williams & Wilkins, Baltimore. pp: 1011-1013.
- KOTULA, A.W., BERRY, B.W. y EMSWILER-ROSE, B.S. (1987). Microbiology of restructured meat and poultry products. En: *Advances in Meat Research. Restructured meat and poultry products*. Vol. 3 (eds. Pearson, A.M. y Dutson J.R.). Ed.: AVI Publishing Co. Inc., Westport, Connecticut. pp: 161-220.
- KRAFT, A.A., AYRES, J.C., TORREY, G.S., SALZER, R.H. y DASILVA, G.A.N. (1966). Coryneform bacteria in poultry, eggs and meat. *J. Appl. Bacteriol.*, **29**: 161-166.
- KRAFT, A.A. (1986). Psychrotrophic organism. En: *Advances in Meat Research*, Vol 2. Meat and Poultry Microbiology (eds: Pearson, A.M. y Dutson T.R.) Ed.: AVI Publishing, Westport C.T.. pp: 191-208.
- KRAFT, A.A. (1992). Psychrotrophic spoilage bacteria- Meat spoilage, En: *Psychrotrophic bacteria in Food Research and Spoilage*. (ed.: Kraff A.A.). Ed.: CRC Press, Boca Ratón , Florida. pp: 28-61
- KUSUNOKI, H., BARI, M.L., KITA, T., SUGII, S. y UEMURA, T. (2000). Flow cytometry for the detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with latex beads sensitized with specific antibody. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, **47**: 551-559.
- LALU, K., LAMPELO, S. y VANHA-PERTULA, T. (1986). Characterization of three aminopeptidases purified from maternal serum. *Biochim. Biophys. Acta* **873**: 190-197.

- LAMBERT, A.D., SMITH, J.P., y DODDS, K.L. (1991). Shelf life extension and microbial safety of fresh meat: a review. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **8**: 267-297.
- LAMMERDING, A.M., GARCIA, M.M., MANN, E.D., ROBINSON, Y., DORWARD, W.J., TRUSCOTT, R.B. y TITTIGER, I. (1988). Prevalence of Salmonella and thermophilic Campylobacter in fresh pork, beef and poultry in Canada. *J. Food Prot.*, **51**: 47-52.
- LAPLACE-BUILHE, C., HAHNE, K., HUNGER, W., TIRILLY, Y. y DROCOURT, J.L. (1993). Application of two cytometry to rapid microbial analysis in food and drinks industries. *Biol. Cell.*, **78**: 123-128.
- LAUFFART, B. y MANTLE, D. (1988). Rationalitation of aminopeptidase activities in human skeletal muscle soluble extract. *Biochim. Biophys. Acta*, **873**:190-197.
- LAWRENCE, J.R., DELAQUIS, P.J., KORBER, D.R. y CALDWELL, D.E. (1987). Behavior of *Pseudomonas fluorescens* within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments. *Microb. Ecol.* **14**:1-14.
- LAWRENCE, L.M. y GILMOUR, A. (1992). The use of the chromogenic Limulus amoebocyte lysate assay to distinguish between ultra high temperature and in-container sterilized milks. *J. Society Dairy Technol.*, **45**: 19-23.
- LAZDUNSKI, A. (1989). Peptidases and proteases of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *Microbiol. Rev.*, **5**: 265-276.
- LAZDUNSKI, A., MURGIER, M. y LAZDUNSKI, C. (1975). Evidence of an Aminopeptidase localized Near The Cell Surface of Escherichia coli. *Eur. J. Biochem.*, **60**: 349-355.
- LAZDUNSKI, C., BUSUTTIL, J. y LAZDUNSKI, A. (1975a). Purification and properties of a periplasmic aminopeptidase from E. coli. *European J. Biochem.*, **60**: 363-370.
- LEBERT, I., BEGOT, C. y LEBERT, A. (1998). Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in meat medium as affected by pH (5,8-7,0), water activity (0,97-1,00) and temperature (7-25 degree C). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**: 53-60.
- LEDEME, N., VICENT-FIQUET, O., HENNON, G. y PLAQUET, R. (1983). Human liver L-leucine aminopeptidase: Evidence for two forms compared to pig liver enzyme. *Biochimie.*, **65**: 397-404.
- LENGERKEN, G. VON, MAAK, S. y WICKE, M. (2002). Muscle metabolism and meat quality of pigs and poultry. *Veterinarija Zoot.*, **20**: 82-86.
- LENTINI, A. (1993). A review of the various methods available for monitoring the physiological status of yeast: yeast viability and vitality. *Ferment.*, **6**: 321-326

- LITTEL, K.J., PIKELIS, S. y SPURGASH, A. (1986). Bioluminescent ATP assay for rapid estimation of microbial numbers in fresh meat. *J. Food Prot.*, **49**: 18-22.
- LOWRY, R. (2002). One-Way Análisis of Variance for Independent Samples. Part 1. <http://faculty.vassar.edu/lowry/ch14pt1.html>.
- LU, S.F. y CHANG P.P. (1996). A thermostable neutral protease from *Pseudomonas aeruginosa* CCRC 15541. *Lett. Appl. Microbiol.*, **22**: 5-9.
- LUNDY, F.T., MAGEE, A.C., BLAIR, I.S. y McDOWELL, D.A. (1996). Cross reactivity of antibodies raised to *Pseudomonas fluorescens* protease with extracellular proteins produced by meat-spoiling pseudomonads. *J. Appl. Bacteriol.*, **81**: 1-6.
- MALACRINO, P., ZAPPAROLI, G., TORRIANI, S. y DELLAGLIO, F. (2001). Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *J. Microbiol. Methods*, **45**: 127-134.
- MANAFI, M. y KNEIFEL, W. (1990). Rapid methods for differentiating Gram-positive from Gram-negative aerobic and facultative anaerobic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, **69**: 822-827.
- MANNINEN, M., WIRTANEN, G., AHVENAINEN, R. y MATTILA, T. (1990). Automated turbidometry in assessing the bacterial content of food products inoculated with pathogens. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, **23**: 20-24.
- MANO, S. (1997). Alteración de carne fresca refrigerada. En: *Comportamiento de la microbiota natural y Listeria monocytogenes, Aeromonas hydrophila y Yersinia enterocolitica en carne envasada en atmósferas modificadas*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense, Madrid.
- MANZANO, S., ORDÓÑEZ, J.A., HOZ, L. y FERNÁNDEZ, M. (2003). A rapid method for the estimation of the microbiological quality of refrigerated raw milk based on the aminopeptidase activity of Gram negative bacteria. *Int. Dairy Journal* (en prensa).
- MARSHALL, K.C. (1976). Interfaces in Microbial Ecology. *Harvard University Press*, Boston.
- MARSHALL, K.C. (1988). Adhesion and growth of bacteria and surfaces in oligotrophic habitats. *Canadian Journal of Microbiology*, **34**: 503-506.
- MARSHALL, D.L., ANDREWS, S.L., WELLS, J.H. y FARR, A.J. (1992). Influence of modified atmosphere packaging on the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on precooked chicken. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **9**: 303-309.
- MARTH, E.H. (1989). Purification and partial characterization of an aminopeptidase from *Micrococcus*. *Syst. Appl. Microbiol.*, **12**: 112-118.

- MARTINEZ, A. y RODRIGO, M. (1987). Métodos rápidos en el análisis microbiológico de alimentos. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, **27**: 15-23
- MARTINS, S.B. y SELBY, M.J. (1980). Evaluation of rapid method for the quantitative estimation of coliforms in meat by impedimetric procedures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**:518-524.
- MATTILA, T. (1987). Automated Turbidometry. A method for Enumeration of Bacteria in Food Samples. *J. Food Prot.*, **50**: 640-642.
- MAY, S.A., MIKOLAJCIK, E.M. y TICHTER, E.R. (1989). Conventional tube and microplate *Limulus* amoebocyte lysate procedures for determination of gram-negative bacteria in milk. *J. Dairy Sci.*, **72**: 1137-1141.
- McDONALD, J.K. (1985). An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. *Journal of Histochemistry*, **17**: 773-785.
- McDONALD, K. y BARRET, A.J. (1986). Exopeptidases En: *Mammalian Proteases*. vol. 2. Ed.: Academic Press Inc. London. pp:23-99.
- McKELLAR, R.C. (1989). Proteolytic enzymes. En: *Enzymes of psychrotrophs in Raw Food*. (ed.: McKellar, R.C.). Ed.: CRC Press, Inc. Boca Rattón. Florida. pp: 37-55
- McMEEKIN, T.A. (1982). Microbial spoilage of meats. En: *Developments in Food Microbiology*. Vol. 1 (ed. Davies, R.). Applied Sci. Publishers, Londres. pp:1-40.
- METAXOPOULOS, J., MATARAGAS, M. y DROSINOS, E.H. (2002). Microbial interaction in cooked cured meat products under vacuum or modified atmosphere at 4 degrees C. *J. Appl. Mirobiol.*, **93**: 363-373.
- MILLER, A. III, SCALAN, R.A., LEE, J.S. LIBBEY, L.M. y MORGAN, M.E. (1973). Volatile compounds produced in steril fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas perolens*. *J. Appl. Mirobiol.*, **25**: 257-261.
- MILLER, M.F., GEORGE, S.M., AZAIN, M.J. y REAGAN, J.O. (1991). Calcium and time post-mortem effects on functional and textural characteristics of porcine semimembranosus muscle. *J. Food Sci.* **56**: 632-635.
- MILLET, V. y LONVAUD-FUNEL, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.*, **30**: 136-141.
- MINVIELLE, B. (2000). Control of cleaning and disinfection: ATP-metry as a microbiological monitoring aid. *Viandes Produits Carnes*; **21**: 11-18.

- MISAWA, N., KUMAMOTO, K. NYUTA, S. y TUNEYOSHI, M. (1995). Application of the *Limulus* amoebocyte lysate test as an indicator of microbial contamination in pork carcasses. *J. Vet. Med. Sci.*, **57**: 351-353.
- MIYAKAWA, H., HASHIMOTO, I., NAKAMURA, T., ISHIBASHI, N., SHIMAMURA, S. y IGOSHI, K. (1995). Purification and characterization of a prolyl aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* LHE-511. *Milchwissenschaft*, **49**: 615-619.
- MIYAKAWA, H., KOBAYASHI, S., SHIMAMURA, S. y TOMITA, M. (1992). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* LHE-511. *J. Dairy Sci.*, **75**: 27-35.
- MIYAMOTO, T., OHYAMA, K. y YOSHIMOTO, M. (1988). Mechanism of the combined effects of *Bacillus subtilis* FHC 402 – derived antibacterial factor and hexametaphosphate on *Escherichia coli*. *Agriculture and Biological Chemistry*, **52**: 655-660.
- MOLIN, G. y TERNSTRÖM, A. (1982). Numerical taxonomy of psychrotrophic pseudomonads. *J. General Microbiology*, **128**: 1249-1264.
- MOLIN, G. y TERNSTRÖM, A. (1986). Phenotypically based taxonomy of psychrotrophic *Pseudomonas* isolated from spoiled meat, water and soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**: 257-274.
- MOLIN, G., TERNSTRÖM, A. y URSING, J. (1986). *Pseudomonas ludensis*, a new bacterial species isolated from meat. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**: 339-342.
- MOORE, G., GRIFFITH, C. y FIELDING, L. (2001). A comparison of traditional and recently developed methods for monitoring surface hygiene within the food industry: a laboratory study. *Dairy Food Environ. Sanit.*, **21**: 478-488
- MORENO, B. (1997). Contamination of lamb carcasses at the abattoir. Microflora of freshly dressed lamb carcasses: indicators and spoilage organisms. *Archiv fuer Lebensmittelhygiene*, **46**:135-137.
- MORENO, A., RUEDA, V. y CEULAR, A.L. (1999). Análisis cuantitativo del pH de canales de vacuno en matadero. *Arch. Zootec.*, **48**: 33-42.
- MORISHITA, Y. y SHIROMIZU, K. (1986). Characterization of lactobacilli isolated from meats and meats products. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **3**: 19-29.
- MORITA, R.Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriology Rev.* **39**: 144-167.
- MORRIS, E.R., BODWELL, C.E., MILES, C.W., MERTZ, W., PRATHER, E.S. y CANARY, J.J. (1987). Long-term consumption of beef extended with soy protein by children, women and men: III. Iron absorption by adult men. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **37**: 377-389.

- MOSSEL, D.A.A. y INGRAM, M. (1955). The physiology of the microbial spoilage of foods. *J. Appl. Bacteriol.*, **18**: 232-268.
- MOSSEL, D.A.A. y VAN NETTEN (1990). *Staphylococcus aureus* and related *staphylococci* in foods: ecology, proliferation, toxinogenesis, control and monitoring. En: *Staphylococci*. (eds.: Jones, D., Board, R.G. y Sussman, M.). Ed.: Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp: 123S-125S.
- MOSUPYE, F.M. y VON HOLY, A. (2000). Microbiological hazard identification and exposure assessment of street food vending in Johannesburg, South Africa. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **61**: 137-145.
- MOTTAR, J., BLOCK, J., MERCHERS, M., VANTOMME, K. y MOERMANS, R. (1993). Routine *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) test for endotoxin determination in milk using a Toxinometer ET-201. *J. Dairy Resch.*, **60**: 223-228.
- MURGIER, M. PELISSIER, C. y LAZDUNSKI, A. (1976). Existence, Localization and Regulation of the Biosynthesis of Aminopeptidase in Gram-Negative Bacteria. *European Journal of Biochem.*, **65**:517-520
- MYHARA, R.M. y SKURA, B.J. (1989). Growth conditions affecting proteolytic enzyme and extracellular vesicle production by *Pseudomonas fragi* ATCC 4973. *J. Food Sci.*, **54**: 686-690; 694.
- MYHARA, R.M. y SKURA, B.J. (1990). Centroid search optimization of cultural conditions affecting the production of extracellular proteinase by *Pseudomonas fragi* ATCC 4973. *J. Appl. Bacteriol.*, **69**: 530-538.
- MYHARA, R.M., SKURA, B.J. PATEL, T. y NAKAJIMA, M. (1990). Functional characteristics of extracellular vesicles produced by *Pseudomonas fragi* ATCC 4973. *J. Food Prot.*, **53**: 859-863.
- NEWTON, K.G., HARRISON, J.C. y SMITH, K. M. (1977). The effect of storage in various gaseous atmospheres on the microflora of lamb chops held at 1°C. *J. Appl. Bacteriol.*, **43**:53-60.
- NEWTON, K.G., HARRISON, J.C. y WAUTERS, A.M. (1978). Sources of psychrotrophic bacteria on meat at the abattoir. *J. Appl. Bacteriol.*, **45**: 75-82.
- NICOL, D.J., SHAW, M.K. y LEDWARD, D.A. (1970). Hydrogen sulfide production by bacteria and sulfmyoglobin formation in prepacked chilled beef. *J. Appl. Microbiol.*, **19**: 937-939.
- NISHIMURA, T., KATO, Y., OKITANI, A y KATO, H. (1991a). Purification and properties of aminopeptidase C from chicken skeletal muscle. *Agric. Biological Chem.*, **55**: 1771-1778.

- NISHIMURA, T., OKITANI, A. y KATO, H. (1988). Identification of neutral aminopeptidases responsible for peptidolysis in post mortem rabbit skeletal muscle. *Agric. Biological Chem.*, **52**:2183-2190.
- NISHIMURA, T., RHYU, M.R. y KATO, H. (1991). Purification and properties of aminopeptidase H from porcine skeletal muscle. *Agric. Biological Chem.*, **55**: 1779-1786.
- NISHIMURA, T., OKITANI, A., RHYU, M.R. y KATO, H. (1990). Survey of neutral aminopeptidases in bovine, porcine and chicken skeletal muscles. *Agric. Biological Chem.*, **54**: 2769-2775.
- NISHIMURA, T., RHUE, A., OKITANI, A. y KATO, H. (1988a). Components contributing to the improvement of meat taste during storage. *Agric. Biological Chem.*, **52**: 2323-2330.
- NISHIMURA, T., RHYU, M.R., KATO, H. y ARAI, S. (1994). Purification and properties of aminopeptidase H from bovine skeletal muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**: 2709-2712.
- NIZA, J., LOUZA, A.C., SANTOS, P. y LIMA, M. (2000). Monitoring the microbiological quality of raw milk through the use of an ATP. *Food-Control*, **11**: 209- 216.
- NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (1992). *Enzyme Nomenclature*. Ed.: Academic Press. San Diego, California. Suplemento 1 (1993), suplemento 2 (1994), suplemento 3 (1995), suplemento 4 (1997) y suplemento 5 (1999) (en: *European Journal of Biochemistry* 1994, **223**: 1-5; 1995, **232**: 1-6; 1996, **237**: 1-5; 1997, **250**: 1-6 y 1999, **264**: 610-650; respectivamente)
- NONGPORN HUTADILOK TOWATANA, ANONGNAT PAINUPONG y PRASERT SUNTINANLERT (1999). Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS719. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **87**: 581-587.
- NORTJE, G.L., NEL, L., JORDAAN, E., BADENHORST, K., GOEDHART, E. y HOLZAPFEL, W.H. (1990). The aerobic psychrotrophic populations on meat and meat contact surfaces in a meat production system and on meat stored at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol.*, **68**: 335-344.
- NOTERMANS, S. y KAMPELMACHER, E.H. (1974). Attachment of some bacterial strains to the skin of broiler chickens. *Br. Poult. Sci.*, **15**:573-585.
- NOTTINGHAM, P.M., PENNEY, N. y HARRISON, J.C. (1974). Microbiology of beef processing 1. Beef dressing hygiene. *J. Agric. Res.*, **17**: 79-83.

- O'CONNOR, F. (1979). An impedance method for the determination of bacterial quality of raw milk. *Irish J. Food Sci. Technol.*, **3**: 93-100.
- ODAGAMI, T., MORITA, J., TAKAMA, K. y SUZUKI, S. (1994). Substrate specificities of extracellular proteases produced by marine putrefactive bacteria, *Shewanella putrefaciens* and *Alteromonas haloplanktis*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **18**: 50-52.
- OLIVER, D.B. (1997). Periplasm and protein secretion. En: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Celular and molecular biology* (2ª ed.). (ed.: Neidhart, F.C.). Ed.: American Society for Microbiology. Washington. pp: 29-47.
- OLSON, J.C. y MOCQUOT, M. (1980). Milk and milk products. En: *Microbial Ecology of Foods*. (eds.: Silliker, J.H., Elliot, R.P., Baird Parker, A.C., Bryan, F.L., Christian, J.H., Clark, D.S., Olson, J.C. y Roberts, T.A.). Ed.: Academic Press, New York. pp: 470-520.
- OLSSON, C., AHRNÉ, S., PETTERSON, B. y MOLIN, G. (2003). The bacterial flora af fresh and chill-stored pork: analysis by cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **83**: 245-252
- ORDEN de 14 de enero de 1986 por la que se aprueba la norma de calidad para carnes picadas de vacuno, ovino y porcino destinadas al mercado interior. B.O.E. nº 18 de 21 de enero y corrección de errores en BOE nº 29 de 3 de febrero.
- ORDÓÑEZ, J.A. y GARCIA DE FERNANDO, G.D. (1996). P-nitroaniline test: rapid method for assessing the microbial quality of refrigerated meat. En: Concerted Action CT94-1456: Factors affecting the microbial quality of meat. 4. Microbial Methods for the meat industry (eds.: Hinton, M.H. y Rowlings, C.). Ed.: University of Bristol Press. Bristol. pp: 153-160.
- OTTE, I. y TOLLE, A. (1980). On the aminopeptidase and Gram-reaction of bacteria. *Milchwissenschaft*, **35**: 215-217.
- OZBAS, Z.Y., VURAL, H. y AYTAC, S.A. (1996). Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on the growth of spoilage and inoculated pathogenic bacteria on fresh poultry. *Z. Lebensm. Unters. Forch.*, **203**: 326-332.
- OZDEMIR, H. y SIRELI, U.T. (2001). The existence of *Brochotrix thermosphacta* in meat and meat products. *Gida*, **26**:115-120.
- PALLERONI, N.J. (1989). Pseudomonas. En: *Practical Handbook of Microbiology* (ed: O'Learly, W.M.). Ed.:CRC Press, Boca Ratón, Florida. p:55.
- PARKER, L.L. y LEVIN, R.E. (1983). Relative incidence of *Alteromonas putrefaciens* and *Pseudomonas putrefaciens* inh ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**: 796-799.

- PARRY, R.T. (1993). Modified atmosphere packaging of red meats. En.: *Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Food*. (ed.: Parry, R.T). Ed.: Blackie Academic & Professional, Glasgow. p: 271
- PAYNE, M.J. y KROLL, R.G. (1991). Methods for The Separation and Concentration of Bacteria From Foods: a Review. *Trends Food Sci. Technol.* **12**: 315-319.
- PENNY, I.F. (1980). The enzymology of meat conditioning. En: *Developments in Meat Science I*, (ed.: Barret, A.J). Ed.: North Holland, Amsterdam, The Netherlands, pp: 515-545.
- PÉREZ DE CASTRO, B. (1989). Desarrollo de una prueba rápida y sencilla para estimar el grado de frescura de la carne y leche. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. Madrid.
- PÉREZ DE CASTRO, B.P., ASENSIO, M.A., SANZ, B. y ORDÓÑEZ, J.A. (1988). A method to assess the bacterial content of refrigerated meet. *Appl. Env. Microb.*, **54**: 1462-1465.
- PÉRTEGA, S. y PITA, S. (2001). Métodos paramétricos para la comparación de dos medias. Aceptado para publicación: *Cadena de Atención Primaria*. http://www.fisterra.com/material/investiga/t_student/t_student.htm.
- PETER, H.A., SNEATH, A. y JONES, D. (1986). Brochotrix. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2 (eds: Peter, H.A., Sneath, A. y Jones, D.). Ed.: Williams & Wilkins, Baltimore. pp: 1249-1253.
- PETTIPHER, G.L., (1986). Review: The Direct Epifluorescent Filter Technique. *J. Food Technol.*, **21**: 535-546.
- PETTIPHER, G.L., MANSELL, R., McKINNON, C.H. y COUSINS, M.C. (1980). Rapid Membrane Filtration Epifluorescent Microscopy Technique for Direct Enumeration of Bacteria in Raw Milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**: 423-429.
- PETTIPHER, G.L., y RODRÍGUEZ, U.M. (1982). Rapid Enumeration of Microorganisms on Food by The Direct Epifluorescent Filter. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 809-813.
- PINE, M. (1972). Turnover of intracellular proteins. *Ann. Rev. Microbiol.* **26**: 103-126.
- PIZZIN, G., BENTLEY, S. y MAGGI, E. (2000). Microbiological evaluation of ground beef and pork. *Annali della Facolta di Medicina Veterinaria, Parma.* **18**: 205-216.
- PIVNICK, H., ERDMAN, I.E., COLLINS-THOMPSON, D., ROBERTS, G., JOHNSTON, M.A., CONLEY, D.R., LaCHAPELLE, G., PURVIS, U.T., FOSTER, R. y MILLINGN, M. (1976). Proposed microbiological standarts for ground beef based on a Canadian survey. *J. Milk Food Technol.*, **39**: 408-412.

- PLESS, P., FUTSCHIK, K. y SCHOPF, E. (1994). Rapid detection of Salmonella by means of a new Impedance-Splitting method. *J. Food Prot.*, **57**: 369-376.
- POST, F.J., KRISHNAMURTY, G.B. y FLANAGAN, M.D. (1963). Influence of sodium hexametaphosphate on selected bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, **11**: 430-435.
- PREVITE, J.J. (1972). Radiometric Detection of Some Food-borne Bacteria. *Appl. Microbiol.* **24**: 535-539.
- PRIETO, M., GARCIA-ARMESTO, M., GARCIA-LOPEZ, M.L., OTERO, A. y MORENO, B. (1992). Numerical Taxonomy of Gram-Negative, Nonmotile, Nonfermentative Bacteria Isolated during Chilled Storage of Lamb Carcasses. *Appl. Environ. Microbiol.*, **7**: 2245-2249.
- PRIETO, M., GARCIA-ARMESTO, M.R., GONZALEZ, C., OTERO, A. y GARCIA-LOPEZ, M.L. (1995). Numerical characterization study of Micrococcaceae associated with lamb spoilage. *J. Appl. Bacteriol.*, **78**: 251-263.
- QVIST, S.H. y JACKSON, M. (1985). Applications of the direct epifluorescent filter technique as a rapid method in microbiological quality assurance in the meat industry. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **2**: 139-144.
- RAKSAKULTHAI, R. y HAARD, N.F. (2003). Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: a review. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* **43**: 401-445.
- RAPPOSCH, S., ZANGERL, P. y GINZINGER, W. (2000). Influence of fluorescence of bacteria stained with acridine orange on the enumeration of microorganisms in raw milk. *J. Dairy Sci.*, **83**: 2753-2758.
- RATTANASOMBOON, N., BELLARA, S.R., HARDING, C.L., FRYER, P.J., THOMAS, C.R., AL-RUBEAI, M. y McFARLANE, C.M. (1999). Growth and enumeration of the meat spoilage bacterium *Brochetrix thermosphacta*. *Int. J. Food Microbiol.*, **15**: 145-158.
- REAL DECRETO 147/1993 de 29 de enero por el que se establecen las condiciones sanitarias de producción y comercialización de carnes frescas. B.O.E. nº 61 de 12 de marzo de 1993
- REAL DECRETO 1916/1997 de 19 de diciembre de Presidencia del Gobierno por el que se establecen las condiciones sanitarias aplicables a la producción y comercialización de carne picada y preparados de carne. B.O.E. nº 11 de 13 de enero de 1998.
- REAL DECRETO 2483/1986 de 14 de noviembre por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria sobre condiciones generales de transporte terrestre de alimentos y productos alimentarios a temperatura regulada. B.O.E nº 291 de 5 de diciembre de 1986.

- REASONER, D.J. y GELDREICH, E.E. (1989). Detection of fecal coliforms in water by using (14C) mannitol. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 907-911.
- REGLAMENTO (CEE) N° 1538/91 de la Comisión, de 5 de junio de 1991, que establece las disposiciones de aplicación del Reglamento (CEE) n° 1906/90 por el que se establecen normas de comercialización aplicables a las aves de corral. DO L143 de 7/06/1991 pp 11-22. Rectificado en DO n° L233 de 22/08/1991 y corregido en DO L036 de 07/02 /2001.
- REITH, A.F. (1926). Bacteria in the muscular tissues and blood of apparently normal animals. *Journal of Bacteriology*, **12**: 367-383.
- RESTAINO, L., FRAMPTON, E.W., IRBE, R.M. y ALLISON, D.R.K. (1997). A 5 h screening and 24 h confirmation procedure for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in beef using direct epifluorescent microscopy and immunomagnetic separation. *Letts. Appl. Microbiol.* **24**: 401-404.
- REUTER, G. (1981). Psychrotrophic lactobacilli in meat products. En: *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*. (eds.: Roberts, T.A., Hobbs, G., Christian, J.H.B. y Skovgaarg, N.). Ed.: Academic Press, Nueva York. pp: 253-258.
- RICO, E., TOLDRA, F., y FLORES, J. (1991). Aminopeptidase interference in the assay of muscle cathepsin H. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **54**: 651-653.
- RODRIGUES, U.M. y KROLL, R.G. (1985). Increased selectivity, sensitivity and rapidity in the Direct Epifluorescent Filter Technique (DEFT). *J. Appl. Bacteriol.*, **59**: 493-499.
- RODRIGUES, U.M., VENTOURA, G., MACKAY B.M. y PAYNE, M.J. (1996). Rapid physicochemical detachment, separation and concentration of bacteria from beef surfaces. *J. Appl. Bacteriol.* **80**: 673-681.
- RODRIGUEZ-SAONA, L.E., KHAMBATY, F.M., FRY, F.S. y CALVEY, E.M. (2001). Rapid detection and identification of bacterial strains by Fourier transform near-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 574-579.
- ROSSAU, R., VAN LANDSCHOOT, A., GILLIS, M. y DE LEY, J. (1991). Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov. a new bacterial family to accomodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **41**: 310-319.
- RUSSELL, S.M. (1997). A rapid method for enumeration of *Pseudomonas fluorescens* from broiler chicken carcasses. *J. Food Prot.*, **60**: 385-390.
- RUSSELL, S.M., FLETCHER, D.L. y COX, N.A. (1992). A rapid method for the determination of temperature abuse of fresh broilers chicken. *Poult. Sci.* **71**: 1391-1395.

- RUSSELL, S.M., FLETCHER, D.L. y COX, N.A. (1995). Spoilage bacteria of fresh broilers chicken carcasses. *Poult. Sci.*, **74**: 2041-2047.
- RYAN, R.A.(1996). Bioluminescence testing of aseptically packaged fruit juice. *Milk Industry Int.*, **98**:13-15
- SAKALA, R.M., HAYASHIDANI, H., KATO, Y., HIRATA, T., MAKINO, Y., FUKUSHIMA, A., YAMADA, T., KANEUCHI, C. y OGAWA, M. (2002). Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. *Int. J. Food Microbiol.*, **74**: 87-99.
- SAMELIS, J., KAKOURI, A. y REMENTZIS, J. (2000). The spoilage microflora of cured, cooked turkey breast prepared commercially with or without smoking. *Int. J. Food Microbiol.*, **56**: 133-143.
- SAMKUTTY, P.J., GOUGH, R.H., ADKINSON, R.W. y MCGREW, P.(2001). Rapid assessment of the bacteriological quality of raw milk using ATP bioluminescence. *J. Food Prot.*, **64**:208-212.
- SAN LANG WANG y SAV HWA CHIO (1998). Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**: 629-633.
- SANTOS, O., SCHWACH, T.S. y ZOTTOLA, E.A. (1995). Competitive growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in ground beef at 9,5 degree C. *J. Food Prot.*, **58**: Suppl. 19.
- SEYMOUR, I.J., COLE, M.B. y COOTE, P.J. (1994). A substrate-mediated assay of bacterial proton efflux/influx to predict the degree of spoilage of beef mince stored at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol.*, **76**: 608-615.
- SCHLEIFER, K.H. (1986). Family I. Micrococcaceae. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 2. (eds.: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G.. Ed.: Williams & Wilkins, Baltimore. pp: 1003-1035.
- SCHOEPE, H., POTSCHKA, H., SCHLAPP, T. FIEDER, J., SCHAU, H. y BALJER, G. (1998). Controlled multiplex PCR of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in food samples. *Mol. Cell Probes*, **12**: 359-365.
- SCHULENBURG, J. y BERGANN, T. (2000). The use of impedance measurement for total count determination problems and their reasons. *Fleischwirtschaft*, **80**: 146-150.
- SCHULZ, E., JENSEN, B. y CELERYNOVA, E. (1988). Automated turbidimetry for rapid determination of the bacteriological quality of raw meta and processed meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **6**: 219-227.
- SCHWAB, K.J., NEILL, F.H., LE GUYADER, F., ESTES, M.K. y ATMAR, R.L. (2001). Development of a reverse transcription-PCR-DNA enzyme immunoassay for

- detection of "Norwalk-like" viruses and hepatitis A virus in stool and shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 742-749.
- SCOTTER, S.L., BEARDWOOD, K. y WOOD, R. (1994). Limulus amoebocyte lysate test/gram negative bacteria count method for the detection of irradiated poultry: results of two inter-laboratory studies. *Food Sci. Technol. Today*, **8**: 106-107.
- SHARPE, A.N., DIOTE, M.P., DUDAS, I., MALCOLM, S. y PETERKIN, P. (1983). Colony counting on hydrophobic grid-membrane filters. *Can. J. Microbiol.* **29**: 797-802.
- SHAW, B.G. (1972). The effect of temperature and relative humidity on the microbiological quality of carcass meat. *Meat Research Institute Symp.* N° 2: 7.1-7.10.
- SHAW, B.G. y LATTY, J.B. (1982). A numerical taxonomy study of Pseudomonas strains from spoiled meat. *J. Appl. Bacteriol.*, **52**: 219-228.
- SHAW, B.G. y LATTY, J.B. (1984). A study of the relative incidence of different Pseudomonas groups on meat using a computer-assisted identification technique employing only carbon source test. *J. Appl. Bacteriol.*, **57**: 59-67.
- SHAW, B.G. y LATTY, J.B. (1988). A numerical taxonomic study of non-motil non-fermentative bacteria from foods. *J. Appl. Bacteriol.*. **65**: 7-21.
- SHEWAN, J.M., HOBBS, G. y HODQKISS, W. (1960). A determinative scheme for the identification of certain genera of Gram-negative bacteria, with special reference to the Pseudomonadaceae. *J. Appl. Bacteriol.*, **23**: 379-391.
- SIERRA, M., GARCIA-LOPEZ, M.L., GONZALEZ, E., GARCIA, M.C. y OTERO, A. (1995). Species of psychrotrophic bacteria on freshly dressed lamb carcasses. *Archiv fuer Lebensmittelhygiene*, **20**: 22-23.
- SIMMONDS, S. y FRUTON, J.S. (1949). The utilization of aminoacids and peptides by mutant strains of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **180**: 635-646.
- SINGH, A., PYLE, B.H. y McFETERS, G.A. (1989). Rapid enumeration of viable bacteria by image analysis. *J. Microbiol. Meth.*, **10**: 91-101.
- SIRAGUSA, G.R., KANG, D.H. y CUTTER, C.N. (2000). Monitoring the microbial contamination of beef carcass tissue with a rapid chromogenic Limulus amoebocyte lysate endpoint assay. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**: 178-183.
- SKOVGAARD, N. (1985). *Brochotrix thermosphacta*: comments on its taxonomy, ecology, and isolation. *Int. J. Food Microbiol.*, **2**: 71-79.
- SØGAARD, H. y LUND, R. (1981). A comparison of three methods for the enumeration of psychrotrophic bacteria in raw milk. En: Psychrotrophic microorganisms in

- spoilage and pathogenicity. (eds: Roberts, T.A., Hobbs, G., Christian, J.H.B. y Skovgaard, N.) Ed.: Academic Press, Londres, pp:109-116.
- SPEIRS, J.P., ANDERTON, A. y ANDERSON, J.G. (1995). A study of the microbial content of the domestic kitchen. *Int. J. Environ. Health Res.*, **5**: 109-122.
- SPLITTSTOESSER, D.F. (1976). Gram negative, non spore forming rods. En: *Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects* (eds: Defigueiredo, M.P. y Splittstoesser, D.F.) Ed.: AVI Publishing, Westport, C.T., pp: 312-334.
- STAINER, R.Y., PALLERONI, N. y DOUDEROFF, M. (1966). The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. General Microbiol.*, **43**: 159- 271.
- STAMER, J.R. (1976). Lactic acid bacteria. En: *Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects*. (eds.: Defigueiredo, M.P. y Splittstoesser, D.F.). Ed.: AVI Publishing, Westport, CT. pp: 404-426.
- STEIHAUSEROVA, I. (2000). Specific microflora of packed meat. *Czech J. Food Sci.*, **18**: 159-163.
- STEPANIAK, L. (2000). Comparison of Different Peptidase Substrates for Evaluation of Microbial Quality of Aerobically Stored Meats. *J. Food Prot.*, Vol 63, **10**:1447-1449.
- STEWART, B.J., EYLES, M.J. y MURRELL, W.G. (1980). Radiometric Method for Detection of Salmonella in Foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**: 223-230.
- STEWART, G.S., ALDSWORTH, T.G., SHARMAN, R.L., GIBSON, P.T. y DODD, C.E.R. (1997). Bioluminescence: *lux* as an Enabling Tool for the Microbiological Analysis of Food. En: *Food Microbiological Analysis New Technologies*. (eds.: Tortorello, M.L. y Gendel, S.M.). Ed.: Marcel Dekker, Inc.. New York. pp: 265-288.
- STOLLE, A., EISGRUBER, H. y SCHNEIDER, J. (1994). The Limulus test: a rapid procedure for evaluating the hygienic quality of meat products. *Fleischerei*, **45**: 15, 18-20.
- STRAUSS, W.M., MALANEY, G.W. y TANNER, R.D. (1984). The impedance method for monitoring total coliforms in wastewaters. *Folia Microbiol. Meth.*, **26**: 125-132.
- STRINGER, W.C., BILSKIE, M.E. y NAUMAN, H.D. (1969). Microbial profiles of fresh beef. *Food Technology*, **23**: 97-102.
- SUHREN, G. (1989). Producer microorganisms. En: *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food*. (ed. McKellar, R.C.). Ed.: CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp: 4-8.
- SUTHERLAND, J.P., GIBBS, P.A., PATTERSON, J.T. y MURRAY, J.G. (1976). Biochemical changes in vacuum-packaged beef occurring during storage at 0° -2° C. *Journal of Food Technology*, **11**: 171-180.

- SUTHERLAND, J.P., PATTERSON, J.T. y MURRAY, J.G. (1975). Changes in the microbiology of vacuum-packaged beef. *J. Appl. Bacteriol.*, **39**: 227-237.
- SVENSSON, A. y HANN-HÄGERDAL, B. (1987). Comparison of a Gelation and a Chromogenic Limulus (LAL) Assay for The Detection of Gram-negative Bacteria, and The Application of The Latter Assay to Milk. *J. Dairy Sci.*, **54**: 267-273.
- SZAZADOS, I. (1991). Results of meat inspection of the laboratory of the Pecs slaughterhouse over the period 1974-1989. *Magyar Allatorvosok Lapja*, **46**: 261-269.
- TAKAHASHI, T., NAKAKITA, Y., WATARI, J. y SHINOTSUKA, K. (2000). Application of a bioluminescence method for the beer industry: sensitivity of MicroStar-T-M-RMDS for detecting beer-spoilage bacteria. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**:1032-1037.
- TARRANT, P.V. y SHERINGTON, J. (1980). An investigation of ultimate pH in the muscle of commercial beef carcasses. *Meat Sci.*, **4**: 287-297.
- TAYLOR, A., VOLZ, K.W., LIPSCOMB W.N., TAKEMOTO, L.J. (1984). Leucine aminopeptidase from bovine lens and hog kidney. Comparison using immunological techniques, electron microscopy and X-ray diffraction. *J. Biological Chem.*, **10**: 14757-14761.
- TENPENNY, J.R., TANNER, R.D. y MALANEY, G.W. (1984). The impedance method for monitoring total coliforms in wastewaters. *Folia Microbiol.* **29**: 170-180.
- TEUBER, M. y CERNY, G. (1973). Detection of a single, metal-independent aminopeptidase activity in polymyxin-extracts from *Escherichia coli*. *B. Arch. Mikrobiol.*, **91**, 235-240.
- THOLEN, R., STEPHAN, R. y UNTERMANN, F. (1997). The Application of the ATP bioluminescence to the meat industry. En: *Factors affecting the microbial quality of meat. 4. Microbial Methods for the Meat Industry. Concerted Action CT94-1456*. (eds.: Hinton, M.H. y Rowlings, C.). Ed.: University of Bristol Press. Bristol. pp: 75-82.
- THORNLEY, M.J. (1967). A taxonomic study of *Acinetobacter* and related genera. *J. General Microbiol.*, **49**: 211-257.
- TODD, E.C., SZABO, R.A., MCKENZIE, J.M., MARTIN, A., RAHN, K., GYLES, C. GAO, A. ALVES, D. y YEE, A.J. (1999). Application of a DNA hybridization-hydrophobic-grid membrane filter method for detection and isolation of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4775-4780.
- TOLDRA, F., ARISTOY, M.C., y FLORES, M. (2000). Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Research Int.*, **33**:181-185.

- TOLDRA, F., ARISTOY, M.C., PART, C., CERVERO, M.C., RICO, E., MOTILVA, M.J. y FLORES, J. (1992). Muscle and adipose tissue aminopeptidase activities in raw and dry-cured ham. *J. Food Sci.*, **57**: 816-821.
- TOLDRA, F. y FLORES, M. (2000). The use of muscle enzymes as predictor of pork meat quality. *Food Chemistry*, **69**: 387-395.
- TOLDRA, F., RICO, E. y FLORES, J. (1992a). Activities of pork muscle proteases in model cured meat systems. *Biochimie.*, **74**: 291-296.
- TORTORELLO, M.L. y GENDEL, S.M. (1993). Fluorescent antibodies applied to direct epifluorescent filter techniques for microscopic enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 in milk and juice. *J. Food Prot.* **56**: 672-677.
- TORTORELLO, M.L. y REINEKE, K.F. (2000). Direct enumeration of *Escherichia coli* and enteric bacteria in water, beverages and sprouts by 16S rRNA in situ hybridization. *Food Microbiol. London*, **17**: 305-313.
- TORTORELLO, M.L., REINEKE, K.F. y STEWART, D.S. (1997). Comparison of antibody-direct epifluorescent filter technique with the most probable number procedure for rapid enumeration of *Listeria* in fresh vegetables. *J. AOAC Int.*, **80**: 1208-1214.
- TORTORELLO, M.L., REINEKE, K.F., STEWART, D.S. y RAYBOURNE, R.B. (1998). Comparison of methods for determining the presence of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *J. Food Prot.*, **61**: 1425-1430.
- TSAKALIDOU, E., ANSTASIOU, R., PAPANIMITRIOU, K., MANOLOPOULOU, E. y KALANTZOPOULOS, G. (1998). Purification and characterization of an intracellular X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* ACA-DC4. *Journal of Biotechnology*, **59**: 203-211.
- TSAKALIDOU, E., DALEZIOS, I., GEORGALAKI, M. y KALANTZOPOULOS, G. (1993). A Comparative Study: Aminopeptidase Activities from *Lactobacillus delbruekii* ssp. *Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.*, **76**: 2145-2151.
- UCHE, U.E. y AGBO, J.A. (1985). Bacterial isolates from Nsukka meat market: a zoonotic appraisal. *Int. Journal of Zoonoses*, **12**: 105-1100.
- UKUKU, D.O., PILIZOTA, V. y SAPERS, G.M. (2001). Bioluminescence ATP assay for estimating total plate counts of surface microflora of whole cantaloupe and determining efficacy of washing treatments. *J. Food Prot.*, **64**: 813-819
- UYTTENDAELE, M. VAN BOXSTAEL, S. y DEBEVERE, J. (1999). PCR assay for detection of the *E. coli* O157:H7 *eae*-gene and effect of the sample preparation

- method on PCR detection of heat-killed *E. coli* O157:H7 in ground beef. *Int. J. Food Microbiol.* **52**: 85-89.
- VAN ALEN-BOERRIGTER, I.J., BAANKREIS, R. y DE VOS, W.M. (1991). Characterization and over expresión of the *Lactococcus lactis* pepN gene and localization of its product, aminopeptidase N. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 2555-2561.
- VANDERZANT, C., HANNA, M.O., EHLERS, J.G., SAVELL, J.W., SMITH, G.C., GRIFFIN, D.B., TERREL, R.N., LIND, K.D. y GALLOWAY, D.E. (1982). Centralized packaging of beef loin steaks with different oxygen-barrier films: Microbiological chareacteristics. *J. Food Sci.* **47**: 1070-1079.
- VARNAM, A.H. y EVANS, M.G. (1991). *Foodborne Pathogens. An Illustrated Text*. London: Wolfe Pub. Ltd.
- VARNAM, A.H. y SUTHERLAND, J.P. (1995). *Meat and Meat Products*, London, Chapman & Hall.
- VENKITANARAYANAN, K.S., FAUSTMAN, C., CRIVELLO, J., KHAN, M.I. y BERRY, B.W. (1996). Quantitation of total bacterial loadmin meta by a rapid quantitative PCR (QPCR). *1966 IFT annual meeting: book of abstracts*, p: 61.
- VENUGOPAL, V., PANSARE, A.C. y LEWIS, N.F. (1984). Inhibitory effect of food preservatives on protease secretion by *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Sci.*, **49**: 1078-1081.
- VENUGOPAL, V. (1990). Extracellular proteases of contaminant bacteria in fish spoilage: A review. *J. Food Prot.*, **53**: 341-350.
- VIEDMA, J.A. (1976). *Bioestadística (métodos estadísticos en medicina y biología)* (1976). (ed.: Viedma Castaño, J.A). Ed.: Gráfica Internacional. Madrid.
- VILA, R. (1999). Métodos inmunológicos en la industria de alimentos II. *AICE*, **66**: 8-11.
- VIRGILI, R., SCHIVAZAPPA, C., PAROLARI, G., BORDINI, C.S. y DEGNI, M. (1998). Porteases in fresh pork muscle and their influence on bitter taste formation in dry-cured ham. *J. Food Biochem.*, **22**: 53-63.
- VIVEGNIS, J., CHIANG, C. LAMBERT, B. y DECALLONNE, J. (1996). Rapid enumeration of bacteria in foods using Direct Epifluorescent Filter Technique. *Sciences des Aliments*, **16**: 475-490.
- VOIGT, J., BIEHL, B., HEINRICHS, H., KAMARUDDIN, S., GAIM, M.G., y HIGI, A. (1994). In-vitro formation pf cocoa-specific aroma precusrosrs: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by cooperation of an aspartic endoprotease ans a carboxypeptidase. *Food Chemistry*. **54**: 173

- VON HOLY, A. y HOLZAPFEL, W.H. (1988). The influence of extrinsic factors on the microbiological spoilage pattern of ground beef. *Int. J. Food Microbiol.*, **6**: 269-280.
- WAAGE, S. JONSSON, P. y FRANKLIN, A. (1994). Evaluation of a cow-side test for detection of Gram-negative bacteria in milk from cows with mastitis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **35**: 207-212.
- WANG, H. (2002). Rapid methods for enumeration of *Campylobacter* spp. in foods. *J. AOAC Int.*, **85**: 996-999.
- WARD, D.R., LaROCCO, K.A. y HOPSON, D.J. (1986). Adenosine Triphosphate Bioluminescent Assay to Enumerate Bacterial Numbers on Fresh Fish. *J. Food Prot.*, **49**: 647-650.
- WARRINER, K., EVELEIGH, K., GOODMAN, J., BETTS, G., GONZALEZ, M., WAITES, W.M. (2001). Attachment of bacteria to beef from steam-pasteurized carcasses. *J. Food Prot.*, **64**: 493-497.
- WINGFIELD, P., GRABER, P., TURCATTI, G., MOVVA, N.R., PELLETIER, M., CRAIG, S., ROSE, K. y MILLER, C.G. (1989). Purification and characterization of a methionine-specific aminopeptidase from *Salmonella typhimurium*. *European Journal of Biochemistry*, **180**: 23-32.
- WINSLOW, R.L. (1979). Bacterial standarts for retail meats. *J. Food Prot.*, **42**: 438-442.
- YADA, R.Y. y SKURA, B.J. (1982). Scanning electron microscope study of *Pseudomonas fragi* on intact and sarcoplasm depleted bovine Longissimus dorsi muscle. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**: 905-915.
- YI-MEI SUN y OCKERMAN, H.W. (2001). The Growth of *Pseudomonas Fluorescens* and Non-Pathogenic *E. Coli* in Aseptically Obtained Fresh Ground Beef Under 7° C Refrigersted Storage. Research and Reviews: Meat 2001. Special Circular 183-02.
- YI SU OH, ING LUNG SHIH, YEW MIN TZENG y SAN LANG WANG (2000). Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, **27**: 3-10.
- YOST, C.K. y NATTRESS, F.M. (2000). The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage. *Lett. Appl. Microbiol.*, **31**: 129-133.