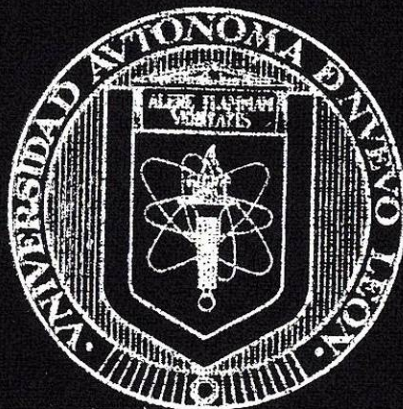


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

E INMUNOLOGÍA



"ESTUDIO SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA
Y FÍSICOQUÍMICA DE UN PRODUCTO A BASE DE
POLLO DE NUEVA INTRODUCCIÓN AL MERCADO."

TESIS

QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS

PRESENTA

GABRIELA PÉREZ ROSALES

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L. MARZO DE 2004

TL
QR148
.P47
2004
c.1

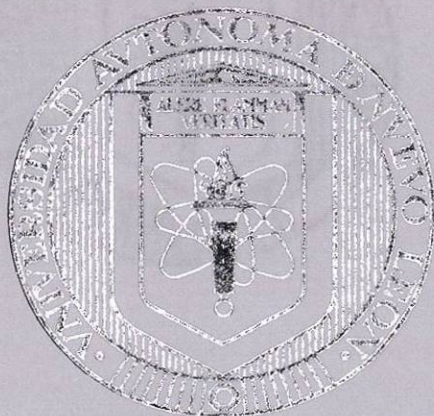


1080171442

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
E INMUNOLOGÍA



"ESTUDIO SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA
Y FÍSICOQUÍMICA DE UN PRODUCTO A BASE DE
POLLO DE NUEVA INTRODUCCIÓN AL MERCADO."

TESIS

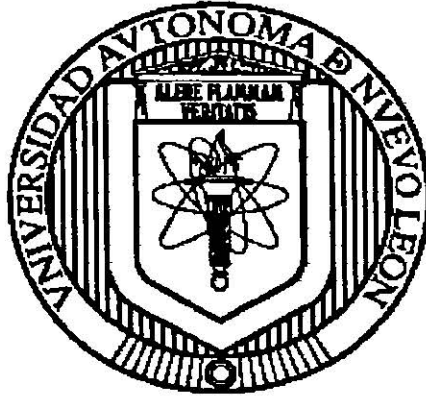
QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS

PRESENTA

GABRIELA PÉREZ ROSALES

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L. MARZO DE 2004

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGIA**



“Estudio sobre la calidad microbiológica y fisicoquímica de un producto a base de pollo de nueva introducción al mercado.”

**TESIS
QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA
GABRIELA PÉREZ ROSALES**

San Nicolás de los Garza, N. L., México, Marzo de 2004

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

**ESTUDIO SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y
FISICOQUÍMICA DE UN PRODUCTO A BASE DE POLLO DE
NUEVA INTRODUCCIÓN AL MERCADO.**

TESIS

QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS

Presenta

GABRIELA PÉREZ ROSALES

COMISION DE TESIS


Dra. Licet Villarreal Treviño
Presidente


M. C. Martha Santoyo Stephano
Secretario


Dra. Ma. Guadalupe Alanís Guzmán
Vocal


M. C. Ma. Manuela Vela Franco
Suplente

San Nicolás de los Garza, N. L., México, Marzo de 2004

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología General del Departamento de Microbiología e Inmunología y en el Laboratorio de Alimentos del Departamento de Alimentos, pertenecientes a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Licet Villarreal Treviño y la asesoría de la Dra. Guadalupe Alanís Guzmán.

DEDICATORIA*Dedicada:**A mi familia;*

*Con todo mi cariño, a mi mamá **Martha Rosales** por el amor y afecto que me ha brindado día con día desde que vi la luz de este mundo; a mis hermanos **Martha, Ricardo y Sonia** que a pesar de las adversidades hemos estado juntos en las buenas y las malas, a mis sobrinos **Néstor y Samantha** que son todo mi querer, a mi mamá **Toña** por estar para nosotros desde nuestra infancia, y a mi tío **Rufino** que fue una fuente especial de inspiración para estudiar en la vida. Gracias por enseñarme que después de caerse hay que levantarse y que día con día hay que ser mejor, la naturaleza es sabia y supo qué familia sería para mi la perfecta.*

A mis maestros;

Porque gracias a ellos veo al fin coronado mis esfuerzos, por las palabras de ánimo y apoyo que siempre recibí de ellos, y por haber guiado mis pasos a través de sus conocimientos durante todo este tiempo.

A mis amigos;

Rosy, Juany Liz y Laura. Por su amistad sincera y el gran cariño que me han demostrado, por ser mi apoyo no solo en las buenas también en las malas, porque estos son muy difíciles de encontrar y fáciles de conservar por ser verdaderos.

A Marco;

Por ser mi mejor amigo y confidente en todo momento, por ser mi apoyo cuando más lo he necesitado, por ser mi compañero de alegrías y tristezas, y por significar tanto en mi vida, ¡y.

A DIOS Por iluminar mis pasos en la oscuridad y por siempre estar conmigo hasta el final.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo y sincero agradecimiento a la **Dra Licet Villarreal Treviño** por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo, y por haberme dado la oportunidad de aprender de sus conocimientos los cuales me permitieron realizar esta investigación y han sido importantes en mi desarrollo profesional.

A la **Dra. Guadalupe Alanís Guzmán** por la asesoría y apoyo que no solo mostró en este trabajo sino durante toda la carrera, mil gracias.

A la **M. C. Martha Santoyo Stephano** por la colaboración y apoyo brindado en este proyecto y en mis primeros semestres.

A la **M. C. María Manuela Vela Franco** por el apoyo desinteresado que mostró en este proyecto y durante mi estancia en el laboratorio además de su amistad.

A el **Biól. Carlos Moisés Villarreal Treviño** por la facilitación de las muestras durante el desarrollo del trabajo.

A la **L.C.A. Alma E. Mora Zúñiga** y al **L.C.A. Jesús Ríos** por ser más que compañeros de carrera y generación por ser mis amigos.

A la **Q.B.P. Blanca Lilia González** por su gran apoyo durante la investigación y por estar ahí cuando más lo necesite.

A mis compañeros y amigos de laboratorio en especial al **Dr. Mario Morales, M.C. Blanca, Nancy, Marlene, Tabita, Porfi y Luis** por ser siempre muy accesibles.

A todos los maestros que me guiaron en el camino de la enseñanza a lo largo de la carrera.

A **Adrián Roldán y Sergio Armando** los chicos de la biblioteca que me ayudaron bastante con los detalles pequeños pero muy importantes de este trabajo y a lo largo de la carrera.

A **Marco Gutiérrez** por estar a mi lado y darme su apoyo incondicional y exhortarme a finalizar este proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
Página de título.....	i
Comisión de tesis.....	ii
Lugar de trabajo.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Índice de contenido.....	vi
Lista de figuras.....	viii
Abreviaturas y símbolos.....	x
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	5
Hipótesis.....	12
Objetivo.....	13
Metodología.....	14
a) Colecta y preparación de las muestras.....	14
b) Análisis microbiológico.....	15
1. Aislamiento de <i>Salmonella spp.</i>	15
1.1..Preenriquecimiento.....	15
1.2 Enriquecimiento.....	15

1.3 Aislamiento.....	16
2. Cuenta de mesofílicos aerobios.....	16
3. Número más probable para bacterias coliformes totales y fecales.....	17
3.1 Prueba presuntiva.....	17
3.2 Prueba confirmatoria.....	18
4. Cuenta de <i>Staphylococcus aureus</i>	19
c) Análisis fisicoquímicos.....	19
1. Determinación de pH.....	19
2. Determinación de amonio.....	20
3. Prueba de putrefacción.....	21
d) Análisis estadístico.....	22
Resultados.....	23
a) Calidad bacteriológica.....	23
b) Análisis fisicoquímicos.....	27
c) Análisis estadístico.....	28
Discusión.....	31
Conclusión.....	35
Literatura citada.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Presentación del ceviche de pollo.....	14
2. Homogenización de la muestra.....	15
3. Caldo tetracionato.....	15
4. Medios selectivos para <i>Salmonella</i>	16
5. Dilución de las muestras.....	17
6. Prueba presuntiva.....	17
7. Prueba confirmatoria.....	18
8. Prueba para coliformes fecales.....	18
9. Medio selectivo agar Baird Parker para <i>S. aureus</i>	19
10. Medición del pH a la muestra.....	20
11. Destilación de la muestra.....	20
12. Titulación de la muestra.....	21
13. Prueba de putrefacción.....	22
14. Análisis bacteriológico del ceviche de pollo durante 21 días.....	26
15. Diferencias entre tiempos de almacén para mesofílicos aerobios.....	29
16. Diferencias entre tiempos de almacén para coliformes fecales.....	29

Tabla	Pág.
1. Análisis bacteriológico del ceviche de pollo en el primer día de muestreo..	23
2. Análisis bacteriológico del ceviche de pollo a los 7 días de muestreo.....	24
3. Análisis bacteriológico del ceviche de pollo a los 14 días de muestreo.....	25
4. Análisis bacteriológico del ceviche de pollo a los 21 días de muestreo.....	25
5. Pruebas fisicoquímicas para determinar putrefacción en un ciclo de 21 días.....	27
6. Análisis de varianza para mesofílicos aerobios y análisis Kruskal – Wallis.... para coliformes fecales en los tiempos de vida de anaquel.....	30

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
A_w	Actividad acuosa
Cols	Colaboradores
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
F	Prueba estadística
g	gramo
G	Grupo
h	Hora
H ₂ S	Ácido sulfhídrico
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
mg	miligramo
mL	mililitro
mm	milímetro
MRSA	<i>S. aureus</i> resistente a la methicilina
N	Normalidad
N/100g	Nitrógeno por 100g
NaOH	Hidróxido de sodio
Ng	nanogramo
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
(NH ₄)SO ₄	Sulfato de amonio
NMP	Número más probable
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

<i>S. thypi</i>	<i>Salmonella thypi</i>
S/A	Sin año
<i>spp</i>	Especies
T	Tiempo
TVN	Nitrógeno volátil total
UFC	Unidades formadoras de colonias
χ^2	Chi - cuadrada
XLD	Agar xilosa desoxicolato
<i>Y. enterocolítica</i>	<i>Yersinia enterocolítica</i>

RESUMEN

Existe un interés particular en los productos que están listos para su consumo en donde se necesita mantener estrictos controles de calidad tanto química y microbiológicamente para evitar la proliferación de microorganismos patógenos como *Salmonella spp* y *S. aureus* entre otros y así mantener la vida de anaquel. En esta investigación se analizaron 29 muestras de ceviche a base de pollo cocido en ácidos orgánicos producto de nueva introducción al mercado, proporcionados por una planta procesadora de productos avícolas, para determinar la calidad microbiológica, fisicoquímica y su vida de anaquel. La metodología que se usó para las pruebas microbiológicas se basaron en la NOM-114-SSA1-1994 para el aislamiento de *Salmonella spp*, mientras que para *S. aureus* fue la NOM-115-SSA1-1994; para la cuenta de mesofílicos aerobios NOM-092-SSA1-1994, y finalmente para la cuenta de coliformes totales y fecales se utilizó la NOM-112-SSA1-1994; y la NOM-143-SSA1-1994 respectivamente. La determinación de amonio se realizó según el libro de Análisis de alimentos de Fernández Salguero S/A y la prueba cualitativa de putrefacción se basó en la técnica descrita en el cuadernillo de Alanís y col, 1994. Se determinó la ausencia de los patógenos *Salmonella spp* y *S. aureus* durante la vida de anaquel del producto y para la cuenta de mesofílicos aerobios se reportó el 100% dentro de la NOM-093-SSA1-1994; no así para los coliformes fecales donde un 10% del total de las muestras se encontró fuera del límite establecido por la misma Norma. También se observó una disminución a lo largo del ciclo de vida de anaquel de las cuentas de mesofílicos y coliformes. La prueba cualitativa de putrefacción resultó negativa en el 100% de las muestras que se analizaron y la determinación de amonio se encontró dentro del límite que se establece para carnes, que es de 16.5 mgN/100g de muestra. Por lo que se determinó que el ceviche a base de pollo es un producto microbiológicamente seguro y en donde las pruebas fisicoquímicas avalan una vida de anaquel de 21 días que es superior a la programada de 15 días.

INTRODUCCIÓN

Shewfelt en 1986 -1987 define vida de anaquel o vida segura como el tiempo con el que un producto puede contar para mantener un predeterminado nivel de calidad. Para esta definición las determinaciones se basan primeramente en seleccionar una específica cualidad o atributo y un criterio de aceptabilidad. Existen diferentes estándares de calidad que pueden ser usados para determinar los límites de aceptabilidad y definir el fin de vida segura. Los estándares microbiológicos son usualmente descritos en términos legales de requerimientos y son estándares mínimos.

Existen muchas definiciones para describir la vida segura de productos relacionados con propiedades específicas. La definición de alimento seguro puede definirse como el tiempo que desde la manufactura un producto alimenticio permanece seguro y saludable bajo condiciones recomendadas. Para el consumidor no es fácil evaluar la seguridad y lo saludable ya que el consumidor no puede evaluar la carga microbiológica o el valor nutricional en el momento de comprar.

Cuando en un alimento se presentan cambios sustanciales o cualquier tipo de modificación que limiten su aprovechamiento, se habla de alteración de dicho alimento. Esta es causada por influencias externas o también por circunstancias que radican en el mismo alimento que pueden ser de naturaleza físico-química, biológica o microbiológica.

La contaminación microbiológica puede reducir la calidad de la carne fresca y otros alimentos recortando su vida segura y causando pérdidas económicas y peligros en la salud. Al extender la vida de anaquel de un producto esto puede

permitir que exista suficiente tiempo para que proliferen microorganismos dañinos, indeseables. Es de interés particular los productos que están listos para comerse y que no requieren de cocción antes de su consumo, en donde se necesita mantener estrictamente las condiciones adecuadas de procesamiento, empaque, almacenamiento y distribución de dichos alimentos refrigerados para evitar la proliferación de microorganismos patogénicos.

Entre los microorganismos patógenos de interés en productos alimenticios están *Salmonella spp*; ésta es una bacteria gramnegativa, de forma bacilar, móvil, no esporulada, que se encuentra asociada a infecciones alimentarias adquiridas por la ingestión de alimentos contaminados con este microorganismo. Todas las especies de *Salmonella* son patógenas para el hombre: una de ellas *S. thypi* causa la fiebre tifoidea, otras especies como *S. enteritis* causa gastroenteritis y *S. typhimurium* es la causa más común de salmonelosis.

Esta bacteria se ha identificado en muchas ocasiones en diversos productos de origen animal que se consideran vehículo primario de los brotes de salmonelosis y que ocurren como resultado del mal manejo ya sea en casa o establecimientos de servicio de comida a base de carne de res, pavo, cerdo, pollo, helados y leche no pasteurizada entre otros alimentos.

El método más común para eliminar a *Salmonella* de productos alimenticios es por calor. Otros factores que favorecen su eliminación son la acidificación y la reducción del A_w .

Otra bacteria patógena la cual es una de las mayores preocupaciones en la higiene de los alimentos es *Staphylococcus aureus*, que causa intoxicación ya que este microorganismo produce una enterotoxina durante su crecimiento en los alimentos, sobre todo los de origen animal (carnes y productos lácteos).

El hábitat natural de *S. aureus* son los animales de sangre caliente incluyendo a los humanos. Del 0 al 40% de la población es portador asintomático de *S. aureus*; encontrándose principalmente en la membrana mucosa. Los manipuladores de alimentos son con frecuencia fuente de contaminación alimenticia; además de la leche y los productos lácteos.

S. aureus tiene un diámetro de 0.8 micrómetros, aparece agrupado en racimos irregulares y en ocasiones en pares de células esféricas. Es una bacteria gram-positiva excepto en cultivos de más de 48 horas, donde pueden aparecer cocos gram-negativos; esta bacteria es inmóvil. Durante su crecimiento *S. aureus* puede sintetizar varias enzimas y proteínas como proteasas, lipasas, fosfolipasas, lipoproteínas, esterasas y liasas. La mayoría de las cepas son capaces de hidrolizar proteínas animales nativas como la hemoglobina, fibrina, clara de huevo y caseína.

En virtud de lo descrito anteriormente acerca de la presencia de *Salmonella spp.* y *S. aureus* en alimentos de origen animal y de la importancia del tiempo de duración de los alimentos principalmente a base de carne, en este caso de pollo; es de suma importancia conocer la incidencia de este tipo de bacterias en alimentos a base de carne y cocidos en ácidos orgánicos ya que es un producto de nueva introducción al mercado y al analizarse se pueden medir los riesgos que pueden representar para el consumidor.

ANTECEDENTES

La preferencia a los métodos rápidos para preparar los alimentos, a los alimentos fáciles de usar, frescos, de "tipo fresco", con mínimo procesamiento y a los alimentos que cumplen con necesidades dietéticas específicas ha aumentado, y por conveniencia se elaboran con una vida de anaquel larga. Los fabricantes de los alimentos que tienen un procesamiento mínimo siempre se preocupan por mantener la inocuidad de los mismos (Knabel, 1999).

La ausencia de reportes de enfermedades causadas por alimentos asociados directamente con el consumo de alimentos comerciales preparados como salsas y rellenos acidificados es evidencia de su seguridad. *Salmonella*, *E. coli*, *O157:H7*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Y. enterocolitica* mueren cuando se inoculan dentro de la mayonesa y los rellenos; históricamente este tipo de alimentos están exentos de las regulaciones de alimentos acidificados, ya que los ácidos orgánicos son preservativos naturales principalmente el ácido acético, siendo el más efectivo para eliminar bacterias patógenas a valores de pH encontrados en esos productos (Smittle, 2000).

Salmonella se aisló por vez primera en 1885 por el veterinario americano Daniel Elmer Salmon. La salmonelosis sigue siendo un problema de salud pública muy importante en México y en muchos países en desarrollo, ya que no sólo afecta al hombre sino también a animales domésticos causando grandes pérdidas económicas. Hasta ahora se han identificado aproximadamente 2,200 serotipos, los cuales varían de año a año y de país en país, muchos de estos serotipos son patógenos potenciales causantes de gastroenteritis y de infecciones extraintestinales como sepsis, meningitis y fiebres entéricas (Gutiérrez-Cogco y cols, 1994).

Salmonella es uno de los más frecuentes agentes etiológicos que se reporta en brotes de infecciones humanas ocasionados por productos frescos en recientes años. Determinaciones con PCR utilizando cuatro pares de iniciadores derivados de dos reguladores invasivos de *Salmonella*, fueron desarrollados para identificar *S. enterica* serotipo Montevideo en tomates madurados. Basados en la examinación de 83 cepas de *Salmonella* y 22 cepas diferentes a ésta, inoculada en tomates, se concluyó que un par de estos iniciadores detecta *Salmonella* específicamente, ya que esta determinación es sensitiva y específica y puede ser usada para una rápida detección de este microorganismo en productos frescos (Go y cols, 2000).

En un estudio que se realizó por estos mismos investigadores en el 2001 con plantas de tomates en donde se inocularon con cinco serotipos de *Salmonella* antes de que el fruto apareciera; los tomates maduros que se obtuvieron se sometieron a un análisis microbiológico donde se obtuvo como resultado, que de 30 tomates cosechados de las plantas que se inocularon; 11 (37%) resultaron positivos para *Salmonella*. Con altos porcentajes en la superficie de la planta 82% y en el tallo 73% comparados con la pulpa del tomate que presentó *Salmonella* en un 55%. Estos resultados sugieren que las células de *Salmonella* sobreviven en los frutos de tomate desde el tiempo de inoculación o aspersion hasta la floración y madurez del fruto, además de que el tallo y las flores de la planta de tomate son posibles sitios donde *Salmonella* puede adherirse y ser viable durante el desarrollo del fruto. Tales partes sirven como rutas o reservorios de contaminación para el fruto maduro.

Hogue y cols, en 1995 llevaron a cabo en Estados Unidos una inspección nacional para revisar la calidad sanitaria de los huevos sin pasteurizar así como de las gallinas para matanza. Se analizaron 305 gallinas para matanza, de las cuales 106 resultaron positivas para la cepa de *Salmonella enteritidis*.

En España se realizó un estudio en mataderos de pollos para determinar la incidencia y distribución de serotipos de *Salmonella*, se analizaron un total de 192 muestras incluyendo materia fecal, utensilios, agua y cuerpos del ganado muerto. Se aislaron un total de 112 cepas, 87 fueron *S. enteritidis*; el resto se observó que pertenecían a *S. thypimurium*, *S. virchow* y *S. blockley* (Carramiña y cols, 1997).

Chang, en el año 2000 realizó un estudio en Corea para determinar la prevalencia de *Salmonella spp* en 27 pollos crudos y se detectó en un 25.9% del total de las muestras, los serotipos que se encontraron fueron: *Salmonella enteritidis*, *Salmonella virchow* y *Salmonella virginia*.

Así mismo en un estudio realizado en la Cd de Guadalajara, México, se analizaron 70 muestras de pollo crudo y 40 de pollo rostizado y se encontró a *Salmonella* en un 69% en pollo fresco y un 2.5% en pollo rostizado (Castillo- A y cols, 1993).

De igual manera se realizó un estudio en la Cd de Guadalajara en 221 (20g cada una) muestras de ceviche de pescado que se prepararon y vendieron en 89 establecimientos de alimentos fijos y móviles. Las muestras que se analizaron tenían un pH entre 3.8 y 5.2 con una media de 4.55 y con un rango de temperatura de 9 a 29°C donde un 16% fueron positivas para *Salmonella* y las proporciones en los establecimientos fijos y móviles fue de un 12% y un 20% respectivamente. *Salmonella* se aisló en 2 de 8 muestras con pH de 4.0. Estos resultados indicaron que comer ceviche puede poseer un riesgo a la salud, especialmente para personas con baja resistencia a alimentos transmisores de enteropatógenos. Aunado a esto se enfatiza que el jugo de limón no es garantía de seguridad del ceviche (Fernández y cols, 1996).

En un estudio hecho a través de un inmunoensayo con un anticuerpo monoclonal se pudo detectar en 24 horas a *Salmonella enterica* de la serovariedad

Enteritidis en huevos artificialmente inoculados. La detección en aves y otro tipo de productos requiere de 28 h. Esta serovariedad se detectó en presencia de otras bacterias en una proporción de 1:400. La detección en aves, crema de nieve, leche, polvos y alimento para aves fueron directamente enriquecidos y homogeneizados para el inmunoensayo, la incubación de 1, 5, o 10 UFC por 24 h a 37°C fue suficiente para la detección del serovar *Enteritidis* (Akira y cols, 2001).

En otro estudio que se realizó por Ferreti y cols en el 2001 en Italia mediante PCR para la detección de *Salmonella* en salami típico de la región de Marche; se observó que este método es sensitivo y específico y muestra una excelente correlación con el método convencional de referencia cuando se analizan las muestras de alimentos contaminados. Esto puede ser fácilmente llevado a cabo en un máximo de 12 h en las muestras de alimento y así de esta manera se permite obtener una pronta detección de *Salmonella spp.* en los alimentos.

Los brotes de enfermedades alimentarias es uno de los problemas públicos mayores en los Estados Unidos y en todo el mundo. Los países desarrollados y en vías de desarrollo sufren las consecuencias de estos brotes pero en diferentes grados. Los patógenos más frecuentemente asociados con diarrea en los E. U. y en los países en desarrollo son: *Campylobacter spp*, *Salmonella spp*, *Clostridium perfringes*, *E. coli enterotoxigénica*, *enteroagregativa* y *enteroadherente*, *Shigella* y *S. aureus* (King y cols, 2000).

En la región sudeste de Brasil se verificó la ocurrencia de *S. aureus* en una muestra de queso artesanal para venta al público, en donde además de evaluar el riesgo potencial para el consumidor, se analizaron 80 muestras de este tipo de alimento al aplicar la prueba del número más probable de *S.aureus* con una cuenta importante de $10^5/g$ en donde estos valores están cercanos al número de bacterias capaz de producir suficiente enterotoxina para causar una enfermedad o brote alimentario (Almeida y cols, 2000).

En una investigación realizada por Rasooly y col en 1997 encontraron que la enterotoxina A de *S. aureus* (SEA) es la principal causa de envenenamiento por alimentos, en donde la dosis patogénica es de 100 ng.

En el procesamiento de aves en una planta al norte de Alemania se tomaron 1412 muestras del personal y de la canal de las aves (de 22 granjas diferentes). En los resultados se obtuvo que *S. aureus* fue positivo en un 35% en el pollo y un 48% en el personal. Las muestras tomadas de las plumas y de la piel arrojó un alto nivel para *S. aureus* (47%). Desde un 8% hasta un 63% de los animales fueron positivos. La contaminación por estafilococos se incrementó en el curso de la matanza en un 5.7%; aunque *S. aureus* se introdujo al matadero por medio de las aves, la contaminación del producto final parece ser originado principalmente por el personal (Hentschel y cols, 1979).

Las infecciones con *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) son cada vez más frecuentes en la comunidad. En un estudio que se realizó acerca de un brote en donde un manipulador de alimentos, un espécimen alimentario y tres patrones enfermos, presentaron todos ellos el mismo tipo de toxina producida por la cepa de MRSA. Este es el primer reporte de un brote de enfermedad gastrointestinal causada por MRSA (Jones y cols, 2002).

Viswanathan y cols en el 2001 realizaron un estudio en un total de 120 muestras de diferentes tipos de vegetales crudos, frutas y 3 tipos de coles de bruselas que se obtuvieron de vendedores de la calle, y se les determinó microorganismos aeróbicos, coliformes y varios patógenos, y demostraron que la cuenta en placa para aerobios en la ensalada fue de 10^{10} UFC/g, y para frutas de 10^9 UFC/g. Entre los patógenos que se aislaron estaban *S. aureus*, *E. coli*, *Enterobacter*, y *S. tiphy* entre otros.

Existe un gran número de alimentos cuyas propiedades sensoriales se deben a una mezcla muy compleja de compuestos, producida por la acción de diversos microorganismos, como hongos, levaduras y bacterias; éstos provienen de una contaminación natural o bien se añaden intencionalmente en condiciones bien controladas para que lleven a cabo una determinada fermentación. Cuando estas transformaciones bioquímicas no se regulan adecuadamente, el resultado es un producto “descompuesto”, “podrido” o “putrefacto”, términos que se emplean para describir un alimento cuyo crecimiento microbiano no fue ordenado (Badui S, 1994).

Así como en los microorganismos cuya actividad enzimática que fermenta, vuelve rancios y pudre los alimentos, las plantas y los animales sanos libres de infección que se emplean como alimento, tienen sus propias enzimas de cuya actividad en gran parte sobreviven a la recolección y el sacrificio. No solo puede la actividad enzimática persistir a través de toda la vida útil de muchos alimentos naturales y fabricados, sino que esta actividad a menudo se intensifica después de la cosecha y el sacrificio. Esto se debe a que las reacciones enzimáticas se controlan y equilibran con mucha precisión en la planta o el animal que vive y funciona normalmente, pero este equilibrio se pierde cuando el animal es sacrificado o la planta es retirada del campo. A menos que estas enzimas sean inactivadas por calor, sustancias químicas, la radiación o algún otro medio, siguen catalizando reacciones químicas en los alimentos. Algunas de estas reacciones si no se les permite progresar más allá de un cierto límite, son muy deseables. Pero la maduración y el envejecimiento más allá de un límite óptimo se convierte en la descomposición de los alimentos; los tejidos debilitados son atacados por infecciones microbianas y llega al grado de putrefacción (Potter N, 1973).

Para confirmar la ausencia de gérmenes patógenos se deben emplear las técnicas microbiológicas y los métodos químicos relativamente rápidos cuando se trata de valorar el grado de alteración o la aceptabilidad de los alimentos cárnicos.

Estos valores son aplicables a las carnes crudas, aunque la alteración de la carne y el pescado es un proceso muy complejo se puede considerar que es debida a una o más de las reacciones siguientes:

a) Descomposición (desaminación) de proteínas dando amoniaco, indol, escatol, H_2S , etc b) formación de amoniaco a partir de urea debido a la acción bacteriana y c) alteración de las grasas por hidrólisis, oxidación y otras formas de rancidez. En la carne, la ruptura de las proteínas se produce normalmente antes del deterioro de las grasas (Pearson D, 1998).

Los analistas han venido utilizando durante muchos años para el control del estado del pescado, la carne, los huevos y otros alimentos, la tasa de amoníaco preformado como índice de descomposición protéica. (Hart F. L. y col., 1991).

En 1994 se realizó un estudio en la Ciudad de Monterrey para determinar el grado de frescura de la materia prima como harina de pescado para la alimentación animal en el cual se midió el contenido de nitrógeno volátil. Esta prueba determina el contenido de amonio, mono y trimetil aminas. El principio es por precipitación de la proteína con ácido tricloroacético y determinación de nitrógeno amoniacal por el método Kjeldhal (Abdo M, 1994).

Tapia en 1996 al medir el efecto de las harinas de pescado con diferente score biotóxicológico sobre el crecimiento y sobrevivencia del camarón blanco, propone que los valores de TVN no reflejan el grado de frescura del producto final, sino lo que miden son sustancias volátiles, las cuales se pueden perder durante el secado de la materia prima y que solo puede medir la frescura de ésta.

HIPÓTESIS

La vida de anaquel del ceviche a base de pollo se relaciona directamente con la calidad microbiológica y fisicoquímica de éste.

OBJETIVO

Investigar la presencia de *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* en ceviche de pollo desde su empaclado hasta el final de su vida de anaquel.

Determinar la calidad microbiológica basada en ~~en~~ la presencia de mesofílicos aerobios y coliformes fecales durante la vida de anaquel del mismo.

Determinar la vida de anaquel en base a la presencia de amonio y prueba de putrefacción del producto.

METODOLOGÍA

A. COLECTA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Se obtuvieron 29 muestras de ceviche de pollo en presentación de 500 g en recipiente transparente de plástico blando en un medio normal, sin atmósferas controladas, ni al vacío (figura 1).

Este producto se elaboró principalmente a base de filete, milanesa y retazos de pollo en trozos pequeños los cuales se sanitizaron previamente en una solución de agua más sanitizante; los trozos de pollo se dejaron reposar en jugo de limón, esto se mezcló con tomate y cebolla que se cortó en trozos pequeños, cilantro, chile chipotle, condimentos, aceite y catsup.

Las muestras se recolectaron directamente de la planta procesadora de productos avícolas y se transportaron en hieleras bajo las mismas condiciones hasta el lugar de trabajo; se colocaron a temperatura de refrigeración de 0 a 4 °C según especificación del producto y se analizaron durante los días uno, siete, catorce y veintiuno. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.



Fig. 1 Presentación del ceviche de pollo

B. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

1. AISLAMIENTO DE *Salmonella spp.* (NOM-114-SSA1-1994)

1.1 Preenriquecimiento.

Las muestras de ceviche de pollo se mantuvieron en refrigeración y posterior a ello se desinfectó el empaque de cada muestra y se tomaron porciones de la misma usando para ello equipo estéril (tijeras, cucharas), hasta obtener 25 g que se homogenizaron en 225 mL de caldo lactosado (Difco) (figura 2) y se incubaron a 35 °C por 24 h.



Fig. 2
Homogenización
de la muestra

1.2 Enriquecimiento .

A partir del caldo lactosado y después de homogenizar, se tomó 1 mL del cultivo y se inoculó a un tubo con 10 mL de caldo tetrionato (Difco) el cual se muestra en la figura 3, previamente complementado con 0.1 mL del inhibidor yodo yoduro al 12% para otros microorganismos no deseados. Este medio se agitó y se incubó a 35 °C/24 h.

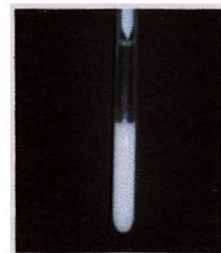
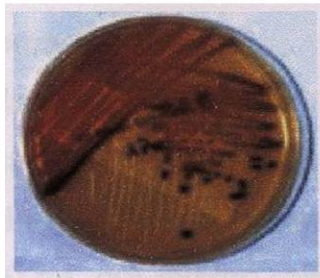


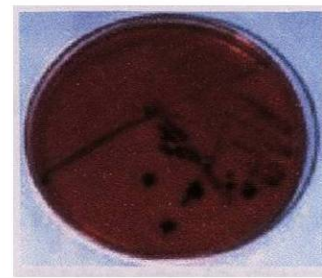
Fig. 3 Caldo
tetrionato

1.3 Aislamiento.

De los tubos de caldo tetrionato se tomó una alícuota con una asa después de agitar el tubo y se depositó en la superficie de placas con medios de cultivo selectivos, Salmonella Shigella, Enterico Hektoen y XLD (Difco); de preferencia con la superficie seca para mejor aislamiento de las colonias. Una vez inoculado se incubó a 35°C/24 h. Se seleccionaron las colonias típicas en estos medios de cultivo. En el Agar Salmonella Shigella son colonias translúcidas ocasionalmente opacas, algunas colonias dan centro negro, virando el medio a amarillo. En el agar entérico Hektoen las colonias son de color verde azul-verde con o sin centro negro, en algunos casos las colonias aparecen completamente negras. En el agar XLD las colonias son rojas o rosas con o sin centro negro (figura 4).



Agar Salmonella – Shigella



Agar XLD

Fig. 4 Medios selectivos para *Salmonella*

2. CUENTA DE MESOFILICOS AEROBIOS

Este parámetro se realizó de acuerdo al método establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. De cada una de las muestras se pesaron 11g bajo condiciones asépticas en un frasco de licuadora previamente estéril y se homogenizaron con 99 mL de solución salina al 0.85% a pH neutro (10^{-1}) durante un espacio de 1 a 2 min, a partir de ésta se tomó 1 mL para transferirlo a un tubo con 9 mL de solución salina (10^{-2}) y así sucesivamente hasta la dilución 10^{-4} (figura. 5). A partir de la dilución 10^{-2} se colocó un 1 mL en placas petri estériles

para después adicionar de 15 a 20 mL de agar para cuenta en placa (Difco) fundido y atemperado a 45 °C; se dejó solidificar para incubar a 35°C por 24 h. La cuenta se llevó a cabo en el contador de colonias (Quebec Mod Q-14).



Fig. 5
Dilución de
las muestras

3. NUMERO MAS PROBABLE PARA BACTERIAS COLIFORMES TOTALES Y FECALES (NOM 143-SSA1-1995 para Coliformes fecales como el NMP; y NOM 112-SSA1-1994 para Coliformes totales)

3.1 Prueba presuntiva:

A partir de la segunda dilución de la solución salina que se realizó con anterioridad se inoculó 1 mL a tres tubos conteniendo 10 mL de caldo lactosado (Difco), los cuales se pueden observar en la figura 6; 1 mL de la dilución 10^{-3} a tres tubos con 10 mL del mismo medio de cultivo y así mismo con la dilución 10^{-4} . Estos tubos se incubaron a 35°C por 24-48 h; aquellos que formaron gas en el capilar invertido se resembraron para llevar a cabo las siguientes pruebas.

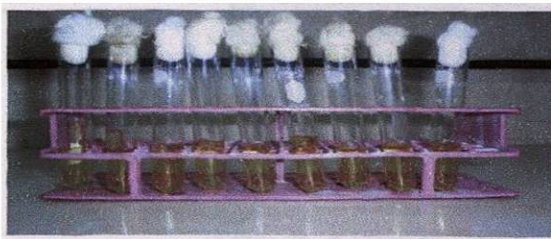


Fig. 6
Prueba presuntiva

3.2 Prueba confirmatoria:

Para coliformes totales: de los tubos que presentaron gas en el capilar se tomaron tres asadas de cada uno y se inocularon en tubos con 10 mL de caldo lactosado los cuales se incubaron a 35°C por espacio de 24-48 h. Se determinó el NMP de coliformes totales de acuerdo con los tubos que presentaron formación de gas en el capilar invertido (figura 7).

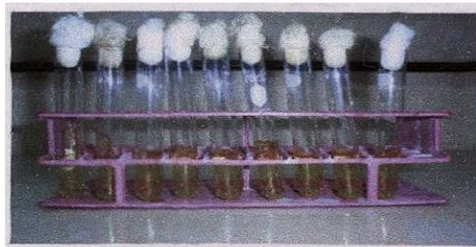


Fig. 7 Prueba confirmatoria

Para coliformes fecales: de los tubos que presentaron gas en el capilar de la prueba presuntiva se tomaron tres asadas de cada uno y se inocularon en tubos con 10 mL de caldo bilis verde brillante al 2% (Becton Dickinson) (figura 8), los cuales se incubaron a 44.5°C por espacio de 24-48 h. Se determinó el NMP de coliformes fecales de acuerdo con los tubos que presentaron formación de gas en el capilar invertido.



Fig. 8 Prueba para coliformes fecales

4. CUENTA DE : *Staphylococcus aureus*.

Esta prueba se realizó de acuerdo a la Norma Oficial mexicana NOM 115-SSA1-1994; empleando las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} de la cuenta de mesofílicos aerobios; se inoculó 0.1 mL de cada una de las diluciones sobre la superficie de cajas con agar Baird-Parker (Bioxon) respectivamente para cada una de las diluciones; se extendió el inóculo con una asa de vidrio estéril. Las placas se invirtieron hasta que se absorbió el inóculo en el medio y se incubaron por 45-48 h a 37°C. Posteriormente se aislaron las colonias típicas de *S. aureus* (figura 9), que fueran circulares, lisas, convexas, de 2-3 mm de diámetro, grises a negro azabache y presenten un halo de precipitación.

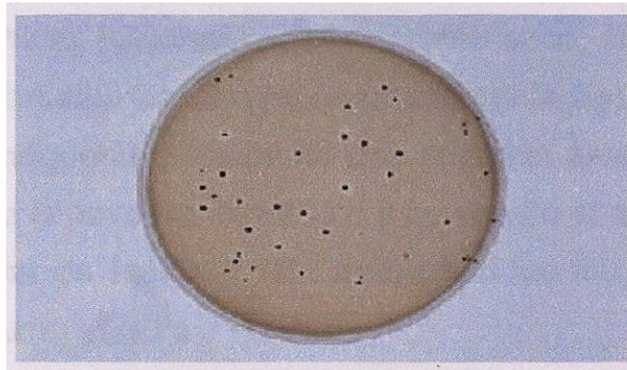


Fig. 9 Medio selectivo Baird -Parker para *S. aureus*

C. ANÁLISIS FISICOQUIMICO

1. DETERMINACIÓN DE pH

En condiciones de asepsia se pesaron 20 g de la muestra, los cuales se homogenizaron y se les adicionó 50 mL de agua destilada estéril a pH 7 y se midió el pH al sobrenadante, con un potenciómetro Denver (figura 10).



Fig. 10 Medición del pH a la muestra.

2. DETERMINACIÓN DE AMONIO (NITROGENO AMONIACAL)

Esta prueba se realizó según el libro de Análisis de alimentos de Fernández – Salguero S/A. De la muestra homogenizada se tomaron 5 g, los cuales se transfirieron a un matraz Kjeldhal completamente seco; se agregó 250 mL de agua destilada, 3 granallas de zinc (aproximadamente 3g), 6 perlas de vidrio, y 0.25g de óxido de magnesio para hacer una solución alcalina. Inmediatamente se conectó el matraz al aparato destilador y se destiló el amonio en 100 mL de una solución estándar de H_2SO_4 0.1N. Este paso fue muy lento para controlar la formación de espuma (figura 11).



Fig. 11 Destilación de la muestra.

Finalmente se hizo una titulación al exceso de H_2SO_4 con $NaOH$ 0.1N estandarizado, usando rojo de metilo como indicador (se agregaron 5 gotas de indicador) (figura 12). Al hacer los cálculos se utilizó la siguiente fórmula:

Porcentaje de nitrógeno amoniacal como NH_4Cl , $(NH_4)_2 SO_4$, etc.

$$\%N NH_4^+ = \frac{[(mlH_2SO_4) (N)] - [(mlNaOH) (N)]}{g \text{ muestra}} \times 0.014 \times 100$$



Fig. 12 Titulación de la muestra

3. PRUEBA DE PUTREFACCIÓN

Esta es una prueba cualitativa que complementó la determinación de amonio en donde primeramente se impregnó papel watman #1 con una solución saturada de acetato de plomo; se dejó a que se volatilizara una parte de la solución. Aparte en un matraz erlenmeyer de 250 mL se mezcló 5 mL de H_2SO_4 con 45 mL de agua destilada, a esta mezcla se le añadieron los 5 g de muestra cuidando de que no se quedaran adheridos a la pared del matraz. Al terminar este paso se tapó el matraz con el papel watman previamente impregnado con la solución de acetato de plomo y se selló con una liga, se dejó reposar el matraz a temperatura ambiente por espacio de 12 a 24 h. Los resultados se revisaron al día siguiente en donde si el papel filtro se tornó a color negro fue positivo para putrefacción y si el papel no cambió de color, es negativo para putrefacción (Alanís y col. 1994) (figura 13).



Fig. 13 Prueba de putrefacción

D. ANALISIS ESTADÍSTICO

Los estadísticos de las cuentas de los indicadores microbianos (mesofílicos aerobios y coliformes fecales) se representaron mediante histogramas.

Los resultados microbiológicos para la vida de anaquel se analizaron primero con Kolmogorov – Smirnov para conocer el tipo de distribución de los datos, los que presentaron Distribución normal se analizaron por medio del Análisis de varianza y comparación múltiple por medio de Tukey. Los que no presentaron distribución normal se analizaron por medio de Kruskal - Wallis y la comparación de medias por el método U de Mann – Whitney.

RESULTADOS

A) ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

Se analizó un total de 29 muestras de un producto de nueva introducción al mercado elaborado a base de pollo y cocido en ácidos orgánicos, para determinar su calidad bacteriológica con respecto a la presencia de *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, mesofílicos aerobios, coliformes totales y fecales durante su vida de anaquel. Se pudo observar durante el primer día del análisis la ausencia de los patógenos *Salmonella* y *S. aureus*. En cuanto al número de mesofílicos aerobios se determinó que el 100% de las muestras cumple con lo establecido en la Norma Oficial (150,000 UFC/g), mientras que en la cuenta de coliformes fecales se observó que el 82.36% de los resultados se encontró dentro del límite establecido que es de 100 UFC/g (tabla 1).

Número de muestras	Mesofílicos aerobios UFC/g	Coliformes totales UFC/g	Coliformes fecales UFC/g	<i>Salmonella spp.</i> 25g/ muestra	<i>S.aureus</i> 11g/ muestra
1	23650	1100	4	ausente	ausente
2	19550	11000	29	ausente	ausente
3	13125	4600	29	ausente	ausente
4	12500	11000	29	ausente	ausente
5	25255	4600	29	ausente	ausente
6	12610	4600	29	ausente	ausente
7	24350	11000	29	ausente	ausente
8	22275	11000	29	ausente	ausente
9	13650	11000	29	ausente	ausente
10	25200	4600	29	ausente	ausente
11	30400	2400	930	ausente	ausente
12	39820	930	930	ausente	ausente
13	41125	2400	230	ausente	ausente
14	13650	62	29	ausente	ausente
15	24500	40	40	ausente	ausente
16	26650	40	29	ausente	ausente
17	6900	90	40	ausente	ausente
Especificación	150,000		100	ausente	ausente
Cumple	100%		82.36%	100%	100%
No cumple			17.64%		

Tabla 1. Análisis bacteriológico del ceviche de pollo en el primer día de muestreo.

En relación a los resultados que se obtuvieron en el día 7 del muestreo se pudo observar que al igual que el día 1 no hubo presencia de los patógenos. En cuanto a los mesofílicos aerobios y coliformes fecales estos se encontraron en su totalidad dentro del límite establecido por la Norma (tabla 2).

Número de muestras	Mesofílicos aerobios UFC/g	Coliformes totales UFC/g	Coliformes fecales UFC/g	<i>Salmonella</i> spp. 25g/ muestra	<i>S.aureus</i> 11g/ muestra
1	17200	4600	29	ausente	ausente
2	12520	4600	29	ausente	ausente
3	19690	70	29	ausente	ausente
4	24250	110	40	ausente	ausente
Especificación	150,000		100	ausente	ausente
Cumple	100%		100%	100%	100%
No cumple					

Tabla 2. Análisis bacteriológico del ceviche de pollo a los 7 días de muestreo.

En los resultados que se obtuvieron el día 14 del muestreo se observó que existe ausencia de *S.aureus* y *Salmonella* spp al igual que en los dos primeros tiempos del análisis. En la cuenta de los indicadores microbianos tanto de mesofílicos aerobios como de coliformes fecales se observó que sí cumplen con las especificaciones de la Norma en un 100% (tabla 3).

Número de muestras	Mesofílicos aerobios UFC/g	Coliformes totales UFC/g	Coliformes fecales UFC/g	<i>Salmonella</i> spp. 25g/ muestra	<i>S.aureus</i> 11g/ muestra
1	7090	4600	29	ausente	ausente
2	7260	2400	29	ausente	ausente
3	4100	40	40	ausente	ausente
4	3600	29	30	ausente	ausente
Especificación	150,000		100	ausente	ausente
Cumple	100%		100%	100%	100%
No cumple					

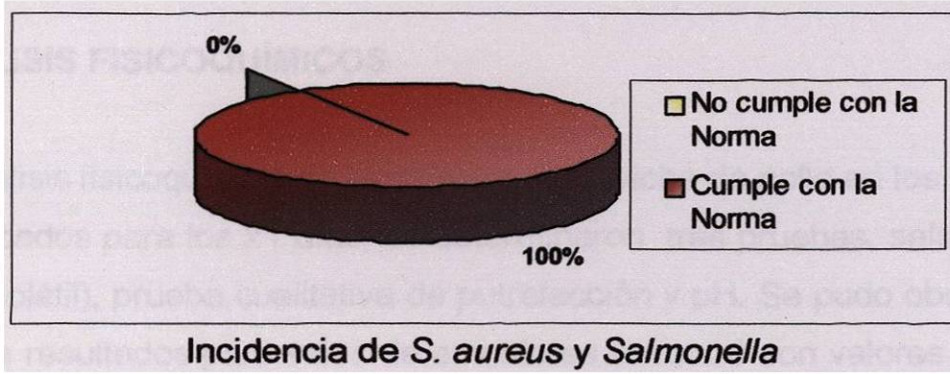
Tabla 3. Análisis bacteriológico del ceviche de pollo a los 14 días de muestreo.

De igual manera, en el día 21 del análisis se observó la ausencia de patógenos en las muestras. En relación a los mesofílicos aerobios estos se encontraron en su totalidad dentro de lo establecido en la Norma Oficial. El conteo de coliformes totales no se especifica en la Norma oficial sin embargo se realizó como un indicativo en la cuenta de coliformes fecales y como un paso anterior a ésta, y se pudo observar que el número de coliformes fecales no rebasa el límite establecido (tabla 4).

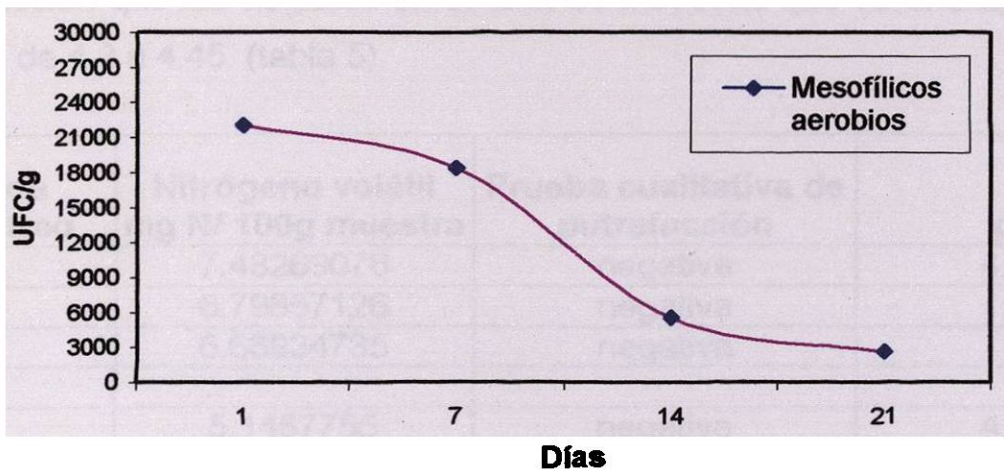
Número de muestras	Mesofílicos aerobios UFC/g	Coliformes totales UFC/g	Coliformes fecales UFC/g	<i>Salmonella</i> spp. 25g/ muestra	<i>S.aureus</i> 11g/ muestra
1	3100	29	29	ausente	ausente
2	2000	29	29	ausente	ausente
3	3000	29	29	ausente	ausente
4	2400	29	29	ausente	ausente
Especificación	150,000	100	100	ausente	ausente
Cumple	100%	100%	100%	100%	100%
No cumple					

Tabla 4. Análisis bacteriológico del ceviche de pollo a los 21 días de muestreo.

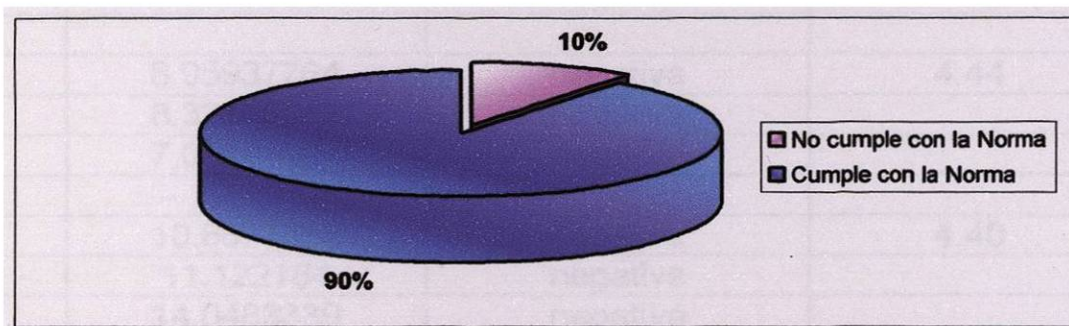
La ausencia de *Salmonella* y *S. aureus* así como el número de mesofílicos aerobios y coliformes fecales durante los 21 días de almacenamiento que corresponde a su vida de anaquel se pueden observar en la figura 14.



MESOFILICOS AEROBIOS



Promedio del número de microorganismos mesofílicos aerobios durante 21 días.



Porcentaje de muestras que rebasan el límite establecido mediante el NMP de coliformes fecales.

Fig. 14 Análisis bacteriológico del ceviche de pollo durante 21 días.

B) ANALISIS FISICOQUÍMICOS

En el análisis fisicoquímico de la muestra de ceviche de pollo en los intervalos de tiempo marcados para los 21 días, se determinaron tres pruebas, sales de amonio (nitrógeno volátil), prueba cualitativa de putrefacción y pH. Se pudo observar que el 100% de los resultados para sales de amonio se encontró con valores inferiores de nitrógeno volátil, (> 16.5 mg N /100g de muestra) la cual indica el buen estado de la muestra (Kirk y cols 1996). Esta prueba se corroboró con la prueba cualitativa de putrefacción que fue negativa en el total de muestras que se analizó. El rango del pH fue de 4.3 a 4.45 (tabla 5).

Día de muestreo	Nitrógeno volátil mg N/ 100g muestra	Prueba cualitativa de putrefacción	pH
1	7.43269078	negativa	4.39
	6.79657126	negativa	
	6.66934735	negativa	
1	5.1457755	negativa	4.35
	5.82285131	negativa	
	5.68743615	negativa	
1	6.79657126	negativa	4.45
	5.93899061	negativa	
	7.29314222	negativa	
1	8.95937764	negativa	4.44
	8.32375812	negativa	
	7.05101907	negativa	
7	10.8677362	negativa	4.40
	11.122184	negativa	
	14.0483339	negativa	
14	11.2494079	negativa	4.30
	11.1221840	negativa	
	12.0127514	negativa	

Continuación

Día de muestreo	Nitrógeno volátil mg N/ 100g muestra	Prueba cualitativa de putrefacción	pH
21	13.6666621	negativa	4.40
	13.9211099	negativa	
	13.4122143	negativa	
Máximo N volátil muestra	16.5	negativa	
	Cumple 100%	Cumple 100%	

Tabla 5.- Pruebas fisicoquímicas para determinar putrefacción en un ciclo de 21 días.

C) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la figura 15 se compararon las medias de la cuenta de mesofílicos aerobios referente al día 1 (2,2071.18 UFC/g), 7 (18,415 UFC/g), 14 (5,512.5 UFC/g), y 21 (2,625 UFC/g) en donde se observó que existe una disminución del 85.75% en este lapso.

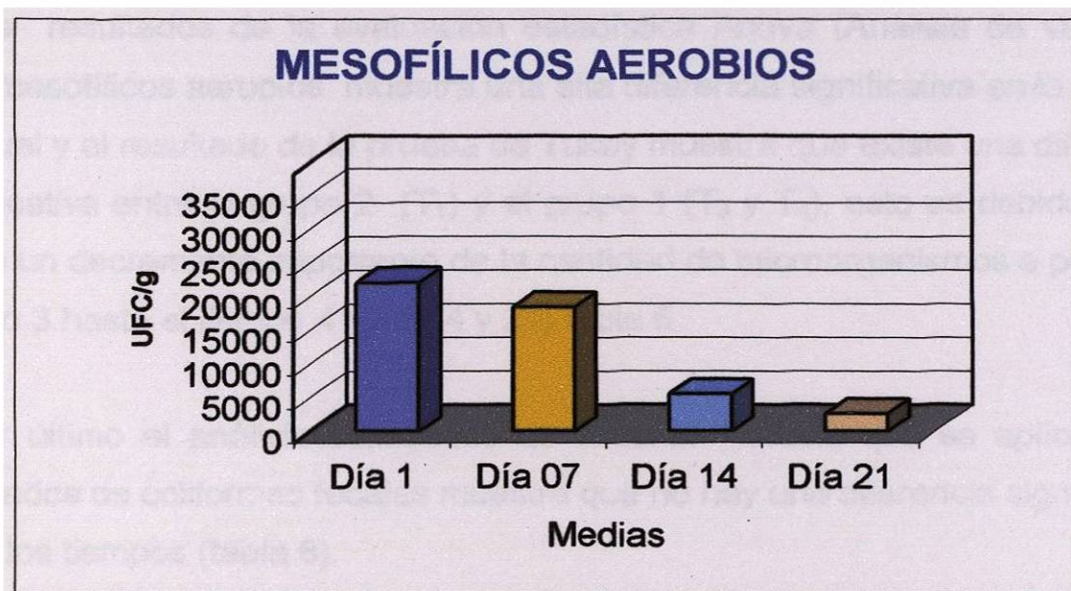


Fig. 15 Diferencias entre tiempos de almacén para mesofílicos aerobios

Con respecto a la comparación de medias de la cuenta de coliformes fecales del día 1 al 21 la disminución que se presentó fue de un 88.11% (fig. 16). En donde la media del día 1 fue de 146.65 UFC/g, del día 7, 31.75 UFC/g, el día 14, 32 UFC/g y para el día final fue de 29 UFC/g.

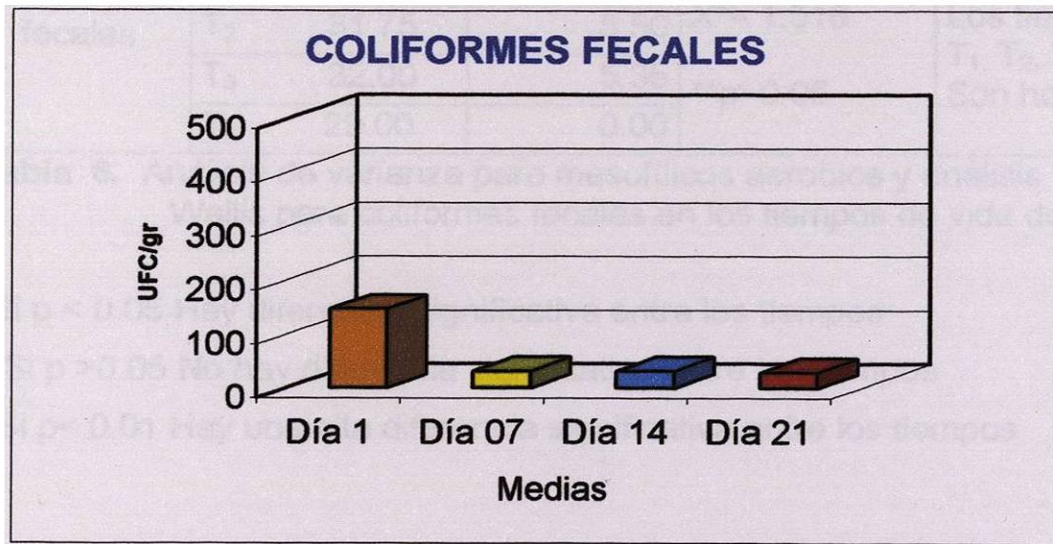


Fig. 16 Diferencias entre tiempos de almacén para coliformes fecales

Los resultados de la evaluación estadística Anova (Análisis de varianza) para mesofílicos aerobios muestra una alta diferencia significativa en la vida de anaquel y el resultado de la prueba de Tukey muestra que existe una diferencia significativa entre el grupo 2 (T_1) y el grupo 1 (T_3 y T_4), esto es debido a que existe un decremento importante de la cantidad de microorganismos a partir del tiempo 3 hasta el tiempo 4 (Día 14 y 21) tabla 6.

Por último el análisis estadístico de Kruskal - Wallis que se aplicó a los resultados de coliformes fecales muestra que no hay una diferencia significativa entre los tiempos (tabla 6).

	Media	D. Estándar		
Mesofílicos aerobios	T ₁ 22071.18	9491.66	F= 9.467 ·p< 0.01	G ₁ = T ₂ ,T ₃ ,T ₄ G ₂ = T ₁ ,T ₂
	T ₂ 13415.00	6794.61		
	T ₃ 5512.50	1931.76		
	T ₄ 2625.00	518.81		
Coliformes fecales	T ₁ 146.65	298.91	X ² = 1.516 **p>0.05	Los tiempos T ₁ , T ₂ , T ₃ y T ₄ Son homogéneos
	T ₂ 31.75	5.50		
	T ₃ 32.00	5.35		
	T ₄ 29.00	0.00		

Tabla 6. Análisis de varianza para mesofílicos aerobios y análisis Kruskal – Wallis para coliformes fecales en los tiempos de vida de anaquel

*Si $p < 0.05$ Hay diferencia significativa entre los tiempos

**Si $p > 0.05$ No hay diferencia significativa entre los tiempos

· Si $p < 0.01$ Hay una alta diferencia significativa entre los tiempos

DISCUSIÓN

En cuanto a la calidad bacteriológica de este nuevo producto a base de pollo y cocido en ácidos orgánicos, se buscó una norma que lo regulara al respecto; y se encontró la Norma Oficial mexicana NOM-093-SSAI-1994 Bienes y Servicios. Prácticas de Higiene y Sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. En el punto 1.1 se indica que ningún alimento preparado debe contener microorganismos patógenos del cual se deduce que este producto se encuentra dentro de la Norma en cuanto a los resultados que se obtuvieron para *Salmonella spp.* y *S. aureus.* ya que estos no se detectaron en las muestras.

Según Roberts (1981) la inhibición de *Salmonella spp.* se observa en ácido acético a un pH de 4.9 lo cual puede ser una posible causa de la ausencia en el total de muestras que se analizaron a lo largo del ciclo de vida del producto ya que este producto se "coció" en un tipo de ácido y el pH de la muestra se encontró en un rango de 4.30 a 4.45; a diferencia del estudio que se realizó en 1996 por Fernández y cols, en ceviche de pescado en donde aisló este microorganismo en un 2.5% de 8 muestras a pH 4.0, esto se debió posiblemente a una contaminación posterior a la elaboración, durante el transporte, exposición y venta pública ya que las muestras que se investigaron procedían de diversos sitios de venta y mientras que los que se analizaron en este estudio se obtuvieron directamente de la planta procesadora y en envase cerrado.

En lo que respecta a la ausencia de *S. aureus* en las muestras de ceviche de pollo según Roberts en 1981 menciona un posible control químico de la bacteria al observar que los estafilococos son relativamente sensibles a determinados ácidos como ácido acético (vinagre), cítrico, láctico entre otros; y estos dos primeros se encuentran en el producto que se analizó por lo cual es muy probable que estos dos factores evitaron el crecimiento y la presencia de este patógeno en las

muestras. Según este mismo autor (1981) esta bacteria se inhibe por el crecimiento de distintas bacterias como coliformes entre otras, las cuales también inhiben la producción de la enterotoxina que este microorganismo produce (Roberts. 1981), ya sea por competencia de nutrientes, cantidad de microorganismos en el sustrato, etc. Es importante añadir que las cuentas de coliformes totales varían en un rango de medias de 4,733.96 UFC/g el día 1 a 29 UFC/g el día 21. Por lo que creemos que estos microorganismos pudieron competir e inhibir el crecimiento de *S. aureus* desde el inicio del almacenamiento.

En cuanto a los indicadores microbianos como mesofílicos aerobios, coliformes totales y fecales no se encontró una normativa que indicara los límites permisibles en este tipo de alimento por lo que se observó en razón a la composición de las muestras que es similar a una ensalada cruda y se hizo la comparación de los resultados que se obtuvieron con el punto 1.2.3. de la Norma que anteriormente se cita y que habla acerca de la regulación para ensaladas verdes, crudas o frutas, a excepción de los coliformes totales ya que éstos no se especifican en este punto, por lo tanto los resultados que se obtuvieron del NMP de los mismos fue un paso anterior para obtener el NMP de coliformes fecales motivo por el cual se utilizó como referencia para valorar el producto que se analizó y se citan en las tabla 1, 2, 3, 4 de la sección de resultados.

Esta Norma indica como límite para mesofílicos aerobios en ensaladas crudas 150,000 UFC/g y se observó que del total de muestras que se analizó (29) en el ciclo de los 21 días, el 100% se encontró dentro del límite (tabla 1, 2, 3 y 4).

No fue así para la cuenta de coliformes fecales, en donde un 10% del total de las muestras rebasaron el límite establecido que es de 100 UFC/g.

Según Fernández E en el 2000, indica que la pérdida de frescura de un alimento se debe a la actividad de microorganismos, es decir un incremento en su

número y en donde excluye las causas físicas y químicas del deterioro; en cuanto al producto que se analizó éste sufrió una disminución en el número de mesofílicos del día inicial hasta el final en un 85.75%, lo que nos indica que no hubo una descomposición por este tipo de microorganismos ya sea posiblemente a la falta de oxígeno que inhibió el crecimiento de los mismos con relación al tiempo en que se analizó, o al pH que prevaleció en las muestras (4.3 – 4.4).

En un estudio realizado por Shamshad y cols en 1990, acerca de la vida de anaquel en el camarón a diversas temperaturas, se encontró que el almacenamiento de este producto a una temperatura elevada tienen un profundo efecto en la calidad del camarón reduciendo su vida de anaquel drásticamente, sin embargo las cuentas bacterianas solo se usaron como un indicador de sanidad, y no siempre indicaron pérdida de calidad o descomposición del producto, esto se vio reflejado en las muestras de ceviche de pollo ya que la temperatura de almacenamiento fue de 4 a 6°C durante toda su vida de anaquel lo cual no permitió el crecimiento de microorganismos sino que se pudo apreciar una disminución de éstos.

Este mismo autor expresa que la putrefacción de carne empacada al vacío, la gasificación de aceitunas y el sabor amargo en unos quesos, eventualmente se asocian con la actividad de los coliformes (su incremento) como ejemplo de su potencial para deteriorar los alimentos. De igual manera que en los mesofílicos aerobios, los coliformes totales también presentaron un decremento de un 88.11% lo cual está posiblemente asociado al pH de la muestra (3.0 y 4.5) ó a la temperatura de refrigeración de 4°C.

En cuanto a las pruebas fisicoquímicas que se le aplicaron a las muestras; la determinación de amonio en ellas a lo largo de la vida de anaquel se obtuvo como un promedio al día final (día 21) y fue de 13.66 mg N/ 100g muestra, si bien no existe una normativa para esta determinación se hizo con el objetivo de observar y

determinar el grado de alteración que presentaron las muestras a lo largo de su vida de anaquel. Para valorar el grado de alteración o aceptabilidad de los alimentos cárnicos se emplean métodos químicos, un ejemplo es la determinación del nitrógeno volátil total y los valores que se obtienen son aplicables a las carnes crudas como carne de res o de pescado y se pueden considerar en base a la descomposición o desaminación de las proteínas en donde 16.5 mg N/100g muestra es aceptable como límite para carne fresca de res (Pearson. 1998), así por lo tanto se deduce que la muestra no presentó químicamente alteración alguna ya que los resultados que se obtuvieron están por debajo de este límite (tabla 5).

Para corroborar la determinación de amonio se hizo la prueba cualitativa de putrefacción que se basa en la descomposición de los aminoácidos azufrados que se encuentran en las proteínas (Alanís G. y cols, 1994), en donde los resultados de las muestras que se analizaron fueron negativas, confirmando así el buen estado de conservación de las muestras.

Finalmente se midió el pH a las muestras para observar si existía cambios en este aspecto en las muestras el cual dio un rango de 4.30 a 4.45 durante la vida de anaquel sin modificación asociada al tiempo de muestreo o de almacenamiento.

CONCLUSIÓN

La presencia de *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* en ceviche de pollo en el total de muestras fue negativo, desde su empaclado hasta el final de su vida de anaquel.

La calidad microbiológica durante la vida de anaquel del producto, basada en el número de mesofílicos aerobios fue buena ya que éstos se encontraron muy por debajo de lo que marca la legislación para este tipo de microorganismos, mientras que para los coliformes fecales solo un 10% de las muestras no cumplió con la regulación.

La presencia de amonio y la prueba de putrefacción para determinar la vida de anaquel del producto determinó que éste se encontró en condiciones de consumo aceptables ya que no se observó descomposición cualitativa ó cuantitativamente.

Se puede concluir que el ceviche de pollo en estudio es un alimento microbiológicamente seguro y el análisis fisicoquímico determinó que su vida de anaquel programada a quince días, tiene un soporte de siete días mas en condiciones de refrigeración de 4 a 6°C.

LITERATURA CITADA

- Abdo P. Ml. 1994. **Estudio de algunos parámetros de calidad de harinas de pescado utilizadas en la nutrición del camarón blanco *Penaeus vannamei***. Tesis. Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Mty, N.L. pp 13
- Akira Y. M., J. Zawitowski. 2001. **Aplication of Rapid Dot Blot Immunoassay for Detection of *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* in Eggs, Poultry and Other Foods**. Applied Environmental Microbiology. **67(1):459-461**. <http://aem.asm.org/cgi>
- Akineden Ö., C. Annemüller., A. Hassan., C. Iämmler., W. Wolter., M. Zschök .2001. **Toxin genes and Other Characteristics of *S. aureus* Isolates from Milk of Cow with Mastitis**. Clin Diagnostic Lab Inm **8(5):959-64**. <http://cdli.asm.org/cgi/>
- Alanís G. MG., D. CL. García. 1994. **Prueba cualitativa de putrefacción**. Manual de Análisis de Alimentos. Monterrey N.L.
- Al- Mohizea IS., A S. Mashhadi., A. Fawwal., al- Shalhat. 1994. **Microbiological and shelf life assessment of chilled eviscerated whole chicken broilers in Saudi Arabia**. Br Poult, Sci, **35(4): 519-26**. <http://highwire.stanford.edu/>
- Carramiña J.J., J. Yangüela., D. Blanco., C .Rota., A. I. Agustín., A. Ariño., and A. Herrera.1997. ***Salmonella* incidence and distribution of serotypes throught out processing in a Spanish poultry slaughter house**. Journal of Food Protect. **60:1312-1317**
- Castillo A. A., U. MG. Salas., P.ML. Marquéz., H. MD. Ososrio. 1993. **Incidence of *Campylobacter spp.* and *Salmonella spp.* in raw an roasted chicken in Guadalajara, México**. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. **35(4):371-5**
- Chang Y. H. 2000. **Prevalence of *Salmonella spp.* in poultry broilers and shell eggs in Korea**. Journal of Food Protect. **63,5: 655-658**
- De Almeida F. E. , N. Filho. 2000. **Ocurrence of *S. aureus* in frescal type cheese**. Rey Saude Publica, **34(6); 578-80**. Abstract. <http://highwire.stanford.edu>
- Dergal B. S. 1994. **Química de los Alimentos**. 1ª Reimpresión. De Alambra. pp 173-174, 442

- NOM-092-SSA1-1994. **Método para cuenta de bacterias aerobias en placa.**
- NOM-093-SSA1-1994. **Bienes y Servicios. Prácticas de Higiene y Sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos.**
- NOM-114-SSA1-1994. **Determinación de *Salmonella spp* en alimentos.**
- Fernández E. E., V. MR. Torres. 1996. **Contamination of fish ceviche by *Salmonella* in Guadalajara, Jalisco, Mexico.** Bol Oficina Saint Panam **120(3):198-203** www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi
- Fernández E. E. 2000. **Microbiología e inocuidad de los Alimentos.** Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. 28, 32,33
- Fernández S. S/A. **Análisis de Alimentos.** 2ª Edición. Acribia. 82
- Ferretti R., I. Mannazzo., L. Cocolin., G. Comi., F. Clementi. 2001. **Twelve-Hour PCR- Based Method for Detection of *Salmonella spp.* in Food.** Appl. Environ. Microbiol. Abstract. **67(2): 977-978.** <http://aem.asm.org/cgi/>
- Go X., J. Chen., R. L. Beuchat., E. R. Brackett. 2000. **PCR Detection of *S. enterica* Serotype *Montevideo* in and on Raw Tomatoes Using Primers Derived from hil A.** Appl. Environ. Microbiol. Abstract **66(12):5248-5252.** <http://aem.asm.org/cgi/>
- Go X., J. Chen., E. R. Brackett., R. L. Beuchat. 2001. **Survival of *Salmonella* in Tomato Plants from the Time of Inoculation at Flowering and Early Stages of Fruit Development Through Fruit Ripening.** Appl. Environ. Microbiol. Abstract **67(10):4760-4764.** <http://aem.asm.org/cgi/>
- Gutiérrez C. L., B. C. González., C. Giono., L. G. Beltrán. 1994. **Principales serotipos de *Salmonella* Identificados en 10703 cepas en México entre 1982 y 1993.** Rev. Lat.-Amer. Microbiol **36:221-226**
- Hart F. L., H. J. Fisher. 1991. **Análisis Moderno de los Alimentos.** 2ª Reimpresión. Ed Acribia, Zaragoza. 199
- Hentschel S., D. Kusch., H. J. Sinell. 1979. ***S. aureus* in poultry biochemical characteristics, antibiotic resistance and phage pattern.** Zentral |b| Bakteriol (B) **168(5-6):546-61.** <http://highwire.stanford.edu/medline/>
- Hogue T.A., D. E. Edel., L. A. Thomas., W. Schlosser., N. Bufano., and K. Ferris. 1997. **Survey of *Salmonella enteritidis* in unpasteurized liquid egg and spent hens at slaughter.** Journal of Food Protect. **60, 10:1194-1200**

- Jones TF., ME. Kellum., SS. Porter., M. Bell., W. Schaffner. 2002. **An Outbreak of Community Acquired Foodborne Illness Caused by Methicillin Resistant *S. aureus***. Emerg. Infect. Dis, 8(1):8-4. <http://highwire.stanford.edu/medline/>
- King C. J., E. R Black., P. M. Doyle., L. K. Fritsche., H. B. Halbrook., A. O. Levander., Meydani N. S., Walker W. A., Woteki E. C. 2000. **Foodborne Illnes and Nutritional Status: A Statement from an American Society for Nutritional Sciences Working Group**. Journal of Nutrition. 130, 2613-2617. <http://www.nutrition.org/cgi/>
- Knabel S.J. 1999. **Enfermedades transmitidas a través de los alimentos: Papel que juegan las prácticas usadas en el manejo de los alimentos en el hogar**. Institute of Food Technologists. <http://worldfoodscience.org/ciencia/hogar.html>
- Pearson D. 1998. **Técnicas de Laboratorio Para el Análisis de Alimentos**. 3ª Reimpresión. Ed Acribia, Zaragoza. pp. 180-183.
- Potter N. N. 1973. **La Ciencia de los Alimentos**. 1ª Edición . Edutex. pp. 149
- Proyecto de Norma NOM-112-SSA1-1994. **Determinación de Bacterias Coliformes NMP**.
- Proyecto de NOM-143-SSA1-1996. **Determinación de Cuenta de Organismos Coliformes Fecales por el NMP (Presuntiva de E. Coli) en Alimentos**.
- Rasooly L., NR. Rose., DB. Shah., A. Rasooly. 1997. **In vitro assay of *S. aureus* enterotoxin A activity in food**. Appl Environ Microbiol 63(6):2361-2365. <http://aem.asm.org/cgi/>
- Roberts R. H. 1981. **Sanidad Alimentaria**. 1ª Edición Acribia. pp. 19, 20, 38.
- Shamshad S. I., M. Kher-Un-Nisa., M. Riaz., R. Zuberi., RB. Qadri. 1990. **Shelf Life of Shrimp (*Penaeus merguensis*) Stored at Different Temperatures**. Journal of Food Science. 55, 05:1201-1205
- Shimizu A., M. Fujita., I. Igarashi., M. Takagi., N. Nagase., A. Sasaki., J. Kawano. 2000. **Characterization of *S. aureus* coagulase Type VII Isolates from Staphylococcal Food Poisoning Outbreak (1980-1995) in Tokyo, Japan by Pulsed- Field Gel Electrophoresis**. J Clin Microbiol. 38(10):3746-49. <http://jcm.asm.org/cgi>

- Smittle R. B. 2000. **Microbiological safety of mayonnaise, salad dressings and sauces produced in the U.S: a review.** J. Food Protect. **63(8):1144-1153**
<http://highwire.stanford.edu>
- Tapia S. M. 1996. **Efecto de harinas de pescado con diferente score biotóxico sobre el crecimiento y sobrevivencia del camarón blanco *Penaeus vannamei*.** Tesis. Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Mty, N. L. pp53
- Viswanathan P., R. Kaur. 2001. **Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts.** Int J Hyg Environ Health. **203(3):205-13**
www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi

