

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



DETERMINACION DE LA BIOCONSERVACION DEL *Lactobacillus acidophilus*
SOBRE *Salmonella spp.* UTILIZANDO SUSTRATO DE CARNE DE RES.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

MELVIN RAYMUNDO GARCIA HERNANDEZ
ROSME VANESSA SANDOVAL BONILLA

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO/A EN QUIMICA Y FARMACIA

DICIEMBRE, 2015

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR INTERINO

LIC. JOSE LUIS ARGUETA ANTILLON

SECRETARIA GENERAL INTERNA

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

MAe. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

COMITÉ DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MAe. Ena Edith Herrera Salazar

TRIBUNAL CALIFICADOR

COORDINADOR DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS Y COSMETICOS

MSc. Rocío Ruano de Sandoval

DOCENTE ASESORA

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos

DEDICATORIA

A MI DIOS PADRE ya que sin la ayuda y la protección de El no estaría logrando este triunfo, porque me ha guardado de todo peligro y me ha acobijado con sus manos de amor, por el conocimiento, entendimiento y sabiduría. Gracias Padre.

A MI VIRGEN MADRE sin su intersección y el amor de madre que me protege día a día y está conmigo siempre.

A MI MADRE MARIA EUGENIA BONILLA este triunfo se lo debo a usted que con sus palabras sabias, consejos, regaños, amor y alegrías ha formado la mujer que soy ahora, siempre orientándome por el camino del bien y ayudándome a tomar las decisiones correctas, sin usted mami mi vida no tuviera sentido y este titulo va para usted por ser una madre abnegada, linda, llena de amor porque jamás me dejo sola, porque desde el kínder hasta la universidad usted siempre me acompaño y ahora puedo decir lo logramos mami. La amo.

A MI HERMANA porque si se puede lograr todo lo que uno se propone, porque siempre me diste palabras claves que me hicieron reflexionar.

A DON CARLOS ERNESTO LEIVA por ser el apoyo de nuestra familia, porque nos a acompañado en todo momento y siempre quiere lo mejor para nosotras.

A MI BORIS ERNESTO ROMERO porque usted fue mi apoyo en estos últimos años de mi carrera y lo seguirá siendo, siempre me da palabras de animo y esta para mi cuando lo necesito y dentro de poco usted estará logrando este triunfo también y yo estare a su lado siempre. Te amo

A MI MADRINA ya que por sus consejos y palabras lindas seguir el camino correcto por ser tan llena de amor para nosotras y porque cuando viajaba usted me dió la mano.

ROSME VANESSA SANDOVAL BONILLA

AGRADECIMIENTOS

A Dios omnipotente gracias Padre porque a pesar que yo renegué mucho usted siempre tenia la respuesta para mi y siempre estare agradecida por todo lo bueno que me das por cada cosa maravillosa que haces en mi vida usted es mi maestro a quien yo seguire sus pasos, Amén.

A Maria Virgen y Madre te doy las gracias Virgen santísima por el amor que me das, porque siempre estas a mi lado aunque mi ojos no te puedan ver, gracias Madre.

A MI MAMI gracias mami por todo lo lindo que usted hace por mi, por amarme por permitirme venir al mundo y estar aquí a su lado por ser mi apoyo siempre por todo su apoyo mami las palabras no son lo suficiente como para expresar lo agradecida que estoy con Dios por darme tan maravillosa Madre gracias Mami.

A Don Carlos Ernesto Leiva por el apoyo en todo momento a nosotras gracias por estar siempre diepuesto a ayudar gracias Don Carlos.

A mi Hermana gracias por todos tus enojos, alegrías y palabras que me diste hasta en el último día ...anda a acostarte ya... y por preocuparte por mi gracias hermanita te quiero mucho.

A mi novio Boris Ernesto Romero gracias amor por apoyarme, por estar a mi lado, por aguantarme en mis días estresantes pero siempre está conmigo ayudándome, gracias amor.

A MI DOCENTE ASESOR gracias MSc. Evelin por tan grande apoyo, por compartir sus conocimientos y estar en la disposición de ayudarnos siempre.

A MIS DOCENTES COORDINADORES gracias por escucharnos y aconsejarnos a lo largo de este trayecto.

A MI COMPAÑERO DE TESIS porque a pesar de todo aquí estamos escribiendo las ultimas líneas de nuestra tesis y podemos decir LO LOGRAMOS!!!

AL LABORATORIO DE CENSALUD por prestarnos las instalaciones y permitirnos trabajar ahí.

A los que siempre creyeron en mi y a mis Docentes por compartir sus palabras de conocimiento conmigo gracias.

ROSME VANESSA SANDOVAL BONILLA

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso que siempre ha estado conmigo dándome sabiduría, fuerza, paciencia e inteligencia para salir día a día adelante, que me supo guiar y me ayudo a superar cada obstáculo y dificultad que se presentó a lo largo de mi carrera y ahora me permite culminarla con éxito.

A nuestra madre María por cuidarme y darme fuerza y sabiduría en cada decisión tomada y por brindarme aliento en los momentos difíciles en mi vida.

A mis padres y hermanos, les agradezco por el amor que me han brindado en toda mi vida, por su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera y la confianza que depositaron en mí al saber que culminaría mi carrera con éxito a pesar de lo difícil que se miraba llegar a esa gran meta.

A mi docente director MSc. María Evelin Sánchez de Ramos por su paciencia, dedicación y orientación para llevar a cabo la realización del trabajo de graduación.

A SANDRA MICHELLE AZAHAR LAM por su comprensión, paciencia y apoyo incondicional en los últimos dos años de la carrera.

Al Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) por haberme facilitado sus instalaciones para hacer posible la parte práctica de esta investigación.

A mis amigos y compañeros, por todos los momentos inolvidables que compartimos en todo este tiempo.

Y a mi compañera de Trabajo de Graduación, gracias por ser mi compañera de estudios, ser paciente conmigo y por tu amistad.

MELVIN RAYMUNDO GARCIA HERNANDEZ

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio

A mi Madre : HERLA MIRIAN HERNANDEZ DE GARCIA, por brindarme todo tú apoyo, comprensión y cariño durante mis años de estudio, te lo dedico mamá por sacrificarte tanto por sacarme adelante.

A mi Padre: FROILAN GARCIA SANCHEZ, por brindarme todo tú apoyo, comprensión, por tus sabios consejos que siempre me mostraron lo difícil que puede ser la vida y lo correcto que debemos ser en nuestros actos.

A toda mi familia: por los buenos momentos sus muestras de cariño y apoyo incondicional siempre.

A todos los docentes, personal administrativo, compañeros y amigos que siempre me apoyaron.

A todas las personas que durante el transcurso de mi carrera tuvieron buenos consejos para mí.

MELVIN RAYMUNDO GARCIA HERNANDEZ

INDICE

Capítulo I	
1.0 Introducción	xi
Capítulo II	15
2.0 Objetivos	16
Capítulo III	17
3.0 Marco Teórico	18
3.1 Microbiología de la carne	18
3.1.1 Alteraciones	20
3.1.2 Composición de la carne	21
3.1.3 Empacado de productos cárnicos	24
3.2 Salmonella spp. Microorganismo patógeno contaminante de la carne de res.	24
3.2.1 Taxonomía	24
3.2.2 Hábitat	25
3.2.3 Definición	25
3.2.4 Características de las colonias	25
3.2.5 Epidemiología	26
3.2.6 Síndromes clínicos	26
3.2.7 Diagnóstico de Laboratorio	27
3.2.8 Tratamiento	27
3.2.9 Profilaxis	28
3.2.10 Parámetros de crecimiento	28
3.3 Bacterias ácido lácticas	28
3.3.1 Características de las bacterias ácido lácticas	29
3.3.2 El género Lactobacillus	30
3.3.3 Nutrición y condiciones de crecimiento	32

3.3.4 Condiciones ecológicas	33
3.3.5 Necesidades de oxígeno	33
3.3.6 Temperatura de crecimiento	34
3.3.7 Metabolismo	34
3.3.8 Sensibilidad a antibióticos y drogas	35
3.3.9 Patogenicidad	35
3.3.10 Hábitat	36
3.4 Bioconservación de los alimentos	36
3.4.1 Función de las bacterias ácido lácticas y sus metabolitos en la bioconservacion	39
3.4.2 Bacterias ácido Lácticas	39
3.4.3 Compuestos protéicos	41
3.4.4 Metabolitos del oxigeno	41
3.4.5 Bacteriocinas	42
Capítulo IV	44
4.0 Diseño metodológico	45
4.1 Tipo de estudio	45
4.2 Investigación bibliográfica	45
4.3 Investigación de campo	46
4.4 Estudio preliminar	47
4.5 Procedimiento para el muestreo	47
4.5.1 Determinación del número de supermercados	47
4.5.2 Determinación y selección de la muestra	48
4.6 Identificación de la muestra	49
4.7 Transporte de la muestra	49
4.8 Parte experimental	49
4.8.1 Procedimiento general para comprobar la presencia o ausencia de Salmonella spp.	49

4.8.2	Identificación de <i>Salmonella spp</i>	50
4.8.3	Estandarización de la bacteria patógena <i>Salmonella spp.</i>	53
4.8.4	Preparación de la concentración de <i>Lactobacillus acidop.</i>	53
4.8.5	Inoculación de la carne de res (chuleta) con el probiótico <i>Lactobacillus acidop.</i> y la bacteria patógena <i>Salmonella spp</i>	54
4.8.6	Recuento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> en Muestra de carne de res (chuleta)	55
4.8.7	Medición de pH	56
4.8.8	Determinación de color	57
Capítulo V		58
5.0	Resultados	59
Capítulo VI		92
6.0	Conclusiones	93
Capítulo VII		96
7.0	Recomendaciones	97
	Bibliografía	
	Glosario	
	Anexos	

INDICE ANEXOS

ANEXO N°

1. Mapa del distrito dos área dos de la zona metropolitana de San Salvador
2. Código de supermercados
3. Etiqueta para la identificación de carne de res (chuleta) a muestrear.
4. Flujograma para la determinación de *Salmonella spp*
5. Procedimiento general para la preparación de muestras
6. Identificación de *Salmonella spp*
7. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Salmonella spp*
8. Estandarización de la bacteria patógena *Salmonella spp*
9. Preparación de la concentración de *Lactobacillus acidophilus*
10. Conteo de bacterias ácido lácticas
11. Inoculación de la carne de res (chuleta) con el probiótico *Lactobacillus acidophilus*
12. Ejemplo de realización de pesadas para cada muestra
13. Recuento de *Lactobacillus acidophilus*
14. Medición de pH
15. Criterios microbiológicos, Reglamento Tecnico Centroamericano RTCA 67:04:50:08. Alimentos, criterios microbiológicos para la Inocuidad de alimentos.
16. Resultados de primer ensayo
17. Resultados de segundo ensayo
18. Resultados de tercer ensayo
19. Galeria de fotos del trabajo en el laboratorio
20. Certificado de calidad de *Lactobacillus acidophilus*

INDICE DE TABLAS

TABLA N°		PAG.
1.	Lista de supermercados del Distrito Dos del área metropolitana de San Salvador.	49
2.	Cantidad de muestra que se tomó por supermercado	50
3.	Resultado del análisis microbiológico a la carne de res (chuleta), presencia o ausencia de <i>Salmonella spp.</i>	61
4.	Resultados del aislamiento e identificación de <i>Salmonella spp</i>	63
5.	Resultados de la estandarización de <i>Salmonella spp</i>	64
6.	Resultados de la estandarización de la suspensión de <i>Lactobacillus acidophilus</i> por espectrometría	65
7.	Resultados del recuento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> a las concentraciones 10^3 y 10^5 UFC/mL	66
8.	Resultado de la presencia o ausencia de <i>Salmonella spp</i> en las muestras de carne de res (chuleta) inoculadas con <i>Salmonella spp</i>	67
9.	Resultados de la determinación de pH	68
10.	Resultados de las características organolépticas (color) concentración 10^3 UFC/mL de la carne de res (chuleta)	70
11.	Resultados de las características organolépticas (color) concentración 10^5 UFC/mL	71
12.	Resultado del análisis microbiológico a la carne de res (chuleta) presencia o ausencia de <i>Salmonella spp</i>	73
13.	Resultados del aislamiento e identificación de <i>Salmonella.</i>	74

14.	Resultados de la estandarización de <i>Salmonella spp.</i> que contiene la carne de res (chuleta)	75
15.	Resultados de la estandarización de <i>Lactobacillus acidophillus</i> a las concentraciones 10 ⁶ y 10 ⁷ UFC/mL	77
16.	Resultados del recuento de <i>Lactobacillus acidophillus</i> a concentraciones 10 ⁶ y 10 ⁷ UFC/mL.	77
17.	Resultado de la presencia o ausencia de <i>Salmonella spp</i> las en las muestras de carne de res (chuleta).	79
18.	Resultados de la determinación de pH	81
19.	Resultados de las características organolépticas (color) concentración 10 ⁶ UFC/mL	82
20.	Resultados de las características organolépticas (color) concentración 10 ⁷ UFC/mL	83
21.	Resultado del análisis microbiológico a la carne de res (chuleta) presencia o ausencia de <i>Salmonella spp</i>	84
22.	Resultados del aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i>	86
23.	Resultados de la estandarización de <i>Salmonella spp</i> que contiene la carne de res (chuleta)	87
24.	Resultados del recuento de <i>Lactobacillus acidophillus</i> a las concentraciones 10 ⁶ y 10 ⁷ UFC/mL	88
25.	Resultado de la presencia o ausencia de <i>Salmonella spp</i> en las muestras de carne de res (chuleta)	90
26.	Resultados de la determinación de pH	92
27.	Resultados de las características organolépticas (color) de las concentraciones 10 ⁶ y 10 ⁷ UFC/mL.	94
28.	Resumen de resultados del primer ensayo	95
29.	Resumen de resultados del segundo ensayo.	96
30.	Resumen de resultados del tercer ensayo	97

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°		PAG
1	Resultado del análisis microbiológico realizado a la carne de res (chuleta), para comprobar presencia o ausencia de <i>Salmonella Spp</i> .	67
2	Resultados del aislamiento e identificación de <i>Salmonella spp</i> , del análisis microbiológico realizado a la carne de res (chuleta).	68
3	Resultado de la comparación del recuento de las concentraciones 10^3 y 10^5 de <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	71
4	Resultado de la comparación del recuento de la presencia o ausencia de <i>Salmonella spp</i> en las muestras de carne de res (chuleta).	72
5	Resultado de la comparación de los resultados de pH de las concentraciones 10^3 y 10^5 .	73
6	Resultados de determinación de color de concentración 10^3 .	74
7	Resultados de las características organolépticas (color) a la concentración 10^5 .	75
8	Resultado del análisis microbiológico realizado a la carne de res (chuleta), para comprobar presencia o ausencia de <i>Salmonella spp</i> .	77
9	Resultado del análisis microbiológico realizado a la carne de res (chuleta), para comprobar presencia o ausencia de <i>Salmonella spp</i> .	78
10	Resultados del recuento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> a las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL.	81
11	Resultado de la comparación del recuento de la presencia o ausencia de <i>Salmonella spp</i> en las muestras de carne de res (chuleta).	82
12	Resultados de pH de las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL	84
13	Resultados de las características organolépticas (color) a la concentración 10^6 .	85

14	Gráfico de resultados de las características organolépticas (color) a la concentración 10^7 .	86
15	Resultado del análisis microbiológico realizado a la carne de res (chuleta), para comprobar presencia o ausencia de <i>Salmonella spp.</i>	87
16	Resultados del aislamiento e identificación de <i>Salmonella spp.</i> , del análisis microbiológico realizado a la carne de res (chuleta).	89
17	Resultados del recuento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> a las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL en las muestras de carne de res (chuleta).	91
18	Resultados del recuento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> a las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL en las muestras de carne de res (chuleta).	92
19	Resultado de la comparación de los resultados de pH de las concentraciones 10^6 y 10^7 .	93
20	Resultados de las características organolépticas (color) de las concentraciones 10^6 y 10^7 .	94

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	PAG.
1. Lista de supermercados del Distrito Dos del área metropolitana de San Salvador.	47
2. Número de supermercados	48
3. Cantidad de muestra que se tomó por supermercado	48

RESUMEN

En El Salvador muchas de las empresas de productos cárnicos le adicionan conservantes de origen químico con el fin de prolongar el tiempo de vida en anaquel, dichos conservantes se han estudiado y determinado que el consumo excesivo de carnes que contienen algún tipo de estos conservantes químicos podrían generar complicaciones severas en la población que los consume.

Además, existen muchos factores dentro de los supermercados, por ejemplo la temperatura y las distintas formas de almacenamiento, que ponen en decremento la calidad de la carne de res (chuleta) en anaquel permitiendo así el desarrollo de microorganismos patógenos.

Por lo que el interés científico de ésta investigación, fue proponer una forma más natural para la conservación de la carnes de res (chuleta) a través del método de bioconservación, que consiste en la aplicación de bacterias ácido lácticas, que junto con el uso de refrigeración, consigue aumentar la vida útil e inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos.

Se determinó la bioconservación de carne de res (chuleta) con *Lactobacillus acidophilus* sobre *Salmonella spp.* utilizando muestras de supermercado del área dos, distrito dos de la zona metropolitana de San Salvador. Se realizaron tres ensayos microbiológicos a las muestras de carne de res (chuleta), variando condiciones de temperatura y concentración del *Lactobacillus acidophilus* y *Salmonella spp.* Monitoreando cada 24, 48, 72 horas 8 y 15 días, la presencia o ausencia de *Salmonella spp.*, recuento de *Lactobacillus acidophilus*, y determinando el color y pH de las muestras de carne de res inoculadas.

Los resultados microbiológicos de los ensayos demostraron que las concentraciones 10^6 UFC/g y 10^7 UFC/g de *Lactobacillus acidophilus* lograron

inhibir el crecimiento de *Salmonella spp* 10^5 UFC/g, y la temperatura óptima para que el *Lactobacillus acidophilus* 10^6 UFC/g ejerza su efecto bioconservador es entre 0 a 4 °C (congelación) y para la concentración 10^7 UFC/g de *Lactobacillus acidophilus* es entre 4 a 8 °C (refrigeración).

Por lo que la bioconservación es un método que puede ser utilizado para disminuir el número de bacterias patógenas en la carne de res y se recomienda promover el uso de bacterias ácido lácticas como cultivo bioprotector para extender la vida útil de la carne de res fresca y seguridad microbiológica en la conservación de la carne comercial y sustituir los conservantes químicos.

Los diferentes análisis microbiológicos fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), de la Universidad de El Salvador en el periodo de Julio a Noviembre del presente año.

ABREVIATURAS

Agar EMB: Agar con Eosina y Azul de Metilo

Agar SS: Agar *Salmonella- Shiguella*

Agar XLD: Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

ETAS: Enfermedades transmitidas por alimentos

H₂S: Sulfuro de hidrógeno

Mb: Mioglobina

RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias por mililitro

CAPITULO I
INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

La carne de res por su contenido nutricional y su alto contenido de humedad, está considerada dentro del grupo de los alimentos altamente perecederos; sin embargo, de acuerdo a sus características particulares, el tipo de microorganismos presentes puede variar.

Los microorganismos que alteran la carne pueden tener acceso a la misma por infección del animal vivo (infección endógena) o por contaminación de la carne postmortem (infección exógena). Aunque ambas son de gran importancia, la alteración de la carne a consecuencia de la contaminación exógena es la más frecuente, así, el hombre puede sufrir graves infecciones o intoxicaciones por el consumo de carne procedente de animales sanos. Uno de los microorganismos patógenos no deseables que se puede desarrollar en la carne de res fresca por contaminación exógena y que es uno de los responsables de enfermedades gastrointestinales en el hombre es *Salmonella spp.*

La conservación se define generalmente como el método empleado para preservar un estado existente o para prevenir posibles daños debidos a la acción de agentes químicos (oxidación), físicos (temperatura y luz) o biológicos (microorganismos), pero las empresas están abusando de los conservantes químicos como lo son nitritos, nitratos, sulfitos y bisulfitos, estos conservantes tienen una cantidad límite para ser utilizada. Por lo que el uso prolongado de estos conservantes químicos puede causar enfermedades graves a los consumidores.

Actualmente existen varios métodos muchos más viables y naturales para controlar los microorganismos patógenos y alterantes de la carne de res, pero uno de los métodos que ha tomado mayor relevancia en los últimos años es la

bioconservación de alimentos que consiste en la aplicación de bacterias ácido lácticas que junto con el uso de la refrigeración, consiguen aumentar la vida útil mediante la producción de ácido láctico y compuestos secundarios que inhiben el crecimiento de un microorganismo patógeno, así se puede garantizar la calidad sanitaria de la carne de res fresca.

Esta investigación se realizó en el área dos, distrito dos de la zona metropolitana de San Salvador, en el que están presentes ocho supermercados de distintas cadenas comerciales que será nuestro universo por lo que a criterio de los autores se tomarán los ocho supermercados teniendo como referencia que estadísticamente cuando el universo es menor de treinta se muestrea en su totalidad.

Se realizó un muestreo decisional a los ocho supermercados y se elegieron dos muestras que fueron dos bandejas de carne de res (chuleta) cruda, por cada supermercado, dispensadas en anaquel de fácil acceso para los consumidores que se encontraron en bandejas desechables de durapax sin papel absorbente y cubiertas con plástico para cubrir bandejas, cada bandeja contiene tres chuletas de carne de res cruda con un peso aproximado de una libra, siendo un total de dieciséis bandejas de carne de res (chuleta) cruda a analizar.

A las muestras se les realizó el siguiente tratamiento: por cada muestra de supermercado (dos bandejas) se cortaron cuarenta y dos porciones de 25 gramos cada una, siendo 336 porciones en total de todas las muestras de los supermercados, a los que se les determinó inicialmente presencia o ausencia de *Salmonella spp*, seguidamente se aislaron e identificaron y estandarizaron a las concentraciones 10^3 y 10^5 UFC/mL, de la bacteria *Salmonella spp*. presentes en las muestras analizadas.

Luego se estandarizó el *Lactobacillus acidophilus* y *Salmonella spp.*, a las concentraciones de 10^3 y 10^5 UFC/mL, se inocularon con el *Lactobacillus acidophilus* y *Salmonella spp* la porción de 25 gramos de carne de res (chuleta) cruda y se realizaron conteos de *Lactobacillus acidophilus*, presencia o ausencia de *Salmonella spp*, y se verificó el pH y color a las 24hr, 48hr, 72hr, 8 y 15 días, todo esto para determinar la bioconservación del *Lactobacillus acidophilus* sobre *Salmonella spp.* utilizando sustrato de carne de res (chuleta). Se compararon los resultados con el Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08 (Alimentos, criterios microbiológicos para inocuidad de los alimentos) que en el grupo 8, subgrupo 8.1.1 productos cárnicos diferentes al pollo tiene como requerimiento ausencia de *Salmonella spp.* El desarrollo práctico de esta investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador en los meses de Julio a Noviembre del año 2015.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la bioconservación del *Lactobacillus acidophilus* sobre *Salmonella spp.* utilizando sustrato de carne de res.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Comprobar la ausencia o presencia de *Salmonella spp.* en carne de res (Chuleta).
- 2.2.2 Aislar, identificar y estandarizar a 10^3 y 10^5 UFC/mL la bacteria *Salmonella spp.*
- 2.2.3 Adicionar a la carne de res (chuleta), *Lactobacillus acidophilus* previamente estandarizado a las concentraciones 10^3 y 10^5 UFC/mL, realizar conteos a 24, 48, 72 horas 8 y 15 días.
- 2.2.4 Inocular *Salmonella spp.* en la carne de res (chuleta), incubar por 24, 48,72 horas 8 y 15 días realizando identificación de la cepa patógena, (presencia o ausencia).
- 2.2.5 Determinar pH y el tiempo de vida en anaquel de la carne de res (chuleta).

CAPITULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 MICROBIOLOGIA DE LA CARNE ^{(9),(14),(19)}

La carne es la parte comestible de los músculos estriado esquelético (incluido el tejido conectivo) de animales sacrificados en condiciones higiénicas y humanitarias, proveniente de bovinos, ovinos, porcinos, caprinos y équidos, y se aplica también a animales de corral, de caza, de pelo y plumas, y algunos mamíferos marinos declarados aptos para el consumo humano. Otra definición es todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin. Además conocen también otros significados como:

Carne cruda: Carne fresca, picada o separada mecánicamente.

Carne fresca: Carne que, aparte de haber sido refrigerada, no ha recibido, a los efectos de su conservación, otro tratamiento que el envasado protector y que conserva sus características naturales.

La masa interna de la carne no contiene microorganismos o éstos son escasos, aun cuando eventualmente se han encontrado gérmenes en los nódulos linfáticos, médula ósea e incluso en el mismo músculo. En los linfonodos de los animales de carnes rojas se han aislado estafilococos, estreptococos, Clostridium y Salmonella. Sin embargo, la contaminación más importante es de origen externo y se produce durante el desangrado, desuello y cuarteado, los microorganismos proceden principalmente de las partes externas del animal (piel, pezuña y pelo) y del tracto intestinal.

Los métodos humanitarios de sacrificio aprobados, ya sean mecánico, químicos o eléctricos, dan lugar a una contaminación que debe controlarse mediante buenas prácticas, habilidad y rapidez durante esta fase del proceso. En la

superficie externa del animal, además de su flora natural existe un gran número de especies de microorganismos provenientes del suelo, agua, piensos y estiércol, mientras que el intestino contiene los microorganismos propios de esta parte del aparato digestivo. Los cuchillos, paños, aire, manos y ropa del personal pueden actuar como vehículos de contaminación. Durante la manipulación posterior de la carne puede haber recontaminación, a partir de las carretillas de transporte, cajas u otros recipientes, así como de otras carnes contaminadas, del aire y del personal. Durante el procesamiento de productos elaborados con carne, ciertas máquinas como picadoras, embutidoras y otras, pueden aportar microorganismos perjudiciales en cantidades importantes y lo mismo puede suceder con algunos ingredientes de productos especiales, como son los rellenos y especias.

Los microorganismos que alteran la carne pueden tener acceso a la misma por infección del animal vivo (*infección endógena*) o por contaminación de la carne postmortem (*infección exógena*).

También es importante que los niveles de glucógeno en los músculos de la canal sean los más altos posibles, con el fin de desarrollar la máxima cantidad de ácido láctico en la carne. Este ácido le da a la carne un pH ideal medido 24 horas después del sacrificio de 6,2 o menos.

El ácido láctico en el músculo tiene el efecto de retardar el desarrollo de bacterias que contaminan la canal durante el sacrificio y el faenado. Estas bacterias deterioran la carne durante su almacenamiento, especialmente en ambientes cálidos y la carne desarrolla olores desagradables, cambios de color y rancidez.

Fuentes de contaminación de la carne de res:

- Salud de los animales.
- Ambiente.
- Transporte.
- Utensilios.
- Procesado.
- Ser humano.

3.1.1 ALTERACIONES (9)(14)(19)(21)

Debido a la gran variedad de fuentes de contaminación, los tipos de microorganismos que suelen encontrarse en la carne son muchos. Son especialmente importantes las especies de los géneros fúngicos *Cladosporium*, *Sporotrichum*, *Geotrichum*, *Thamnidium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Monilia*. A menudo se encuentran levaduras, especialmente las no esporuladas. Entre las muchas bacterias que pueden hallarse, las más importantes son las del género *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Salmonellas* y *Streptomyces*.

Las alteraciones en carne fresca suelen determinarse por un olor anormal y la aparición en la superficie de mucosidad, producidas por bacterias principalmente: *Pseudomonas*, *Aerobacter* y *Alcalígenes*.

Estos defectos son debidos a cambios bioquímicos de los aminoácidos libres, nucleótidos y peptonas de la sangre que los microorganismos metabolizan produciendo ácido sulfhídrico, amoníaco, indol, cadaverina y otras sustancias de mal olor y consistencia viscosa característica.

El pigmento es descompuesto debido al oxígeno del aire, la lipólisis y la presencia de compuestos flavínicos.

Ejemplo de alteraciones:

- Olor anormal, generalmente debido a bacterias aerobias en la superficie de la carne.
- Aparición de mohos en la superficie con aspecto inicial de manchas.
- Deterioro profundo por acción de microorganismos anaerobios facultativos.
- Decoloración causada por alteraciones de la mioglobina o del pigmento muscular.
- Cambio de color
- Producción de limo
- Producción de olores y sabores
- Rancidez.

Estas alteraciones dependen de:

- Número y tipo de microorganismos.
- De la temperatura.
- Humedad relativa de la cámara,
- Características de la carne y manejo.

La carne fresca se considera alterada cuando el número de microorganismos oscila entre 10^6 y 10^8 unidades formadoras de colonia por cm^2 .

3.1.2 Composición de la carne⁽¹⁹⁾⁽²¹⁾⁽²⁸⁾

El 75% del músculo es agua por lo que su contenido de humedad es de 0.99, en la que se encuentran gran variedad de sustancias que pueden promover el desarrollo de microorganismos, el 2% corresponde a tejido conectivo, 11.5% tejido miofibrilar, el 5.5% de sarcoplásmica, la grasa constituye el 2.5%, además contiene carbohidratos como glucógeno 0.1% y glucosa 0.2% y ácido láctico 0.9%, compuestos varios solubles como los nitrogenados (aminoácidos 0.35%,

creatinina 0.55% y otros compuestos 0.75%), compuestos inorgánicos como potasio 0.35%, fósforo 0.20% y otros compuestos 0.10%. La carne posee cantidades importantes de vitaminas B.

Valor del pH

El pH de la carne cruda varía entre 5,7 y 7,2, dependiendo de la cantidad de glucógeno presente al efectuarse el sacrificio y de los cambios sufridos después. Un pH más alto favorece el desarrollo de la mayoría de los microorganismos. Un pH más bajo lo frena y a veces actúa selectivamente, permitiendo, por ejemplo, sólo el desarrollo de las levaduras.

El color de la carne: bases físico-químicas y factores.

El color de la carne depende de la cantidad y estado físico de los pigmentos musculares (principalmente la mioglobina, proteína ligada a la membrana externa de las mitocondrias y del retículo sarcoplásmico), de la estructura del músculo (que adsorba o refleje más o menos la luz y permita más o menos entrar al oxígeno).

El observador percibe el color de la carne como impresión global de la síntesis de tres parámetros que dependen a su vez de diversos factores (biológicos, bioquímicos o físico-químicos):

- 1) Saturación: Cantidad de pigmentos
- 2) Matiz: Estado químico del pigmento.
- 3) Claridad
- 4) Estado físico de la carne: ligado al pH último, a la estructura de las proteínas y a la cinética de instauración del rigor mortis.

Estado físico-químico del pigmento (mioglobina)

La mioglobina es una proteína sarcoplasmática, relativamente pequeña, portadora de oxígeno (PM: 16.700), sin que se hayan observado diferencias de peso molecular en la mioglobina de las células musculares de las tres principales especies de carnicería (bovino, ovino y porcino). Su función es la de almacenar oxígeno y facilitar su transporte a las mitocondrias.

El color de la carne fresca también se ve influido por los diferentes estados químicos de la mioglobina. Se produce una interconversión continua entre las tres formas básicas del pigmento; así, el color variará según la proporción relativa y distribución de estos pigmentos.

Tipos de pigmentos:

- **Mioglobina reducida o desoximioglobina** (hierro ferroso, Fe^{++}), Mb. De color rojo púrpura, se encuentra en el interior de la carne, subsiste tras la muerte por la propia actividad reductora del músculo.

- **Oximioglobina o mioglobina oxigenada** (hierro ferroso, Fe^{++}), MbO₂. Formada cuando la Mb se pone en contacto con el aire con la consiguiente oxigenación del pigmento, tiene un color rojo brillante y es el color deseado por el consumidor por lo que habrá que intentar alargar su presencia.

- **Metamioglobina o mioglobina oxidada** (hierro férrico, Fe^{+++}), MetMb. Se forma por exposición prolongada de la anterior al oxígeno o directamente desde la mioglobina reducida cuando las presiones de oxígeno son bajas (alrededor de 4 mm). Es de color marrón-pardo y motivo de rechazo por el consumidor (si supone más del 20% del pigmento total en superficie).

3.1.3 Empacado de productos cárnicos ⁽²³⁾

La función de este envase es la de mantener la calidad de los productos hasta que estos son consumidos por el cliente, este período es conocido como tiempo de vida de anaquel y es importante para determinar la manera en que el producto debe ser comercializado.

Referente a los materiales de envasado, la Norma Salvadoreña Obligatoria: Carne y Productos Cárnicos. Embutidos Crudos y Cocidos (NSO 67.02.13:98), hace referencia en el apartado 8.1 al material de los envases de los productos cárnicos. Textualmente la norma establece: “El material del envase no deberá alterar las características del producto pudiendo ser de papel, cartón, plástico o de cualquier otro material que sea inocuo”. Lo que deja un espectro muy amplio para la elección de los materiales. Se tiene que realizar la diferencia de los materiales de envasado para los cortes y los materiales de embalaje secundario para los embutidos.

Los materiales mas utilizados para el envase de la carne de res en los supermercados en el país son: durapax y plástico de polietileno (film adherente).

3.2 *Salmonella spp.* Microorganismo patógeno contaminante de la carne de res.

3.2.1 TAXONOMIA ⁽³⁰⁾

Salmonella spp es un bacilo en forma de bastoncillo gram-negativo, anaerobio facultativo, que pertenece a la familia enterobacteriaceae. Móviles que fermentan la glucosa y manosa sin producir gas, pero no fermenta lactosa ni sacarosa; produce sulfuro de hidrogeno (H₂S) y no produce ureasa, con una estructura antigénica que posee toxinas y factores de virulencia que se emplea como base para la identificación de sus miembros en serotipos. La estructura antigénica se clasifican por medio de más de 150 antígenos somáticos O termoestables

(lipopolisacarídicos), más de 100 antígenos K termolábiles (capsulares) y más de 50 antígenos H (flagelares). En *Salmonella typhi* los antígenos capsulares se llaman antígenos Vi.

La clasificación taxonómica de del genero Salmonella ha sido muy problemática; se han descrito más de 2,500 serotipos. Especies de salmonella: de 1978 a 1992(Crosa, Brenner, Le Minor y Popoff): estudios de hibridación de ADN definieron dos especies, *S. entérica* y *S. bongori*.

3.2.2 HABITAT (30)

Las Salmonellas se encuentran de forma natural en el intestino del ser humano y de los animales, por lo cual son patógenos de manera regular para el hombre, en el cual producen enteritis, infección general y fiebre intestinal.

Por lo que las heces son un foco de contaminación de los alimentos.

La presencia de Salmonellas es la causa más común de las enfermedades transmitidas por alimentos.

3.2.3 DEFINICION (13)(15)(30)

Cocobacilo de 1 a 3/0.4 a 0.7 μ gram negativo, capsulado, no eporulado, móvil por flagelos peritricos, es lactosa (-), manitol (+) produce H₂S, lisina descarboxilasa (+), sensible al KCN.

Características de cultivo. Facultativo, crece en medios simples a pH de 6 a 8, temperaturas entre 15 a 41° C. se utilizan medios de enriquecimiento como el caldo selenito o el caldo tetratonato.

3.2.4 CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS (13)(15)(30)

En MacConkey: colonias pequeñas, brillantes convexas, incoloras o pálidas por no fermentar lactosa.

En EBM: colonias pequeñas, brillantes convexas, incoloras o pálidas por no fermentar lactosa.

En SS: colonias son incoloras con producción de Ác. Sulfhídrico (punto negro).

En agar sulfito de bismuto: colonias brillantes, convexas, de color negro por reducción del sulfito.

En XLD: colonias rojas lactosa negativas con producción de H₂S (punto negro).

3.2.5 EPIDEMIOLOGIA (30)(31)

La distribución de Salmonella en la naturaleza es muy extensa, prácticamente existe una para cada vertebrado; el origen fecal de las infecciones en el hombre es por ingestión de agua o alimentos contaminados (exógena o endógena).

3.2.6 SINDROMES CLINICOS (30)(31)

Gastroenteritis (enterocolitis). Forma habitual de la salmonelosis con síntomas que pueden presentarse entre las seis a 48 horas después de la ingestión de alimentos contaminados, con náusea, vómito, diarrea no sanguinolenta, fiebre baja y dolor abdominal; suelen presentarse también mialgias y cefalea, persistiendo por dos días a una semana con resolución espontánea (bacteremia en 2 al 4% de los casos).

Septicemia. Todas las salmonellas pueden causarla pero sólo algunas como *S. Typhi*, *paratyphi*, *cholerasuis* y *S. dublin* se han incriminado en caso de septicemias con más frecuencia.

Fiebre entérica. Llamada también fiebre tifoidea, que es un cuadro septicémico y la produce *S. Typha*. Se calculan más de 16 millones de casos al año en el mundo.

Una forma leve de la enfermedad se le llama fiebre paratifoidea y la producen: *S. paratyphi A* y *S. Schottmuelleri* (antes llamada *S. paratyphi B*), *S. Hirschfeldii* (antes llamada *S. paratyphi C*).

Presentan un periodo de incubación de 10 a 14 días, seguido de fiebre remitente que aumenta progresivamente, exantema macupapular rosado, estreñimiento, bradicardia, cefalea, mialgias, hepatomegalia y esplenomegalia, malestar general, incapacidad, anorexia durante una o dos semanas seguida de síntomas gastrointestinales por una reinfección intestinal, las lesiones más frecuentes son hiperplasia y necrosis del tejido linfoide (placas de Peyer), hepatitis, necrosis focal de hígado, pulmones periosto y otros órganos, colecistis, perforación intestinal.

3.2.7 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO (30)(31)

Coprocultivo con enriquecimiento en caldo selenito, caldo tetrionato, hemocultivo o cultivo de médula ósea, así como urocultivo con pruebas bioquímicas y serología. Reacciones febriles de Nidal.

3.2.8 TRATAMIENTO (30)(31)

Ampicilina, trimetropín-sulfametaxol, cefalosporinas, cloranfenicol; por la frecuente resistencia a los antibióticos mediados por plásmidos es recomendable hacer el antibiograma en todos los casos. Cirugía para extirpación de vesícula biliar solo en caso de portadores manejadores de alimentos.

3.2.9 PROFILAXIS (130)(31)

Control total en el manejo higiénico del agua y de los alimentos, control de excretas y de las aguas negras, lavado de las manos antes de preparar alimentos, coprocultivo a manejadores de alimentos.

3.2.10 PARAMETROS DE CRECIMIENTO (13)(15)(30)(31)

Temperatura: *Salmonella spp.* puede crecer entre 7-49°C, su crecimiento se ve reducido a < 15°C.

pH: *Salmonella spp.* crece a un pH que varía entre 4-9, la tolerancia al ácido depende del tipo y tamaño del ácido al cual se expone el microorganismo, y por factores como la temperatura y sustancias como los nitritos.

Condiciones atmosféricas: *Salmonella spp.* se clasifica como anaerobio facultativo. El crecimiento bajo atmósferas de nitrógeno es ligeramente menor a las condiciones aeróbicas. Puede crecer de 8-11°C con concentraciones de 20-50% de CO₂, su crecimiento se ve retardado cuando hay un 80% de CO₂ en el aire.

Actividad del agua (a_w): *Salmonella spp.* puede multiplicarse en a_w que van desde 0.94 hasta 0.995 y puede persistir en alimentos con a_w inferiores a 0.94

3.3 BACTERIAS ACIDO LACTICAS (8)(10)(22)

Las bacterias ácido lácticas presentan en la actualidad un inmenso potencial biotecnológico, dada su presencia en multitud de procesos fermentativos de

alimentos destinados al consumo humano (productos lácteos, vegetales, cárnicos y de panadería, así como bebidas alcohólicas) y animal (ensilados). Estas bacterias no sólo contribuyen al desarrollo de las características organolépticas y reológicas de los alimentos, sino que generan en los mismos ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos debido a su marcada capacidad antagonista, la cual favorece su proliferación en el alimento en detrimento de cualquier otro grupo microbiano presente en la materia prima (alimento crudo) o que contamine el producto posteriormente. Además de este importante papel en procesos de bioconservación, se ha podido comprobar que algunas cepas de bacterias lácticas, entre ellas las del género *Lactobacillus*, son beneficiosas para la salud, tanto humana como animal. Ambos efectos beneficiosos, ocasionados por su capacidad antagónica, se basan en la producción de ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores, entre los que cabe mencionar el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y otros derivados del metabolismo del oxígeno, así como compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas y otros. Las bacterias lácticas pueden ser utilizadas en la prevención y el control de determinadas enfermedades, así como en el mejoramiento de la calidad de conservación de ciertos alimentos, por lo que su valor radica en tener a disposición sustancias procedentes de microorganismos que sirvan como punto de partida para la obtención de productos biotecnológicos aplicables a la solución de problemas de la salud tanto humana como animal.

3.3.1 CARACTERISTICAS DE LAS BACTERIAS ACIDO LACTICAS LA FAMILIA LACTOBACILLACEAE⁽⁸⁾⁽¹⁰⁾⁽¹²⁾⁽¹⁶⁾

Las bacterias ácido lácticas se ubican en la familia Lactobacillaceae, la cual se caracteriza porque sus miembros pueden ser bacilos largos o cortos, aunque también cocos que se dividen como los bacilos, solamente en un plano,

produciendo cadenas o tétradas de forma ocasional y filamentos, falsamente llamados ramificados. Estas bacterias son normalmente no mótilas, aunque también pueden serlo. Las especies móviles presentan flagelación peritrica. Son Gram positivas, con rara producción de pigmentos, aunque unas pocas especies los producen de color amarillo, naranja, rojo o pardo.

Las especies microaerófilas raras veces licúan la gelatina, sin embargo, las anaerobias estrictas lo hacen más comúnmente. Presentan pobre o ningún crecimiento superficial en cualquier medio. Los carbohidratos les resultan indispensables para su buen desarrollo, pues los fermentan para dar lugar a ácido láctico (a veces con ácidos volátiles), alcohol y dióxido de carbono (CO₂) como subproductos. No producen nitritos a partir de los nitratos, pero entre los anaerobios estrictos hay algunas especies que reducen los nitratos y otras que no se han probado con esta reacción. Son microaerófilas hacia la anaerobiosis. Se encuentran regularmente en la boca y en el tracto intestinal del hombre y otros animales, en alimentos y productos lácteos y en jugos vegetales fermentados. Unas pocas especies son altamente patógenas.

3.3.2 EL GENERO LACTOBACILLUS (8)(10)(12)(16)

CARACTERES MORFOLOGICOS

El género *Lactobacillus* (*lactis* - leche; *bacillus* - pequeños bacilos) se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco - bacilos coryneformes, lo cual hace que se puedan confundir con géneros aislado habitualmente de materiales clínicos. Estos bacilos se presentan comúnmente formando cadenas y en general son no móviles, pero cuando tienen motilidad es por la presencia de flagelación peritrica. Son gram positivos y sólo las células muertas pueden dar resultados variables a la tinción de gram. Además, no esporulan y algunas cepas

presentan cuerpos bipolares que probablemente contengan polifosfato. Los grandes bacilos homofermentativo presentan gránulos internos revelados por tinción de gram o por tinción con azul de metileno.

PARED CELULAR Y ULTRAESTRUCTURA

La pared celular de los lactobacilos, observada al microscopio electrónico es típicamente gram positiva y contiene peptidoglicanos (mureínas) de varios quimiotipos, de ahí que el peptidoglicano del tipo Lisina – D – Asparagina sea el más ampliamente distribuido. Esta pared también contiene polisacáridos unidos al peptidoglicano mediante enlaces fosfodiéster, pero sólo presenta ácidos teicoicos relacionados a ella en algunas especies. También pueden apreciarse al microscopio electrónico grandes mesosomas que caracterizan a este género.

CARACTERES CULTURALES Y DE LAS COLONIAS

Las colonias de *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2 - 5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza. Algunas especies forman colonias rugosas, otras, como *Lactobacillus confusus*, presentan colonias viscosas por excepción. Generalmente no presentan actividad proteolítica ni lipolítica que pueda apreciarse mediante halos claros formados en medios sólidos que contengan proteínas o grasas. Sin embargo, muchas cepas presentan ligera actividad proteolítica debido a proteasas y peptidasas ligadas a la pared celular o liberadas por ésta, así como una débil actividad lipolítica debido a la acción de lipasas intracelulares.

Normalmente no reducen los nitratos, pero esta reacción puede ocurrir en algunos casos, cuando el pH está por encima de 6,0. Los lactobacilos no licúan

la gelatina ni digieren la caseína, aunque muchas cepas producen pequeñas cantidades de nitrógeno soluble. Tampoco producen indol ni ácido sulfídrico (H₂S). Son catalasa negativos, pero algunas cepas producen la enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno. Son citocromo negativos, por la ausencia de porfirinas; presentan una reacción bencidina negativa. La producción de pigmentos por estas bacterias es rara y cuando ocurre, éstos pueden ser de color amarillo o naranja hacia un tono ferroso o rojizo. Su crecimiento en medio líquido se presenta a través de éste, aunque sus células precipitan rápidamente después que el crecimiento cesa; dando lugar a un sedimento suave y homogéneo, sin formación de películas. En raras ocasiones este sedimento es granular o viscoso. Los lactobacilos no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados y hasta sulfuro de hidrógeno (H₂S) y aminas en el queso.

3.3.3. NUTRICION Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO (8)(10)(12)(16)(18)

Los lactobacilos presentan particularidades para cada especie respecto a los requerimientos nutricionales complejos para los aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Requieren no sólo carbohidratos como fuentes de carbono y energía, sino también: aminoácidos, vitaminas y nucleótidos. Generalmente estos requerimientos variados suelen suplirse cuando el medio de cultivo de los lactobacilos contiene carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura, aunque una suplementación con jugo de tomate, manganeso, acetato y ésteres del ácido oleico, especialmente Tween 80, resulta estimulador y hasta esencial para muchas especies. Por eso, estos compuestos se incluyen en el medio MRS. Existen especies que se adaptan a sustratos muy particulares y necesitan factores de

crecimiento especiales. Debido a que las bacterias ácido lácticas (BAL) poseen requerimientos nutricionales y de crecimiento similares; su clasificación se ha tornado difícil por los métodos microbiológicos tradicionales. El uso de pruebas moleculares, basadas en secuencias de ADN ribosomal, para identificar las bacterias aisladas de su ambiente natural, fue informado por Tannock.

Debido a la alta variabilidad de esta región entre especies, se emplea desde hace algunos años un método eficiente para la identificación y detección específica de bacterias ácido lácticas probióticas, el cual resulta útil para una mejor caracterización de las mismas, denominado PCR.

3.3.4 CONDICIONES ECOLOGICAS (8)(10)(12)(16)(18)

pH

Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6.5-4.5 y con uno óptimo de desarrollo entre 5.5 y 6.2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3.6 en dependencia de especies y cepas y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Los lactobacilos son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4.0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan o al menos disminuyen considerablemente el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras.

3.3.5. NECESIDADES DE OXIGENO (12)(16)(18)

La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de CO₂ (de aproximadamente

5% o hasta el 10%) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del crecimiento superficial sobre medios sólidos.

3.3.6 TEMPERATURA DE CRECIMIENTO ⁽¹²⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁸⁾

La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (30 - 40°C), con un límite superior de 40°C. Aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C, algunos crecen por debajo de 15°C y hay cepas que crecen por debajo de 5°C. Otros crecen a temperaturas bajas, cercanas al punto de congelación (por ejemplo, los que habitan en carnes y pescados congelados).

Los llamados lactobacilos “termófilos” pueden tener un límite superior de temperatura de 55°C y no crecen por debajo de 15°C. Aún no se conocen los verdaderos lactobacilos termófilos que crezcan por encima de 55°C.

3.3.7. METABOLISMO ⁽¹⁸⁾

En su metabolismo, los lactobacilos van de la vida anaerobia a la aerobia. Estos microorganismos carecen de sistemas de citocromos para ejecutar la fosforilación oxidativa y no poseen enzimas superóxido dismutasas ni catalasas. Los miembros de este género transforman la glucosa y las hexosas aldehídicas similares, los carbohidratos que producen estos azúcares simples y los alcoholes polihidroxílicos en ácido láctico por homofermentación o bien, en ácido láctico y otros productos finales adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico por heterofermentación, constituyendo al menos un 50% de los productos finales el ácido láctico, el cual usualmente no es fermentado.

Las principales vías de la fermentación para las hexosas son: la de Embden - Meyerhof, donde se convierte 1 mol de hexosa en 2 moles de ácido láctico por

fermentación homoláctica y la vía del 6 - fosfogluconato, cuyo resultado es 1 mol de CO₂, 1 mol de etanol (O de ácido acético) y 1 mol de ácido láctico, por fermentación heteroláctica. En condiciones aerobias, la mayoría de las cepas reoxidan el NADH₂ utilizando el O₂ como aceptor final de electrones, de modo que el Acetil - CoA no es, o al menos no es completamente reducido a etanol. De esta manera, se forma ATP adicional por fosforilación a nivel de sustrato, así como proporciones variables de ácido acético y etanol, en dependencia del suministro de Oxígeno. En cuanto a los niveles enzimáticos, los lactobacilos heterofermentativos poseen fosfocetolasas, pero no FDP aldolasas, mientras que los homofermentativos poseen FDP aldolasas, pero no fosfocetolasas.

3.3.8. SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS Y DROGAS ⁽¹⁸⁾

Los lactobacilos son sensibles ante la mayoría de los antibióticos activos contra las bacterias Gram-positivas. Se ha podido estudiar la sensibilidad de los lactobacilos intestinales ante antibióticos empleados como aditivos alimenticios.

3.3.9. PATOGENICIDAD ⁽¹⁸⁾

Aparte de las caries dentales, la patogenicidad de los lactobacilos es rara; aunque últimamente se han informado algunos procesos infecciosos en humanos donde estos microorganismos se han encontrado involucrados. Tales son los casos de abscesos, septicemias sistémicas y endocarditis bacterianas, provocados por *L. casei* subsp.rhamnosus, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y ocasionalmente *Lactobacillus salivarius*. Sin embargo, las bases bioquímicas de tal patogenicidad aún se desconocen.

3.3.10. HABITAT ⁽¹⁶⁾⁽¹⁸⁾

Los lactobacilos pueden encontrarse en productos lácteos, quesos, granos, productos cárnicos o de pescado, agua, aguas cloacales, cervezas, vinos, frutas y jugos de frutas, col y otros vegetales fermentados, ensilajes, masas agrias y pulpas, aunque también forman parte de la flora normal de la boca, el tracto gastrointestinal y la vagina de muchos animales de temperatura estable, incluyendo al hombre. También pueden encontrarse en habitats secundarios como los fertilizantes de origen orgánico. Algunas especies individuales se han adaptado a determinados nichos ecológicos, que son de hecho sus habitats naturales, siendo muy difícil encontrarlos fuera de éstos. ⁽⁷⁾

3.4 BIOCONSERVACION DE LOS ALIMENTOS ⁽¹¹⁾⁽¹⁴⁾

La bioconservación se refiere a la extensión de la vida útil de los alimentos y el aumento de la seguridad microbiológica usando una micro flora natural o controlada y sus productos antibacteriales. La bioconservación puede ser aplicada en alimentos y específicamente en cárnicos por cuatro métodos básicos:

Añadiendo un cultivo puro BAL viables productoras de bacteriocina. De esta manera ofrece una forma directa de incorporar bacteriocinas en el alimento, dependiendo su éxito de la habilidad del cultivo para crecer y producir bacteriocina en el alimento bajo condiciones ambientales y tecnológicas (temperatura, pH, aditivos, entre otros). En el caso de la carne, (que es un alimento que no puede ser sometido a pasterización antes de la adición de las cepas iniciadoras), los cultivos bioconservadores o fermentadores deben ser capaces de competir con la micro flora natural, no debe tener impacto en las propiedades fisicoquímicas y organolépticas del alimento, no debe producir gas ni exopolisacáridos para evitar el inflamamiento en el empaque debido a la

acumulación de gases y la formación de viscosidades en las superficies de la carne.

Añadiendo bacterias ácido lácticas mesófilas como una protección contra el abuso de temperatura. En este caso la cepa bioprotectora se mantendrá en una concentración inicial en condiciones frías. Bajo condiciones de abuso de temperatura, la cepa crecerá competitivamente frente a la bacteria patógena evitando los peligros a la salud. En condiciones de abuso de temperatura el cultivo protector puede incluso actuar como el deteriorante predominante, asegurando que las bacterias patógenas no crezcan y que el alimento se deteriore para que no sea consumido.

Añadiendo preparaciones de bacteriocina cruda (extracto crudo), licor fermentado o concentrados obtenidos por el crecimiento de BAL productoras de bacteriocina en sustrato complejo. Este método evita el uso de compuestos purificados que pueden tener regulación legal y ahorra costos en la purificación de cada compuesto.

Adicionando sustancias antagónicas puras o semipuras como las bacteriocinas producidas por BAL. Al usar este método la dosis de bacteriocina es más precisa y por ende más predecible. Sin embargo la aplicación se limita de acuerdo a la regulación de cada país concerniente a aditivos en alimentos.

Las dos primeras metodologías podrían denominarse métodos *in situ* de bioconservación (por inoculación del sistema alimenticio con la cepa productora de bacteriocina en condiciones que favorezcan su producción); mientras las dos últimas serían metodologías *ex situ* (donde la bacteriocina es producida por fuera del alimento en condiciones controladas y luego aplicada al alimento). En el caso de usar sustancias antagónicas puras o semipuras, es necesario utilizar técnicas de precipitación de la proteína adaptadas a las condiciones de cada laboratorio,

debe inicialmente estandarizarse la producción y precipitación de la bacteriocina, hasta garantizar su reproducibilidad antes de la aplicación en alimentos para asegurar una cantidad adecuada con suficiente poder inhibitorio.

La aplicación de las metodologías de bioconservación depende de las variables tecnológicas a las que sean sometidas los cultivos, en los casos ex situ, la producción de bacteriocina puede llegar a ser una metodología más costosa ya que no solo requiere de las cepas iniciadoras (microorganismos completamente aislados), sino de medios de cultivo y equipos para el desarrollo de las cepas y para la producción de la bacteriocina. Adicionalmente se debe garantizar la actividad de cada extracto o de la bacteriocina e incluso puede llegar a ser necesario determinar la concentración mínima inhibitoria contra patógenos. La utilización de estos sistemas de bioconservación requiere en cualquier caso estudios preliminares para determinar el comportamiento de las bacterias en el medio de cultivo en que se desarrolla (curvas de crecimiento), y la estandarización de las técnicas para lograr producirlas en cantidades suficientes.

La bioconservación usando bacteriocinas producidas in situ, ofrece varias ventajas comparadas a la producción ex situ, concernientes al aspecto legal y de costos. Disminuir los costos en los procesos biopreservativos puede ser altamente atractivo, especialmente para economías pequeñas y países en desarrollo, donde la seguridad alimenticia puede estar altamente comprometida. La evaluación del potencial bactericida de los extractos crudos de BAL sobre el crecimiento de microorganismos deteriorantes y patógenos, ha presentado resultados favorables, por lo que han sido recomendados recientemente por varios autores como método de Bioconservación en alimentos.

3.4.1 FUNCION DE LAS BACTERIAS ACIDO LACTICAS Y SUS METABOLITOS EN LA BIOCONSERVACION ⁽¹⁴⁾(22)

3.4.2 BACTERIAS ACIDO LACTICAS ⁽¹⁾(22)

En cualquiera de los casos de biopreservación mencionados anteriormente son utilizadas las Bacterias Acido Lácticas (BAL) que comprenden un número elevado de bacterias gram-positivas cuya característica común es la producción de ácido láctico a partir de los carbohidratos. El grupo de bacterias lácticas asociadas con los alimentos incluyen cocos de géneros: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y bacilos de los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium*. ^(5,14)

Este grupo de bacterias probablemente sea el más abundante y difundido en la naturaleza, debido a la capacidad que poseen de crecer en una variedad de sustratos y en diversas condiciones biológicas. Dentro de las bacterias lácticas, el grupo *Lactobacillus* es el más importante y heterogéneo, incluyendo especies con propiedades bioquímicas y fisiológicas muy diferentes. Las bacterias lácticas no necesitan oxígeno para crecer, son tolerantes a la presencia de C (D2, nitritos, humo y concentraciones de sal relativamente altas y toleran valores de pH bajos. Por ello, las condiciones existentes en las carnes envasadas a vacío, en las curadas y en los productos cárnicos favorecen el crecimiento de estos microorganismos. En la carne envasada al vacío los microorganismos dominantes son *Lactobacillus sp*, *Leuconostoc sp* y *Carnobacterium sp*. ^(9,12)

La utilización de los carbohidratos disponibles en el alimento y la reducción del pH a causa de los ácidos orgánicos producidos, son el principal mecanismo de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas. No obstante, estas bacterias también producen otras sustancias antagonistas dentro de las cuales se

destacan el diacetilo, peróxido de hidrógeno, acetaldehído, compuestos no proteicos de bajo peso molecular y las bacteriocinas. (3,8,12)

Ácidos orgánicos: Los ácidos orgánicos contribuyen al desarrollo de sabor, aroma y textura de los alimentos, pero también a su estabilidad mediante la inhibición de microorganismos alterantes. La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos y del pH es complementaria, siendo la fracción no disociada de los ácidos orgánicos la que posee una mayor actividad inhibidora debido a su naturaleza lipofílica, ya que pueden atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma. Estas moléculas pueden ejercer dos efectos: por un lado interfieren con funciones celulares, como puede ser la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa, por otro lado, la disociación de los ácidos orgánicos provoca el incremento de protones en el interior celular. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene y se provoca el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad. (12)

Las bacterias lácticas pueden sobrevivir y desarrollarse en presencia de pH relativamente bajo a diferencia de otros grupos microbianos con metabolismo respiratorio, pues poseen un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, origina energía.

3.4.3. COMPUESTOS PROTEICOS ⁽²²⁾

Entre los compuestos no proteicos que producen las BAL durante su crecimiento se encuentra la reuterina. Esta sustancia a diferencia de las bacteriocinas y el peróxido, solo se produce por *Latobacillus reuteri*, aislado del tracto gastrointestinal de personas y animales; su potencial tóxico aún no se ha evaluado, aunque por su naturaleza existen dudas acerca de su posible utilidad en la industria alimentaria. Su actividad antimicrobiana es extraordinariamente amplia, afectando a bacterias gram positivas, gram negativas, levaduras, mohos y protozoos. La reuterina se forma durante la utilización anaerobia del glicerol e inhibe la actividad de la enzima ribonucleótido reductaza involucrada en la síntesis del DNA, lo que determina su amplio espectro antimicrobiano. ⁽⁶⁾

3.4.4. METABOLITOS DEL OXIGENO ⁽²²⁾

El crecimiento de BAL en medios aerobios conduce a la formación de varios metabolitos del oxígeno como: peróxido de hidrógeno, aniones súper óxido y radicales libres, que poseen un efecto bacteriostático y bactericida frente a la flora láctica y no láctica. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) funciona como un oxidante produciendo radicales libres que atacan los componentes celulares esenciales, lípidos, proteínas y DNA. La acumulación del H_2O_2 en los medios de cultivo, se debe a que las BAL, en general no poseen catalasa. El peróxido de hidrógeno ha sido estudiado más ampliamente en leche cruda, donde se genera el sistema antimicrobiano "lactoperoxidasa", sin embargo a pesar de su potencial en la preservación, es reconocida la poca viabilidad de este compuesto en los alimentos, ya que puede tener efectos perjudiciales en su calidad organoléptica causando rancidez de las grasas y reacciones de decoloración y enverdecimiento. ⁽⁸⁾

3.4.5 BACTERIOCINAS ⁽¹⁾ (26)

Este es el metabolito sobre el cual se han centrado la mayor parte de estudios en los últimos años, desarrollándose diversas investigaciones en torno a su detección, producción, purificación, forma de acción, caracterización bioquímica, propiedades bactericidas, microorganismos inhibidos o sensibles y aplicación con éxito en la bioconservación de alimentos.

El término bacteriocinogenicidad está definido como la capacidad de las bacterias de sintetizar y eliminar al exterior proteínas antagónicas de otros microorganismos, por lo que se podría deducir que las BAL tienen esta característica bien definida. Las bacteriocinas son proteínas o péptidos bactericidas sintetizados en el ribosoma de las BAL, la célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida.

Las bacteriocinas de bacterias lácticas son generalmente estables a pH ácido o neutro, indicando una adaptación al entorno natural de las bacterias que las producen. Además algunos extractos de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* presentan estabilidad al calentamiento a 50 y 80 °C, propiedad que es importante para asegurar el control de microorganismos en algunos procesos de la industria alimentaria.

Algunos autores han considerado que el espectro de inhibición de estas proteínas es reducido, generalmente sobre microorganismos relacionados taxonómicamente, de forma que presentan actividad bactericida solamente frente a cepas sensibles.

La susceptibilidad de las bacterias Gram negativas a las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas es mucho más limitada y hasta hace poco no se

conocían bacteriocinas producidas por bacterias lácticas de origen alimentario activas naturalmente frente a bacterias gram negativas. La producción de bacteriocinas con un espectro de inhibición relativamente amplio, es propia de bacterias de origen alimentario incluidas las de la carne y sus derivados.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

- **Campo:** Se realizó una visita a los ocho supermercados que corresponden al distrito dos de la zona metropolitana de San Salvador para inspeccionar el tiempo de vida útil en anaquel y comercialización de las bandejas de carne de res (chuleta) cruda.
- **Experimental:** Con las muestras recolectadas se realizaron análisis microbiológicos que permitieron comprobar la presencia o ausencia de *Salmonella spp* y la bioconservación de la carne de res (chuleta) cruda, mediante la utilización de un probiótico *Lactobacillus acidophilus*, dichos análisis se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador en los meses de Julio a Diciembre del 2015.
- **Prospectivo:** Esta investigación se constituirá en un antecedente para futuras investigaciones relacionadas en la temática.

4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA.

Se consultó en las Bibliotecas:

- “Dr. Benjamín Orozco” de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador (UES).
- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador (UES).

- Biblioteca de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador(UES).
- Biblioteca de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Universidad de El Salvador(UES).
- Biblioteca P. Fiorentino Idoate, Universidad Centroamericana José Simeón Cañas (UCA).
- Biblioteca Universitaria Hugo Lindo, Universidad Dr. José Matías Delgado.
- Internet.

4.3 INVESTIGACION DE CAMPO

Universo: Todas las muestras en bandeja de carne de res (chuleta) cruda, distribuidas en los 8 supermercados del distrito dos de la zona metropolitana de San Salvador.

Muestra: 16 muestras bandejas de carne de res (chuleta) obtenidas de los ocho supermercados; a las que se les realizó el siguiente tratamiento: por cada muestra de supermercado (dos bandejas) se cortaron cuarenta y dos porciones de 25 gramos cada una, obteniendo 336 porciones en total de todas las muestras de los supermercados, a éstas se les determinó inicialmente presencia o ausencia de *Salmonella spp*, seguidamente de las muestras analizadas se aisló, identificó y estandarizó a las concentraciones 10^3 y 10^5 UFC/g, de la bacteria *Salmonella spp*. y se inoculó la carne de res chuleta con los microorganismos de *Lactobacillus acidophilus* y *Salmonella spp*. a las concentraciones 10^3 y 10^5 UFC/g. Se realizaron los análisis microbiológicos cada 24, 48, 72 horas 8 y 15 días, en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación

y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador en los meses de Julio a Noviembre del año 2015.

Muestreo: Se realizó un muestreo dirigido y puntual a los ocho supermercados del área dos distrito dos de la zona metropolitana de San Salvador donde se eligieron dos bandejas de carne de res (chuleta) cruda por cada supermercado, que estaban dispensadas en anaquel de fácil acceso para los consumidores y se encontraban en bandejas desechables de durapax sin papel absorbente y cubiertas con plástico transparente, cada bandeja contenía un peso aproximado de una libra con tres chuletas de carne de res cruda.

4.4 ESTUDIO PRELIMINAR (ver Anexo N°1 y N°2)

Se pudo realizar un recorrido a los supermercados que se encuentran en el área dos, distrito dos de la zona metropolitana de San Salvador y observar que las muestras de carne de res (chuleta) cruda, no tienen proveedores distintos de carne, por lo que las carnes que comercializan son de la carnicería de cada supermercado, y que además están dispensas en bandejas que contienen tres porciones de chuleta en su interior con un peso aproximado de una libra y exhibidas en anaquel al alcance del consumidor.

Cuadro N° 1: Lista de supermercados del Distrito Dos del área dos de la zona metropolitana de San Salvador.

Nombre de Supermercado	Sucursal	Código
Súper Selectos	Metro Sur	SS001
	Metro Centro	SS002
	Miralvalle 1	SS003
	Miralvalle 2	SS004
	San Luis	SS005
	Gigante	SS006
Dispensa de Don Juan	Los Héroes	DJH01
	Escalón Norte	DJH02

4.5 PROCEDIMIENTO PARA EL MUESTREO⁽⁵⁾⁽¹⁷⁾

4.5.1 DETERMINACION DE NUMERO DE SUPERMERCADOS ⁽¹⁷⁾

Esta investigación se realizó en el área dos distrito dos de la zona metropolitana de San Salvador, en el que están presentes ocho supermercados de distintas cadenas comerciales que serán el universo por lo que a criterio de los autores se tomaron los ocho supermercados teniendo como referencia que estadísticamente cuando el universo es menor de treinta se muestrea en su totalidad. (Ver anexo N° 1)

4.5.2 DETERMINACION Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA⁽¹⁷⁾

Para determinar del número de muestra por cada supermercado, se tomó a criterio de los autores y debido a que no aplica otro muestreo estadístico, seleccionar dos bandejas de carne de res (chuleta) que estaban colocadas en bandejas de durapax sin papel absorbente y cubiertas con plástico para cubrir bandejas, por cada supermercado. Cada bandeja contiene tres porciones de chuleta con un peso total por bandeja aproximado de 1 libra. (ver Anexo N° 2)

Tabla N°2 Cantidad de muestra que se tomó por supermercado

Código de supermercado	Muestras de carne
SS001	2
SS002	2
SS003	2
SS004	2
SS005	2
SS006	2
DJH01	2
DJE02	2
TOTAL	16

4.6 IDENTIFICACION DE MUESTRA

Cada muestra se pudo identificar con sus datos completos: lugar de muestreo, fecha, hora de toma de muestra, análisis requerido, nombre del muestreador y temperatura a la cual se encontraba en la cámara de refrigeración del supermercado donde se adquirió. (Ver Anexo N° 3)

4.7 TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Las muestras se pudieron tomar y colocar en hieleras a una temperatura aproximada de 2°C y se llevaron al laboratorio de alimentos en CENSALUD donde se conservaron a temperatura de refrigeración (4 - 8 °C) protegidas de la luz para no alterar las características propias de la carne de res (chuleta) cruda.

4.8 PARTE EXPERIMENTAL

4.8.1 PROCEDIMIENTO GENERAL PARA COMPROBAR LA PRESENCIA O AUSENCIA DE *Salmonella* spp (Ver Anexo N°4 y N°5)⁽³⁾⁽⁴⁾⁽³¹⁾

Esta prueba sirvió para comprobar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp en las muestras de carne de res (chuleta) al iniciar el análisis.

- Dilución 10⁻¹: Pesar asépticamente 25 g de la muestra en bolsa de polietileno estéril. Adicionar 225mL del medio de pre-enriquecimiento estéril caldo lactosado y mezclar durante un 1 min a 260rpm en stomacher. Transferir asépticamente la mezcla homogeneizada a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca y dejar incubando a 37°C durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas de incubación de los frascos de pre enriquecimiento, agitar suavemente, luego preparar las siguientes diluciones.

- Dilución 10^{-2} : Transferir 10mL con una pipeta estéril, de la dilución 10^{-1} a un frasco que contiene 90mL de solución Caldo Lactosado (diluyente) y homogenizar durante 2 minutos.

- Dilución 10^{-3} : Transferir 10mL con una pipeta estéril, de la dilución 10^{-2} a un frasco que contiene 90mL de solución Caldo Lactosado (diluyente). Agitar la dilución para homogenizarla.

- Dilución 10^{-4} : Transferir 10mL con una pipeta estéril, de la dilución 10^{-3} a un frasco que contiene 90mL de solución Caldo Lactosado (diluyente). Agitar la dilución para homogenizarla.

- Dilución 10^{-5} : Transferir 10mL con una pipeta estéril, de la dilución 10^{-4} a un frasco que contiene 90mL de solución Caldo Lactosado (diluyente). Agitar la dilución para homogenizarla.

4.8.2 IDENTIFICACION DE *Salmonella spp* (ver Anexo N°6)⁽³⁾⁽⁴⁾⁽³¹⁾

- De cada una de las diluciones preparadas en el apartado 4.8.1, pipetear 1 mL y colocarlo en caldo Tetracionato, y 0.1 mL en caldo Rapapport. Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24 horas.

- Después de la incubación distribuir 1 mL con la técnica de esparcido sobre placas petri con agar Salmonella Shigella y XLD. Se incubo a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 24 horas.

- Comprobar la presencia o ausencia para 24, 48,72 hr, 8 y 15 dias.

El crecimiento de colonias características indica la presencia de *Salmonella spp*. En Agar Salmonella-Shigella (SS): Las colonias características son traslucidas de color anaranjado claro con centro negro. Algunas especies de *Salmonella spp* producen colonias incoloras, traslucidas.

En Agar XLD: Las colonias son traslucidas con centro negro.

PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE *Salmonella spp*
(ver Anexo N°7)⁽³⁾⁽⁴⁾⁽³¹⁾

- TSI

Inocular los tubos de TSI con aza de punta, introduciendo la punta hasta 5 mm del fondo del tubo, retirar el aza de punta del fondo, estriando sobre la superficie. Incubar a 24 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Observar el crecimiento en el medio de cultivo, la coloración y además si hay formación de gas SH_2 .

- Reacción de Indol

Sobre 1mL de medio de caldo triptófano inocular las colonias del microorganismo patógeno de prueba.

Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$, durante 24 horas. Luego de la inoculación añadir 5 gotas de reactivo de Erlich por la pared interior del tubo.

El desarrollo de un anillo color rojo en la interfase del reactivo y el caldo, segundos después de añadir el reactivo indica la presencia de Indol y una prueba positiva, si el anillo formado es amarillo o del mismo color que el reactivo la prueba es negativa.

- Voger Proskauer

Inocular el caldo RMVP con las colonias del microorganismo patógeno de prueba. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$, durante 24 horas.

Luego de finalizado el tiempo de incubación adicionar al tubo de ensayo 3 gotas de Alfa-naftol + 2 gotas de hidróxido de potasio, luego agitar cuidadosamente el tubo.

Dejar reposar el tubo durante 10 a 15 minutos. El desarrollo de un color rojo luego de 15 minutos indica prueba positiva la presencia de diacetilo.

- Rojo de Metilo

Inocular el caldo Rojo Metilo (MRVP) con las colonias del microorganismo patógeno en estudio.

Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$, durante 48 horas.

Luego de finalizado el tiempo de incubación agregar unas 1 o 2 gotas del reactivo de Rojo de metilo.

La prueba es positiva si se desarrolla de un color rojo en el tubo. Esto indica que la producción de ácido es suficiente para producir el viraje del indicador y el microorganismo fermentó la glucosa.

- Prueba de Movilidad

Inocular la colonia del microorganismo patógeno de prueba por punzada en el agar MIO (Movilidad-Indol-Ornitina)

Incubar 24 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$

Luego de la incubación observar la movilidad de la bacteria en el medio de cultivo inclusive más allá de la punzada de siembra.

- Citrato

Inocular por estría el microorganismo patógeno de prueba sobre el agar inclinado de Citrato.

Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 4 días.

La prueba es positiva cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría, acompañado o no de un viraje del indicador color azul.

4.8.3 ESTANDARIZACION DE LA BACTERIA PATOGENA *Salmonella spp*

(Ver Anexo N°8)⁽²⁾⁽²⁶⁾

La estandarización de *Salmonella* se realiza por el método espectrofotométrico, donde la turbidez de la suspensión bacteriana se mide por espectrofotometría a una longitud de onda de 580 nm.

Las diluciones se realizan con solución salina estéril luego se mide el porcentaje de transmitancia en el espectrofotómetro, utilizando como blanco solución salina estéril.

Procedimiento:

- Tomar colonias de *Salmonella spp* aisladas de la carne de res (chuleta) cruda en Agar TSA e incubadas durante 24 horas a 37°C.
- Preparar una solución madre suspendiendo las colonias recuperadas de Agar TSA y suspendidas en tubos de ensayo con solución salina estéril.
- Realizar 5 diferentes diluciones a partir de la suspensión madre y tomar lecturas del porcentaje de transmitancia de cada una, usar como blanco entre cada lectura solución salina estéril.

Tomar las lecturas del porcentaje de transmitancia como un parámetro patrón para conocer la concentración de 10^3 y 10^5 UFC/mL de *Salmonella spp.* en la carne de res (chuleta).

4.8.4. PREPARACION DE LA CONCENTRACION DE *Lactobacillus acidophilus*

(Ver Anexo N°9 y N°10)⁽²⁶⁾

El *Lactobacillus acidophilus* se hizo crecer en caldo MRS a 37°C por 48 horas en atmosfera anaeróbica al 5% de CO₂, para esto se realizó lo siguiente:

- Pesar un gramo del polvo de la cepa *Lactobacillus acidophilus*, equivalente a 2.9×10^{11} UFC/mL y transferir a un frasco que contiene 99 mL de caldo MRS (diluyente) y homogenizar durante 2 minutos, dilución 1:100
- Transferir 1.0 mL con una pipeta estéril, de la dilución 1:100 a un frasco que contiene 99 mL de caldo MRS (diluyente) y homogenizar durante 2 minutos.
- Concentración 10^5 : Transferir 1.36 mL con una pipeta estéril, de la dilución anterior a un frasco de 400 mL y llevar a volumen con caldo MRS (diluyente) y homogenizar durante 2 minutos.
- Concentración 10^3 : Transferir 1.0 mL con una pipeta estéril, de la concentración 10^5 , a un frasco de 100 mL y llevar a volumen con caldo MRS (diluyente). Después del periodo de incubación, estandarizar a la concentración 10^3 UFC/mL, en el espectrofotómetro realizando lecturas a 620 nm y 50% de transmitancia y para la concentración 10^5 estandarizar realizando lecturas en el espectrofotómetro a 620 nm y 32% de transmitancia.

4.8.5 INOCULACION DE LA CARNE DE RES (CHULETA) CON EL PROBIOTICO *Lactobacillus acidophilus* Y LA BACTERIA PATOGENA *Salmonella spp.*(ver Anexo N°11)

Realizar la inoculación de la bacteria patógena *Salmonella spp* a la carne de res (chuleta) en caso que no esté con presencia de dicho patógeno. (ver Anexo N° 4), si hay presencia de *Salmonella spp*, no se inoculara con el microorganismo patógeno (*Salmonella spp.*)

Pesar 25 g de cada una de las muestras analizadas para cada concentración (10^3 y 10^5 UFC/g) y tiempo en el que se realizaran los análisis (24, 48, 72 hr, 8 y 15 días). (Ver Anexo N°5)

Agregar 1.0 mL a cada una de las porciones de carne de res (chuleta) de las siguientes concentraciones 10^{-3} y 10^{-5} UFC/mL respectivamente del probiótico *Lactobacillus acidophilus* estandarizado.

Tomar 1.0 mL del microorganismo patógeno *Salmonella spp.* estandarizado de cada una de las concentraciones 10^{-3} y 10^{-5} UFC/mL, luego adicionar por separado a las porciones de carne de res (chuleta) anteriores, en las mismas diluciones.

Incubar a 4 °C y realizar conteos 24,48, 72 horas, 8 y 15 días, para cada uno de los microorganismos adicionados a la carne de res (chuleta).

4.8.6 RECUESTO DE *Lactobacillus acidophilus* EN MUESTRA DE CARNE RES (CHULETA) (ver anexo N°13)⁽⁶⁾⁽³¹⁾

Realizar el siguiente tratamiento de preparación de la muestra (ver Anexo N° 13):

Dilución 10^{-1} : Pesar asépticamente 25 g de la muestra en bolsa de polietileno estéril para trabajar. Adicionar 225mL del medio de pre-enriquecimiento estéril Caldo MRS y mezclado durante un 1 min a 260rpm en stomacher. Transferir asépticamente la mezcla homogeneizada a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca

A partir de la disolución anterior realizar una cascada de dilución de la siguiente manera:

- Dilución 10^{-2} : Transferir 10mL con una pipeta estéril, de la dilución 10^{-1} a un frasco que contiene 90mL de solución Caldo MRS (diluyente) y homogenizar durante 2 minutos.

- Dilución 10^{-3} : Transferir 10mL con una pipeta estéril, de la dilución 10^{-2} a un frasco que contiene 90mL de solución Caldo MRS (diluyente). Agitar la dilución para homogenizarla.

- Dilución 10^{-4} : Transferir 10mL con una pipeta estéril, de la dilución 10^{-3} a un frasco que contiene 90mL de solución Caldo MRS (diluyente). Agitar la dilución para homogenizarla.

- Dilución 10^{-5} : Transferir 10mL con una pipeta estéril, de la dilución 10^{-4} a un frasco que contiene 90mL de solución MRS (diluyente). Agitar la dilución para homogenizarla.

De la diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} transferir asépticamente 1 mL y distribuir en una placa de petri estéril. (Realizado por duplicado).

A las placas de petri con el inóculo agregar 15 mL de Agar MRS, distribuyendo homogéneamente el inóculo por la técnica del ocho.

Incubar en jarra de Anaerobiosis a 37°C durante 72 horas.

Examinar las placas a investigar la presencia de colonias típicas de Lactobacillus: Colonias blancas.

Realizar conteos en un cuenta colonias, cada 24, 48, 72hr, 8 y 15 días.

4.8.7 MEDICION DE pH (ver Anexo N°14)⁽²⁵⁾

- Tomar de la dilución 10^{-1} (ver anexo N°5)
- Calibrar el pH-metro modelo: GCP 22 CRISON
- Introducir el electrodo en buffer pH 7.0.
- Introducir el electrodo en buffer pH 4.0.
- Introducir el electrodo en la muestra de carne de res (chuleta) previamente diluida.
- Anotar la lectura de pH, cuando la temperatura se encontraba de un rango de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.8.8 Determinación de color Color

Color (Técnica color percibido)⁽²⁸⁾

Fundamento: Atributo de la respuesta. Luz percibida de un observador real al estímulo de un sistema visual por la energía radiante.

Procedimiento

- Tomar 25 g de carne de res (chuleta) y colocarla en un vidrio reloj.
- Llevar la muestra a un espacio con suficiente luz.
- Observar y tomar nota del color percibido a las 24, 48, 72 horas 8 y 15 días.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Se realizaron tres ensayos microbiológicos, cada uno con todas las determinaciones descritas en el diseño metodológico donde los resultados obtenidos fueron los siguientes:

5.1 Primer ensayo

Se realizó un primer ensayo con la inoculación del *Lactobacillus acidophilus* y *Salmonella spp* a las muestras de carne de res (chuleta), cuyos resultados son los siguientes.

5.1.1 Comprobación de ausencia o presencia de *Salmonella spp*

De las 16 muestras recolectadas en los ocho supermercados seleccionados, se realizó la comprobación de ausencia o presencia de *salmonella spp* a la carne de res (chuleta), basándonos en el cumplimiento de los criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos del Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08 Grupo de alimentos: carnes y productos cárnicos, subgrupo de alimentos: productos cárnicos diferentes al pollo, (ver Anexo N° 15) por lo que los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla N°3 Resultado del análisis microbiológico a la carne de res (chuleta), presencia o ausencia de *Salmonella spp*.

CODIGO	MUESTRA 1	MUESTRA 2
SS0001	Presencia	Presencia
SS0002	Presencia	Presencia
SS0003	Presencia	Presencia
SS0004	Presencia	Presencia
SS0005	Presencia	Presencia
SS0006	Presencia	Presencia
DJH01	Presencia	Presencia
DJH02	Presencia	Presencia

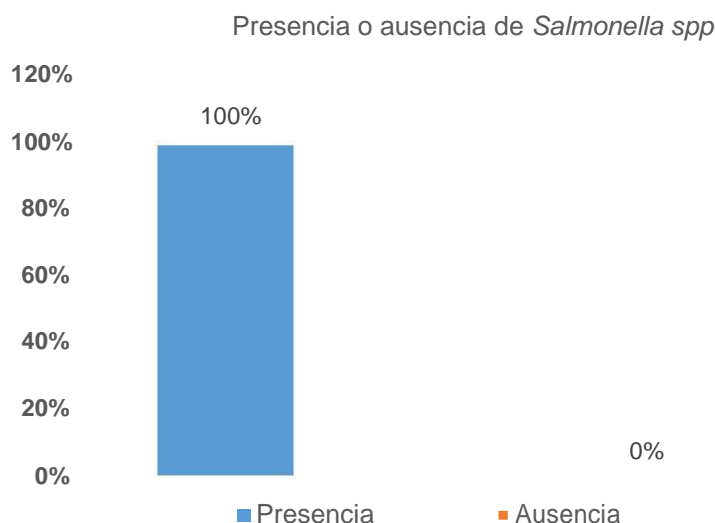


Figura N°1 Resultado del análisis microbiológico realizado a la carne de res (chuleta), para comprobar presencia o ausencia de *Salmonella spp*.

En la Figura N° 1 se reflejan los resultados de la Tabla N° 3, donde se observa que luego de los análisis realizados inicialmente en todas las muestras de carne de res (chuleta), para comprobar la presencia o ausencia de *Salmonella spp*, está presente el microorganismo patógeno *Salmonella spp* en el 100% de las muestras analizadas y que basados en el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08 Grupo de alimentos: carnes y productos cárnicos, subgrupo de alimentos: productos cárnicos diferentes al pollo, (ver Anexo N° 15), no cumple lo establecido.

5.1.2 Aislamiento, identificación y estandarización de *Salmonella spp* a las concentraciones 10^3 y 10^5 UFC/mL.

Con base en los resultados en cada una de las muestras analizadas, se aisló identificó y estandarizó *Salmonella spp*. siguiendo los procesos establecidos en la metodología (ver numeral 4.8.1), los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla N° 4: Resultados del aislamiento e identificación de *Salmonella spp.*

<i>Salmonella spp</i>	Porcentaje
<i>Salmonella spp</i>	100%
Otro	0%
TOTAL	100%

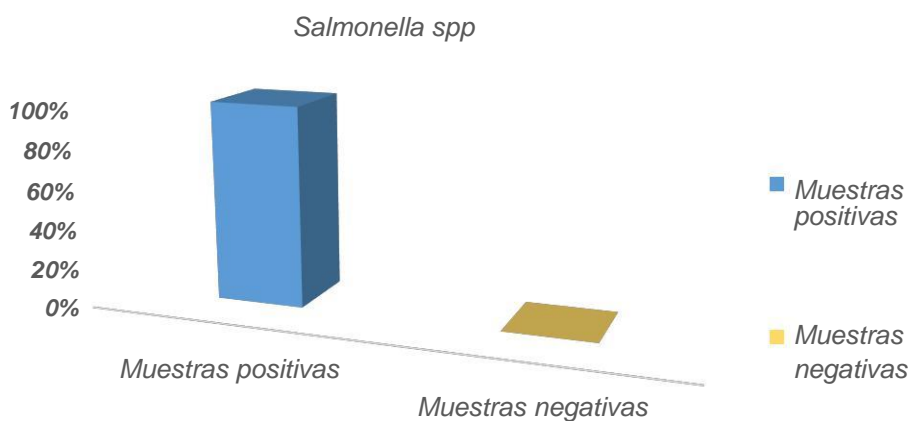


Figura N°2 Resultados del aislamiento e identificación de *Salmonella spp.*, del análisis microbiológico realizado a la carne de res (chuleta).

La figura N°2 refleja los resultados de la tabla N°4, demuestra que el tipo de *Salmonella spp* aislada e identificada siguiendo los procedimientos establecidos en los procesos de la metodología (ver numeral 4.8.1), de cada una de las muestras de carne de res (chuleta), corresponde con un 100% a *Salmonella spp* debido a las características observadas por dichos análisis. (Ver Anexo N°16).

5.1.3 Estandarización del microorganismo patógeno *Salmonella spp* de una cepa de laboratorio.

La estandarización de *Salmonella spp* se realizó de acuerdo a lo descrito en la metodología (ver numeral 4.8.3.) Los resultados obtenidos con esta estandarización se presentan en la tabla N°5.

Tabla N°5 Resultados de la estandarización de *Salmonella spp*

Absorbancia: 580 nm			
Concentración 10^3 UFC/mL		Concentración 10^5 UFC/mL	
Absorbancia obtenida	Conteo UFC/mL	Absorbancia obtenida	Conteo UFC/mL
0.304	1.9×10^6	0.506	2.3×10^6
0.298	2.4×10^6	0.489	2.1×10^6
0.278	1.9×10^6	0.499	1.9×10^6

5.1.4 Estandarización de *Lactobacillus acidophilus* y posterior adición a la carne en concentraciones de $10^3, 10^5$ UFC/mL, realizando conteos 24, 48, 72 horas, 8 y 15 días.

La estandarización del *Lactobacillus acidophilus* se realizó de acuerdo a lo descrito en la metodología (ver numeral 4.8.4). Los resultados obtenidos con esta estandarización se presentan en la siguiente tabla:

Tabla N°6 Resultados de la estandarización de la suspensión de *Lactobacillus acidophilus* por espectrometría.

Absorbancia: 620 nm			
Concentración 10^3 UFC/mL		Concentración 10^5 UFC/mL	
Absorbancia obtenida	Conteo UFC/mL	Absorbancia obtenida	Conteo UFC/mL
0.278	2.1×10^6	0.486	1.3×10^6
0.295	3.6×10^6	0.493	2.1×10^6
0.280	2.4×10^6	0.478	1.5×10^6
0.271	1.6×10^6	0.503	2.0×10^6
0.282	2.7×10^6	0.491	1.8×10^6

5.1.5 Inoculación de *Lactobacillus acidophilus* a las concentraciones 10^3 y 10^5 UFC/mL a las muestras de carne de res (chuleta).

Se realizó la inoculación a las muestras de carne de res (chuleta) adicionando 1.0 mL de la suspensión de *Lactobacillus acidophilus* a diferentes concentraciones y realizando conteos a las 24, 48, 72 horas 8 y 15 días, siguiendo los procesos descritos en la metodología (ver numeral 4.8.5). Los resultados obtenidos con la inoculación están resumidos en la tabla N°7.

Tabla N^o7 Resultados del recuento de *Lactobacillus acidophilus* a las concentraciones 10^3 y 10^5 UFC/mL

Tiempo	Promedio de Concentración 10^3 UFC/mL	Promedio de Concentración 10^5 UFC/mL
24 hr	5.1×10^4	5×10^6
48 hr	3.4×10^4	9×10^5
72 hr	2.50×10^2	0
8 días	0	0
15 días	0	0

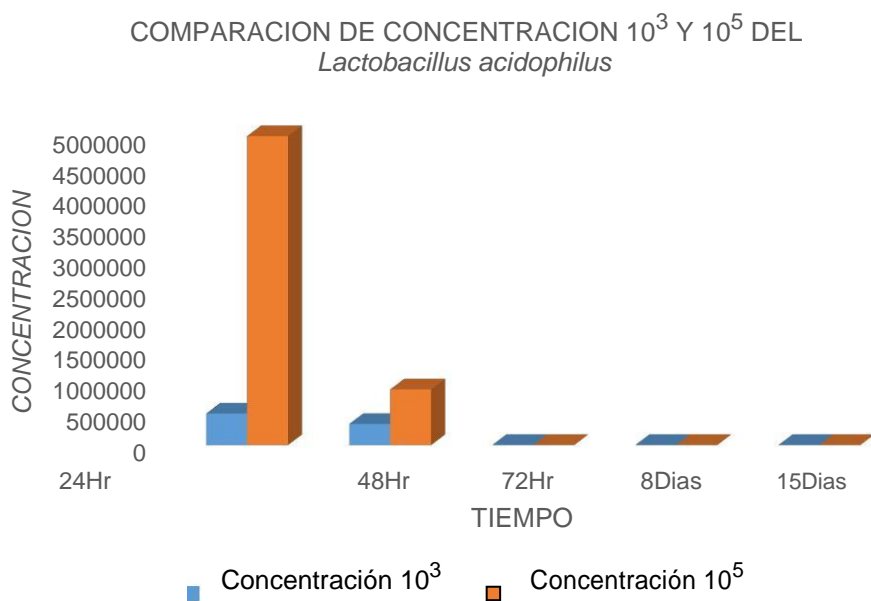


Figura N^o3 Resultado de la comparación del recuento de las concentraciones 10^3 y 10^5 UFC/mL de *Lactobacillus acidophilus*.

5.1.6 Inoculación de la bacteria *Salmonella spp.* En carne de res (chuleta) y posterior incubación por 24, 48, 72 horas, 8 y 15 días realizando identificación de la cepa patógena (presencia o ausencia).

Tabla N° 8 Resultado de la presencia o ausencia de *Salmonella spp* en las muestras de carne de res (chuleta) inoculadas con *Salmonella spp*.

Tiempo	Promedio de Concentración 10^3 UFC/mL	Promedio de Concentración 10^5 UFC/mL
24Hr	Presencia	Presencia
48Hr	Presencia	Presencia
72Hr	Presencia	Presencia
8Días	Presencia	Presencia
15Días	Presencia	Presencia

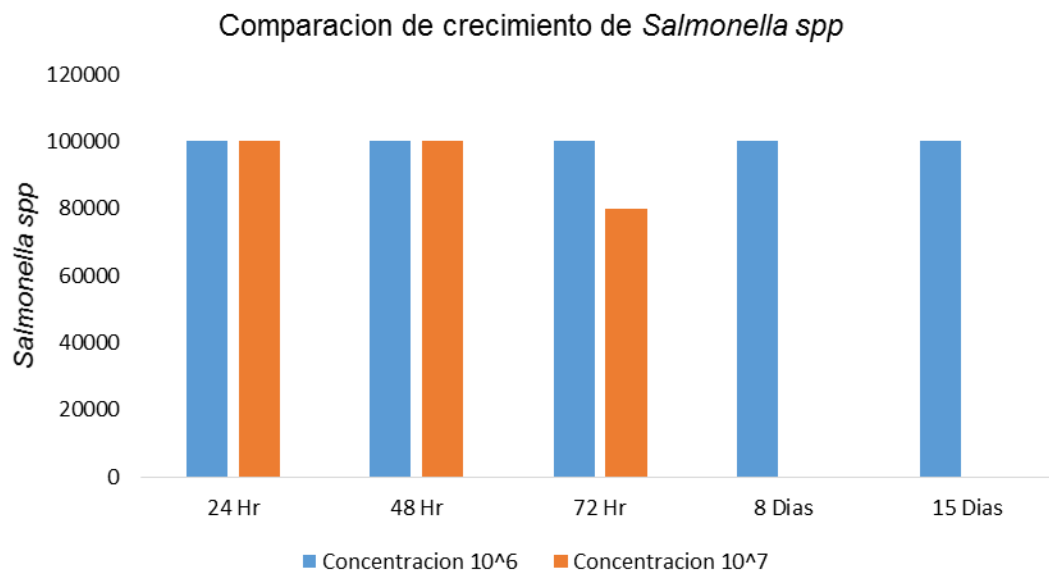


Figura N°4 Resultado de la comparación del recuento de la presencia o ausencia de *Salmonella spp* en las muestras de carne de res (chuleta).

La Figura N°4 refleja los resultados de las Tablas N°7 y N°8, por lo que al comparar las muestras de carne de res (chuleta), que fueron inoculadas a las concentraciones 10^3 y 10^5 UFC/mL tanto del *Lactobacillus acidophilus* como de *Salmonella spp.* que luego se colocaron en refrigeración a una temperatura de 4-8°C para simular el ambiente de almacenamiento en los supermercados, los resultados obtenidos demuestran que el *Lactobacillus acidophilus* no presentó crecimiento después de las 72 horas y que además la presencia de *Salmonella spp.* se mantuvo hasta los 15 días. A partir de estos resultados se puede inferir que probablemente la cantidad de bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas fueron insuficientes para inhibir al patógeno que estaba en una concentración mayor.

5.1.7 Determinación de pH, características organolépticas (color) y su tiempo de vida en anaquel de la carne de res (chuleta).

Tabla N°9 Resultados de la determinación de pH.

TIEMPO	CONCENTRACION 10^3 DEL <i>Lactobacillus acidophilus</i>	CONCENTRACION 10^5 DEL <i>Lactobacillus acidophilus</i>
24 Hr	5.93	5.93
48 Hr	5.77	5.79
72 Hr	5.51	5.59
8 DIAS	5.02	5.16
15 DIAS	4.78	4.84

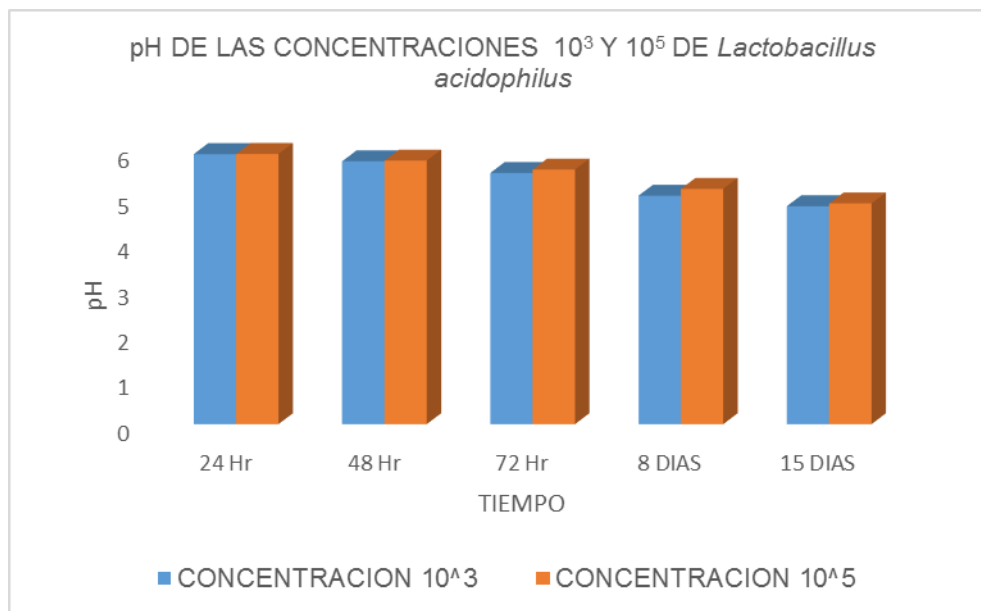


Figura N^o5 Resultado de la comparación de los resultados de pH de las concentración 10^3 y 10^5 .

La figura N^o5 es el resultado de los datos obtenidos en la tabla N^o 9 y muestra que los valores de pH disminuyeron considerablemente en ambas concentraciones durante los 15 días del estudio, debido a los compuestos producidos por las bacterias ácido lácticas como son: ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogeno y sustancias antimicrobianas (bacteriocinas)

Tabla N°10 Resultados de las características organolépticas (color) concentración 10^3 UFC/mL de la carne de res (chuleta)

Tiempo	Color rojo (%)	Color verde-azul (%)	Total (%)
24 horas	100	0	100
48 horas	87.5	12.5	100
72 horas	56.25	43.75	100
8 días	6.25	93.75	100
15 días	0	100	100

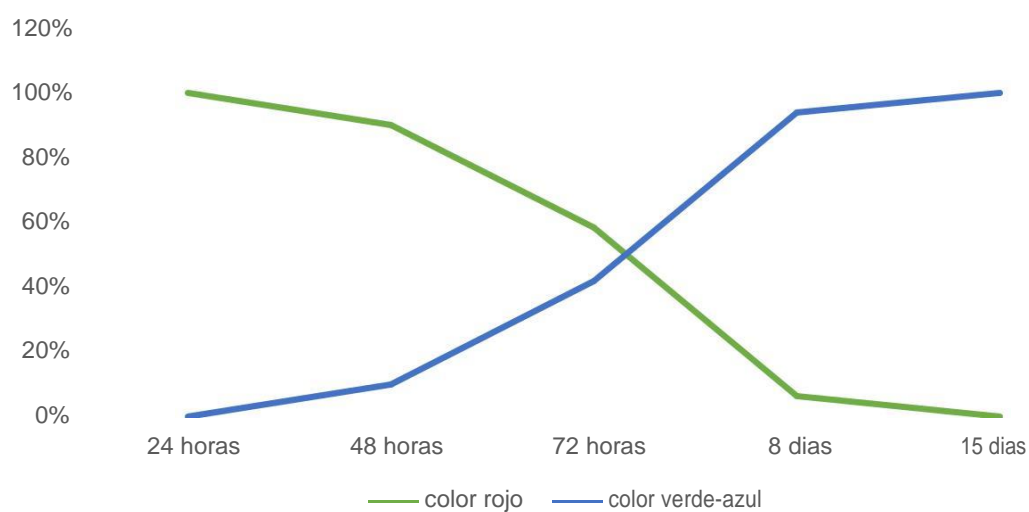


Figura N°6 Resultados de las características organolépticas (color) concentración 10^3 UFC/mL.

Tabla N°11 Resultados de las características organolépticas (color) concentración 10^5 UFC/mL

Tiempo	Color rojo (%)	Color verde-azul (%)	Total (%)
24 horas	100	0	100
48 horas	93.75	6.25	100
72 horas	62.5	37.5	100
8 días	6.25	93.75	100
15 días	0	100	100

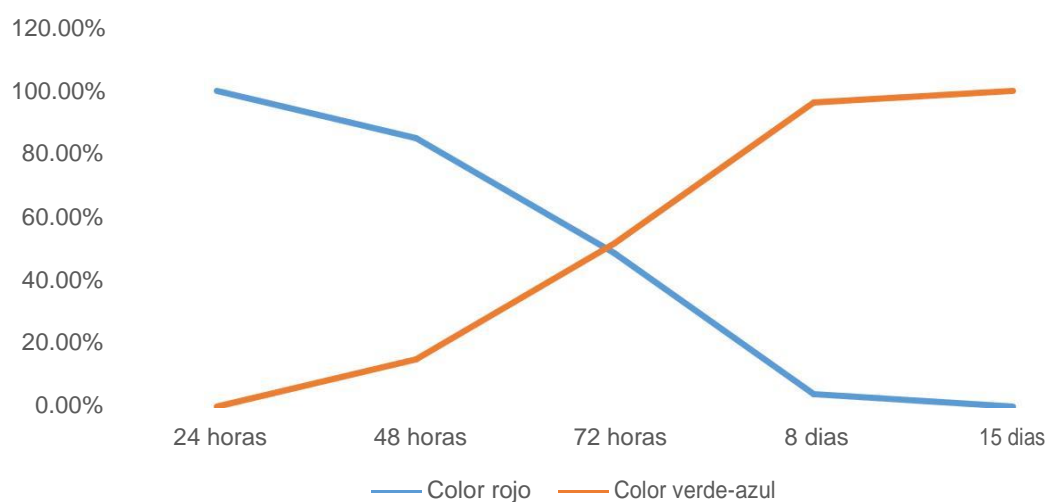


Figura N°7 Resultados de las características organolépticas (color) a la concentración 10^5 UFC/mL.

Las figuras N°6 y N°7 ejemplifican el resultado de los datos obtenido de las tablas N°10 y N°11 El color percibido en las muestras de carne de res (chuleta) del primer ensayo se vio alterado, producto del aumento del microorganismo patógeno *Salmonella spp*, que favoreció que la cantidad de mioglobina (que determina el color de la carne) disminuyera, debido que la mioglobina se

convirtió a sulfamioglobina y se formó color verde-azul, característica de alteración en las carnes por patógenos⁽²⁰⁾⁽²⁸⁾. El color en las muestras de carne de res (chuleta) analizadas mediante los procesos especificados en la metodología (ver numeral 4.8.8), cambiaron de color pasando de un rojo intenso a un verde-azul en un 100% que es un indicativo de la calidad de la carne.

5.2 Segundo ensayo

Con base en los resultados obtenidos en el primer ensayo se procedió a realizar un segundo ensayo, donde se inocularon las muestras de carne de res (chuleta) solamente con *Lactobacillus acidophilus* a las concentraciones de 10^6 y 10^7 UFC/mL debido a que en la carne de res (chuleta) estaba presente el microorganismo patógeno *Salmonella spp* en la concentración 10^5 UFC/mL y los resultados obtenidos son los que se muestran a continuación.

5.2.1 Comprobación de ausencia o presencia de *Salmonella spp*

De las 16 muestras recolectadas en los ocho supermercados seleccionados, se realizó la comprobación de ausencia o presencia de *Salmonella spp* a la carne de res (chuleta), basándose en el cumplimiento de los criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos del Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08 Grupo de alimentos: carnes y productos cárnicos, subgrupo de alimentos: productos cárnicos diferentes al pollo, (ver Anexo N^o 15) por lo que los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla N°12 Resultado del análisis microbiológico a la carne de res (chuleta) presencia o ausencia de *Salmonella spp.*

CODIGO	MUESTRA 1	MUESTRA 2
SS0001	Presencia	Presencia
SS0002	Presencia	Presencia
SS0003	Presencia	Presencia
SS0004	Presencia	Presencia
SS0005	Presencia	Presencia
SS0006	Presencia	Presencia
DJH01	Presencia	Presencia
DJH02	Presencia	Presencia

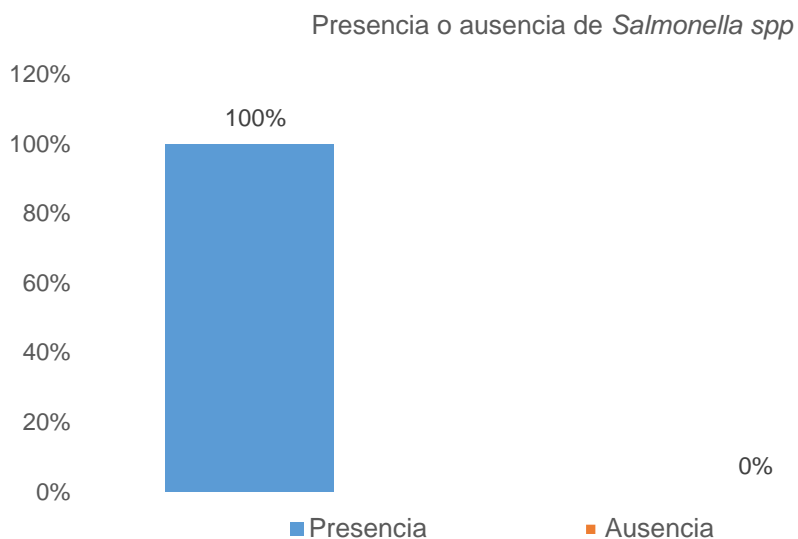


Figura N° 8 Resultado del análisis microbiológico realizado a la carne de res (chuleta), para comprobar presencia o ausencia de *Salmonella spp.p.*

La figura N° 8 refleja los resultados de la tabla N° 12, donde se observa que luego de los análisis realizados inicialmente en todas las muestras de carne de res (chuleta), para comprobar la presencia o ausencia de *Salmonella spp*, está

presente el microorganismo patógeno *Salmonella spp* en el 100% de las muestras analizadas y que además en base al Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08 Grupo de alimentos: carnes y productos cárnicos, subgrupo de alimentos: productos cárnicos diferentes al pollo, (ver Anexo N°15), no cumple lo establecido.

5.2.2 Aislamiento, identificación y estandarización de *Salmonella spp* a las concentraciones 10^3 y 10^5 UFC/mL.

Con base en los resultados anteriores (ver tabla N°12 y figura N° 8) en cada una de las muestras analizadas que resultaron con presencia de *Salmonella spp*, se aislaron identificaron y estandarizaron siguiendo los procesos establecidos en la metodología (ver numeral 4.8.2), los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla N° 13 Resultados del aislamiento e identificación de *Salmonella spp*.

<i>Salmonella spp</i>	Porcentaje
<i>Salmonella spp</i>	100%
Otro	0%
TOTAL	100%

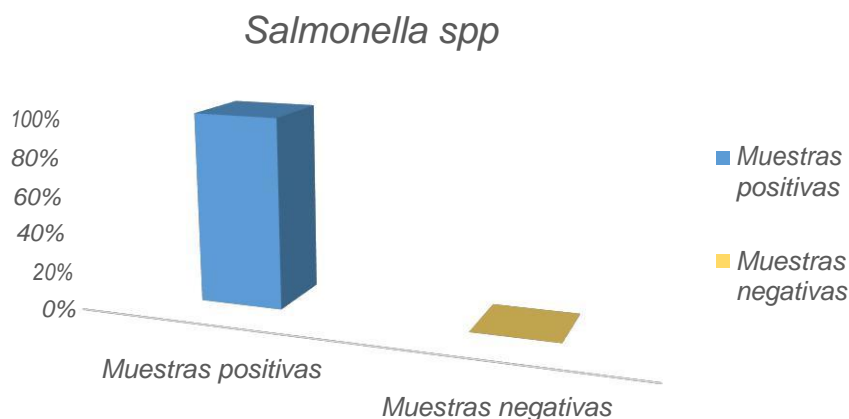


Figura N^o9 Resultado del análisis microbiológico realizado a la carne de res (chuleta), para comprobar presencia o ausencia de *Salmonella spp.*

La figura N^o9 refleja los resultados de la tabla N^o 13, demuestra que el tipo de *Salmonella spp* aislada e identificada siguiendo los procedimientos establecidos en la metodología (ver numeral 4.8.2), de cada una de las muestras de carne de res (chuleta), corresponde con un 100% a *Salmonella spp.* (Ver Anexo N^o17).

5.2.3 Estandarización del microorganismo patógeno *Salmonella spp* presente en la carne de res (chuleta)

La estandarización de *Salmonella spp* se realizó a las muestras de carne de res (chuleta) que fueron aisladas e identificada, según lo obtenido en la Tabla N^o13 y de acuerdo a lo descrito en la metodología (ver numeral 4.8.3) Los resultados obtenidos con esta estandarización se presentan en la tabla N^o14.

Tabla N° 14 Resultados de la estandarización de *Salmonella spp.* que contiene la carne de res (chuleta)

Absorbancia: 580 nm	
Concentración 10^5 UFC/mL	
Absorbancia obtenida	Conteo UFC/mL
0.495	1.3×10^6
0.492	2.1×10^6
0.486	1.5×10^6
0.501	2.0×10^6
0.489	1.8×10^6

Según la tabla N° 14 los resultados demuestran que las muestras de carne de res (chuleta), que fueron aisladas e identificadas, tienen una concentración igual a 10^5 UFC/mL, y no tienen la concentración 10^3 UFC/mL que se buscaba.

5.2.4 Estandarización de *Lactobacillus acidophilus* y posterior adición a la carne en concentraciones de $10^6, 10^7$ UFC/mL, realizando conteos 24, 48, 72 horas, 8 y 15 días.

La estandarización del *Lactobacillus acidophilus* se realizó de acuerdo a lo descrito en la metodología (ver numeral 4.8.4). Los resultados obtenidos con esta estandarización se presentan en la tabla N°15

Tabla N°15 Resultados de la estandarización de *Lactobacillus acidophilus* a las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL

Absorbancia: 620 nm			
Concentración 10^6 UFC/mL		Concentración 10^7 UFC/mL	
Absorbancia obtenida	Conteo UFC/mL	Absorbancia obtenida	Conteo UFC/mL
0.635	3×10^6	0.701	6×10^7
0.568	2×10^6	0.689	5×10^7
0.601	3×10^6	0.693	7×10^7

5.2.5 Inoculación de *Lactobacillus acidophilus* a las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL a las muestras de carne de res (chuleta).

Se realizó la inoculación a las muestras de carne de res (chuleta) con el *Lactobacillus acidophilus* a diferentes concentraciones realizando conteos a las 24, 48, 72 horas y 8 y 15 días, siguiendo los procesos descritos en la metodología (ver numeral 4.8.5). Los resultados obtenidos con la inoculación están resumidos en la tabla N°16.

Tabla N°16 Resultados del recuento de *Lactobacillus acidophilus* a las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL.

Tiempo	Promedio de Concentración 10^6 UFC/mL	Promedio de Concentración 10^7 UFC/mL
24Hr	2.3×10^7	2.8×10^8
48Hr	2.3×10^7	2.5×10^8
72Hr	2.2×10^7	2.2×10^8
8Dias	2.0×10^7	1.8×10^8
15Dias	1.0×10^7	1.4×10^8

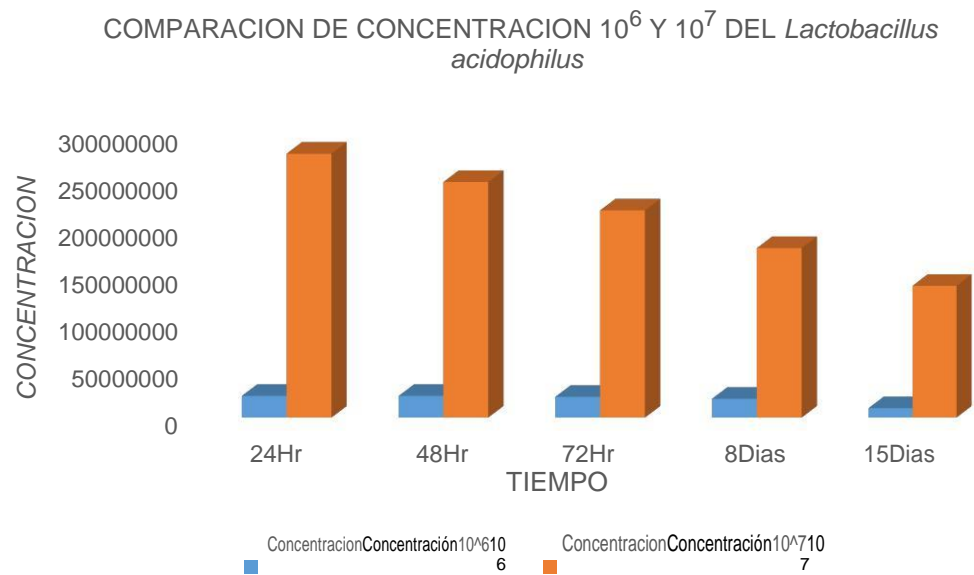


Figura N^o10 Resultados del recuento de *Lactobacillus acidophilus* a las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL.

5.2.6 Presencia o ausencia de la bacteria *Salmonella spp.* En carne de res (chuleta) y posterior incubación por 24, 48,72 horas 8 y 15 días realizando identificación de la cepa patógena.

Tabla N^o 17 Resultado de la presencia o ausencia de *Salmonella spp* en las muestras de carne de res (chuleta).

Tiempo	Promedio de Concentración 10 ⁶ UFC/mL	Promedio de Concentración 10 ⁷ UFC/mL
24Hr	Presencia	Presencia
48Hr	Presencia	Presencia
72Hr	Presencia	Presencia
8 Días	Presencia	Ausencia
15 Días	Presencia	Ausencia

COMPARACION DE CRECIMIENTO DE *Salmonella spp*

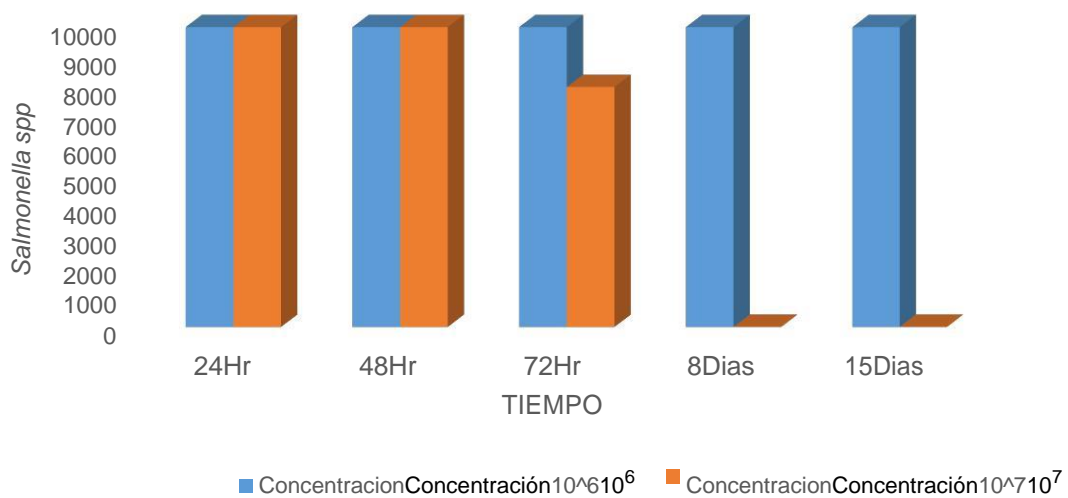


Figura N^o 11 Resultado de la comparación del recuento de la presencia o ausencia de *Salmonella spp* en las muestras de carne de res (chuleta).

Las Figuras N° 10 y N°11 reflejan los datos de las Tablas N°16 y N°17, muestran los resultados de la comparación de las muestras de carne de res (chuleta), que fueron inoculadas a las concentraciones 10^6 y 10^7 de *Lactobacillus acidophilus* y que no fueron inoculadas con *Salmonella spp.* debido a que la carne de res (chuleta) ya tenía una concentración conocida de 10^5 de *Salmonella spp.* y que fueron colocadas en refrigeración a una temperatura entre 4-8°C simulando las condiciones de almacenamiento (anaquel) de los supermercados, los resultados demuestran que el *Lactobacillus acidophilus* se mantuvo presente los 15 días pero con una leve disminución en su crecimiento tanto en las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL. La presencia de *Salmonella spp.* se mantuvo en la carne que tenía la concentración 10^6 del *Lactobacillus acidophilus* mientras que la carne que tenía la concentración 10^7 de *Lactobacillus acidophilus* estuvo presente hasta 72 horas pero ya no se observó su presencia a los 8 y 15 días .

5.2.7 Determinación de pH, características organolépticas (color) y su tiempo de vida en anaquel de la carne de res (chuleta)

Tabla N°18 Resultados de la determinación de pH.

TIEMPO	CONCENTRACION 10^6 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	CONCENTRACION 10^7 <i>Lactobacillus acidophilus</i>
24 hr	5.99	5.96
48 hr	6.09	6.07
72 hr	6.18	6.20
8 DIAS	6.26	6.28
15 DIAS	6.33	6.34

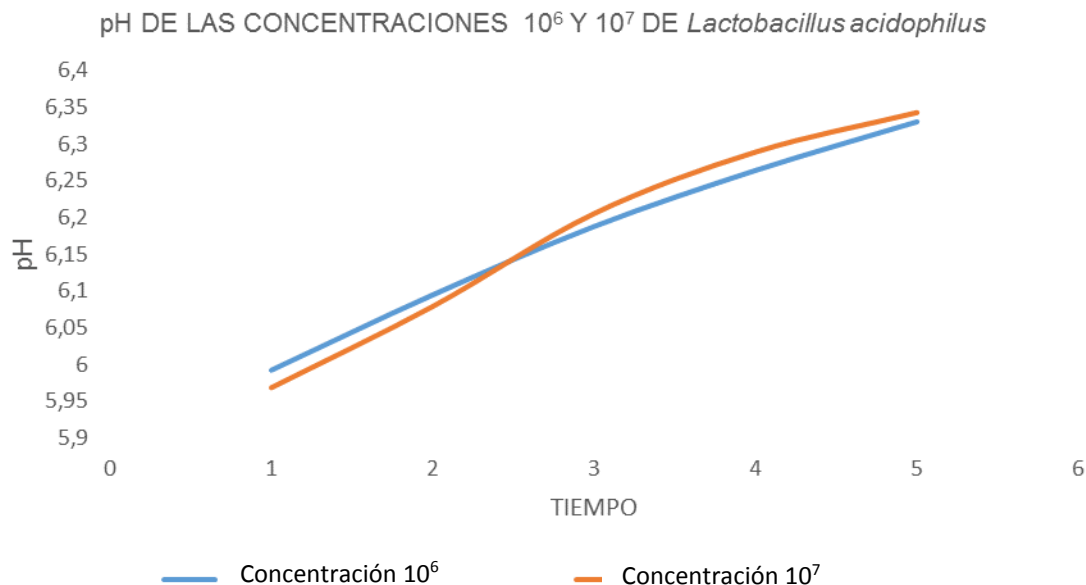


Figura N° 12 Resultados de pH de las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL

La figura N° 12 es el resultado de los datos obtenidos en la tabla N°18 y muestra que los valores de pH aumentaron considerablemente en ambas concentraciones durante los 15 días del estudio pero no pasaron los límites establecidos para carne de res fresca.

Tabla N° 19 Resultados de las características organolépticas (color)
concentración 10^6 UFC/mL

Tiempo	Color rojo	Color verde-azul	Total
24 horas	100%	0%	100%
48 horas	93.75%	6.25%	100%
72 horas	81.25%	18.75%	100%
8 días	18.75%	81.25%	100%
15 días	6.25%	93.75%	100%

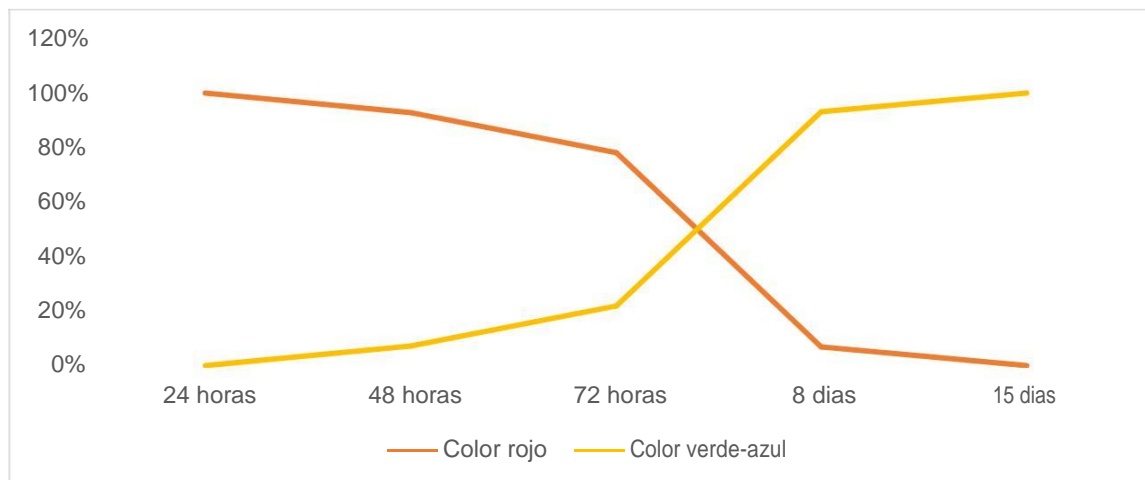


Figura N° 13 Resultados de las características organolépticas (color) a la concentración 10^6 UFC/mL

Tabla N°20. Resultados de las características organolépticas (color) concentración 10^7 UFC/mL

Tiempo	Color rojo	Color verde-azul	Total
24 horas	100%	0%	100%
48 horas	100%	0%	100%
72 horas	100%	0%	100%
8 días	81.25%	18.75%	100%
15 días	68.75%	31.25%	100%

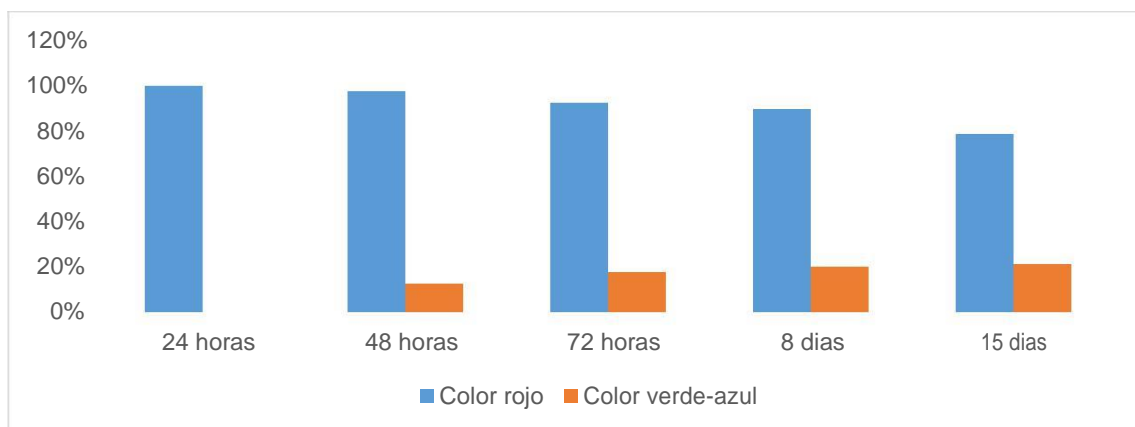


Figura N° 13 Grafico de resultados de las características organolépticas (color) a la concentración 10^7 UFC/MI

Según la figura N° 12 y 13 que es el resultado de los datos obtenido de la tabla N°19 y 20, el color de la carne de res (chuleta) realizada en el segundo ensayo mantuvo sus características normales en la concentración 10^7 UFC/mL hasta los 15 días por lo que se puede inferir que el *Lactobacillus acidophilus* logro ejercer su propiedad bioconservadora sobre *Salmonella spp* y ayuda a mantener las características de la carne de res (chuleta) con su color normal (roja), en las muestras de carne de res (chuleta) analizadas mediante los procesos especificados en la metodología (ver numeral 4.8.7), con respecto a la concentración 10^6 UFC/mL cambiaron de color pasando de un rojo intenso a un verde-azul en un 100%, en cambio en la concentración 10^7 UFC/mL el color rojo no desapareció en su totalidad se mantuvo en la mayoría de las muestras durante los 15 días del análisis debido a la producción de ácido láctico y bacteriocinas producidas por el *Lactobacillus acidophilus*.

5.3 Tercer ensayo

5.3.1 Comprobación de ausencia o presencia de *Salmonella spp*

De las 16 muestras recolectadas en los ocho supermercados seleccionados, se realizó la comprobación de ausencia o presencia de *salmonella spp* a la carne de res (chuleta), basándonos en el cumplimiento de los criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos del Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08 Grupo de alimentos: carnes y productos cárnicos, subgrupo de alimentos: productos cárnicos diferentes al pollo, (ver anexo N^o 15) por lo que los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla N^o21 Resultado del análisis microbiológico a la carne de res (chuleta), presencia o ausencia de *Salmonella spp*.

CODIGO	MUESTRA 1	MUESTRA 2
SS0001	Presencia	Presencia
SS0002	Presencia	Presencia
SS0003	Presencia	Presencia
SS0004	Presencia	Presencia
SS0005	Presencia	Presencia
SS0006	Presencia	Presencia
DJH01	Presencia	Presencia
DJH02	Presencia	Presencia

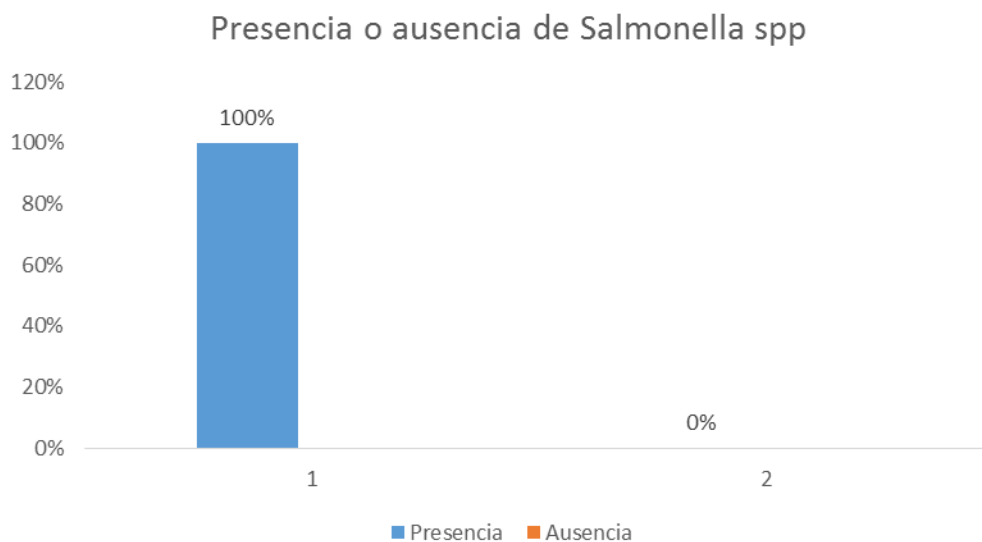


Figura N° 14 Resultado del análisis microbiológico realizado a la carne de res (chuleta), para comprobar presencia o ausencia de *Salmonella* spp

En la figura N° 14 se reflejan los resultados de la tabla N° 21, donde se observa que luego de los análisis realizados inicialmente en todas las muestras de carne de res (chuleta), para comprobar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp, está presente el microorganismo patógeno *Salmonella* spp en el 100% de las muestras analizadas y que además en base al Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08 Grupo de alimentos: carnes y productos cárnicos, subgrupo de alimentos: productos cárnicos diferentes al pollo, (ver Anexo N° 15), no cumple lo establecido.

5.3.2 Aislamiento, identificación y estandarización de *Salmonella spp* a las concentraciones 10^3 y 10^5 UFC/mL.

En base a los resultados anteriores (ver tabla N^o21 y figura N^o 14) a cada una de las muestras analizadas que resultaron con presencia de *Salmonella spp*, se aislaron identificaron y estandarizaron siguiendo los procesos establecidos en la metodología (ver numerales 4.8.1 al 4.8.2), los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla N^o 22 Resultados del aislamiento e identificación de *Salmonella spp*.

<i>Salmonella spp</i>	Porcentaje
<i>Salmonella spp</i>	100%
Otro	0%
TOTAL	100%

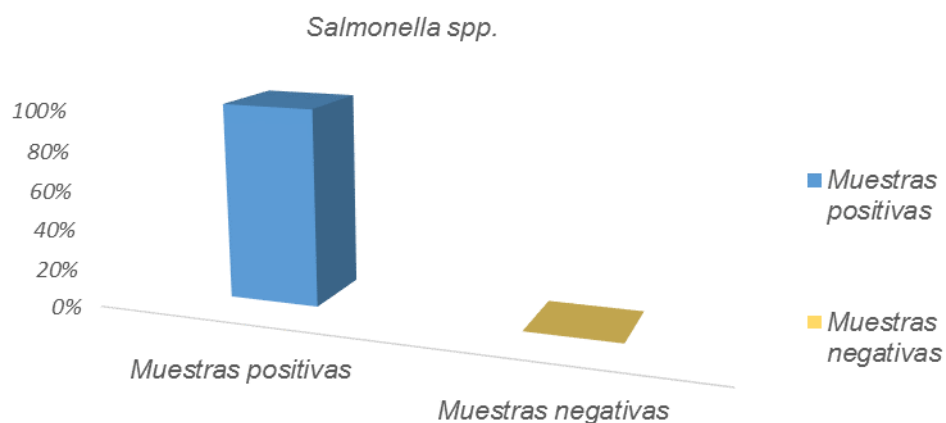


Figura N^o 15 Resultados del aislamiento e identificación de *Salmonella spp*, del análisis microbiológico realizado a la carne de res (chuleta)..

La figura N° 15 refleja los resultados de la tabla N°22, demuestra que el tipo de *Salmonella spp* aislada e identificada siguiendo los procedimientos establecidos en los procedimientos de la metodología (ver numeral 4.8.2) de cada una de las muestras de carne de res (chuleta), corresponde con un 100% a *Salmonella spp*. debido a las características observadas por dichos análisis. (Ver Anexo N°18)

5.3.3 Estandarización del microorganismo patógeno *Salmonella spp* presente en la carne de res (chuleta)

La estandarización de *Salmonella spp* se realizó a las muestras de carne de res (chuleta) que fueron aisladas e identificada, según lo obtenido en la tabla N°22 y de acuerdo a lo descrito en la metodología (ver numeral 4.8.3). Los resultados obtenidos con esta estandarización se presentan en la tabla N°23.

Tabla N°23 Resultados de la estandarización de *Salmonella spp* que contiene la carne de res (chuleta)

Absorbancia: 580 nm	
Concentración 10^5 UFC/MI	
Absorbancia obtenida	Conteo UFC/mL
0.495	1.3×10^6
0.492	2.1×10^6
0.486	1.5×10^6
0.501	2.0×10^6
0.489	1.8×10^6

Según la tabla N°23 los resultados demuestran que las muestras de carne de res (chuleta), que fueron aisladas e identificadas, tienen una concentración igual a 10^5 UFC/mL.

5.3.4 Estandarización de *Lactobacillus acidophilus* y posterior adición a la carne en concentraciones de $10^6, 10^7$ UFC/mL, realizando conteos 24, 48, 72 horas, 8 y 15 días.

La estandarización del *Lactobacillus acidophilus* se realizó de acuerdo a lo descrito en la metodología (ver numeral 4.8.4). Los resultados obtenidos con esta estandarización se presentan en la tabla N° 15.

5.3.5 Inoculación de *Lactobacillus acidophilus* de las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL a las muestras de carne de res (chuleta).

Se realizó la inoculación a las muestras de carne de res (chuleta) con el *Lactobacillus acidophilus* a diferentes concentraciones realizando conteos a las 24, 48, 72 horas 8 y 15 días, siguiendo los procesos descritos en la metodología (ver numeral 4.8.4). Los resultados obtenidos con la inoculación están resumidos en la tabla siguiente:

Tabla N°24 Resultados del recuento de *Lactobacillus acidophilus* a las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL

Tiempo	Promedio de Concentración 10^6 UFC/mL	Promedio de Concentración 10^7 UFC/mL
24Hr	2.3×10^7	2.8×10^8
48Hr	2.3×10^7	2.5×10^8
72Hr	2.2×10^7	2.2×10^8
8Dias	2.0×10^7	1.8×10^8
15Dias	1.0×10^7	1.4×10^8

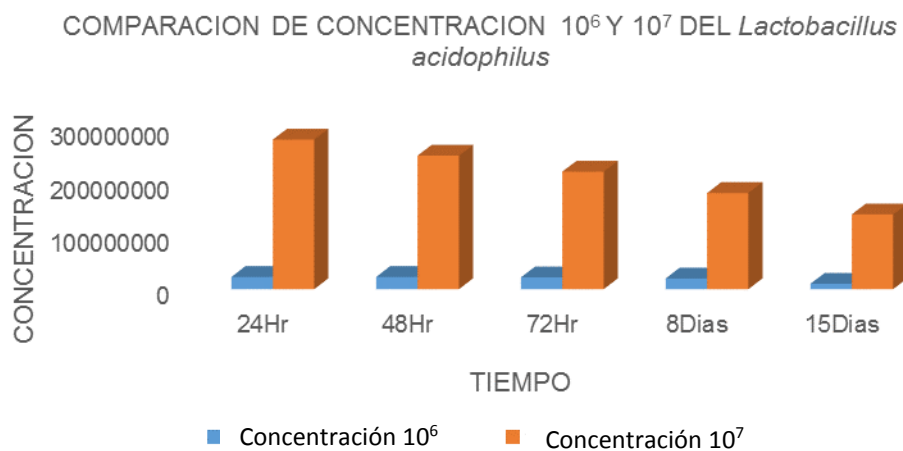


Figura N° 16 Resultados del recuento de *Lactobacillus acidophilus* a las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL en las muestras de carne de res (chuleta).

5.3.6 Presencia o ausencia de la bacteria *Salmonella spp.* En carne de res (chuleta) y posterior incubación por 24, 48,72 horas 8 y 15 días realizando identificación de la cepa patógena.

Tabla N° 25 Resultado de la presencia o ausencia de *Salmonella spp* en las muestras de carne de res (chuleta)

Tiempo	Promedio de Concentración 10^6 UFC/mL	Promedio de Concentración 10^7 UFC/mL
24Hr	Presencia	Presencia
48Hr	Presencia	Presencia
72Hr	Presencia	Presencia
8 Días	Ausencia	Ausencia
15 Días	Ausencia	Ausencia

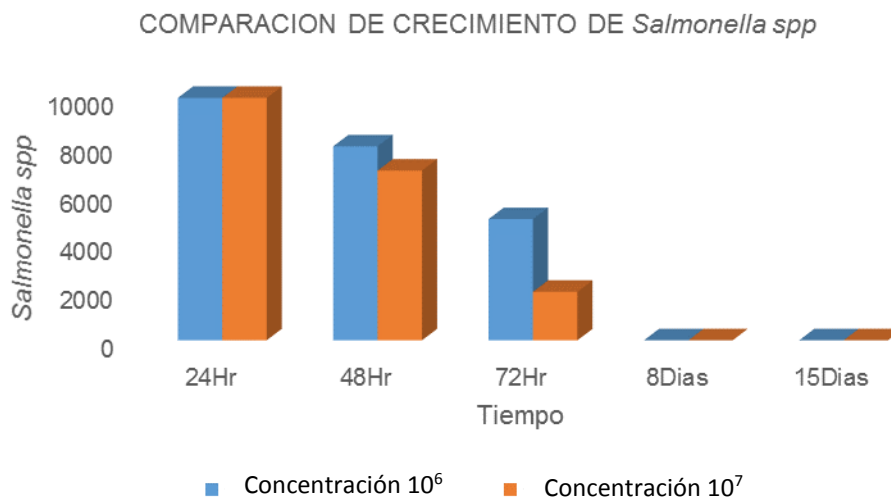


Figura N° 17 Resultado de la comparación del recuento de la presencia o ausencia de *Salmonella spp* en las muestras de carne de res (chuleta).

Las Figuras N° 16 y 17 reflejan los datos de las Tablas N°24 y N°25, muestran que los resultados de la comparación de la carne de res (chuleta) que fueron inoculadas a las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL con *Lactobacillus acidophillus* y no se inocularon con *Salmonella spp*. debido a que la carne de res (chuleta) ya tenía una concentración conocida 10^5 UFC/mL de *Salmonella spp* que luego fueron colocadas de la siguiente manera: las muestras de carne de res (chuleta) con la concentración 10^6 UFC/mL de *Lactobacillus acidophillus* se colocó a una temperatura inferior entre $0-4^{\circ}\text{C}$ y las muestras de carne de res (chuleta) con la concentración 10^7 UFC/mL de *Lactobacillus acidophillus* se colocaron en refrigeración a una temperatura $4-8^{\circ}\text{C}$ para simular las condiciones de almacenamiento y anaquel respectivamente. Los resultados demuestran que en ambas concentraciones hubo crecimiento de *Lactobacillus acidophillus* en los 15 días del estudio y que además disminuyó la presencia de *Salmonella spp* a los 8 y 15 días.

5.3.7 Determinación de pH, características organolépticas (color) y su tiempo de vida en anaquel de la carne de res (chuleta)

Tabla N°26 Resultados de la determinación de pH.

TIEMPO	CONCENTRACION 10^6 UFC/mL <i>Lactobacillus acidophilus</i>	CONCENTRACION 10^7 UFC/mL <i>Lactobacillus acidophilus</i>
24 Hr	5.84	6.00
48 Hr	5.96	6.10
72 Hr	6.07	6.19
8 DIAS	6.21	6.28
15 DIAS	6.29	6.37

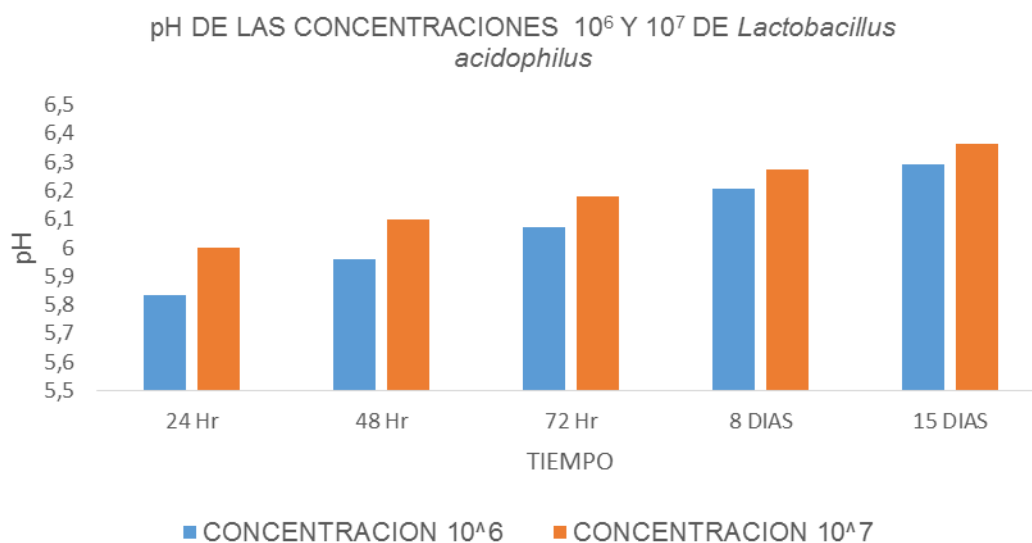


Figura N° 18 Resultado de la comparación de pH de las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL de *Lactobacillus acidophilus*.

La Figura N° 18 es el resultado de los datos obtenidos en la Tabla N°26 y muestra que los valores de pH aumentaron sensiblemente en ambas concentraciones durante los 15 días del estudio, pero se encuentra dentro de los valores establecidos de pH, para mantener las características organolépticas de la carne de res (chuleta) (19) (21) (28).

Tabla N°27 Resultados de las características organolépticas (color) de las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL de *Lactobacillus acidophilus*

	Concentración 10^6 UFC/mL <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Concentración 10^7 UFC/mL <i>Lactobacillus acidophilus</i>
Tiempo	Color rojo	Color rojo
24 horas	100%	100%
48 horas	100%	100%
72 horas	100%	100%
8 días	100%	100%
15 días	100%	100%

Resultados de color en la carne de res (chuleta)

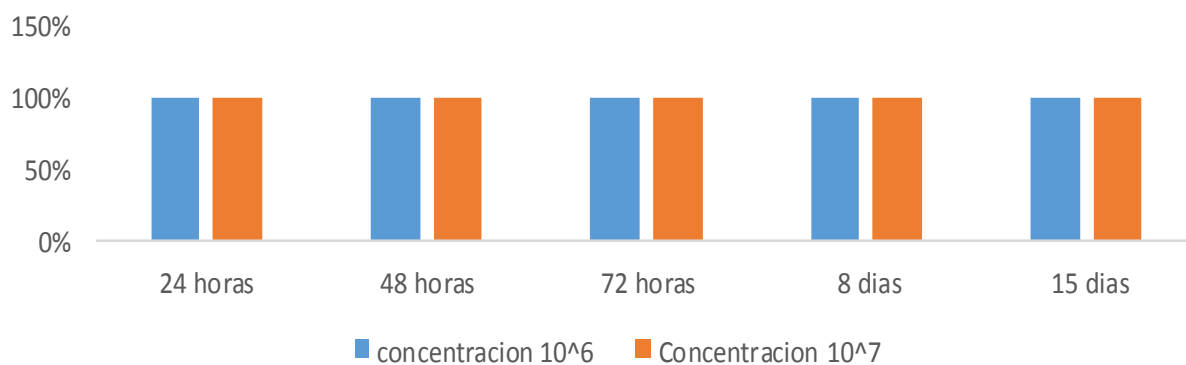


Figura N° 19 Resultados de las características organolépticas (color) de las concentraciones 10^6 y 10^7 UFC/mL de *Lactobacillus acidophilus*.

La Figura N° 19 refleja los resultados de la Tabla N° 27 donde demuestra que el color se mantuvo durante los 15 días del desarrollo del análisis a las muestras de carne de res (chuleta), ya que no se vio afectado por los dos rangos de temperatura a las que fueron sometidas las muestras

Tabla N° 28 Resumen de resultados del primer ensayo.

ENSAYOS	CONDICIONES	PRESENCIA O AUSENCIA DE <i>Salmonella spp</i>	IDENTIFICACION Y ESTANDARIZACION DE <i>Salmonella spp.</i>	ESTANDARIZACION DE <i>Lactobacillus acidophilus</i>	RECUENTO DE <i>Lactobacillus acidophilus</i>			PRESENCIA O AUSENCIA DE <i>Salmonella spp.</i>		pH	
					TIEMPO	10 ³ UFC/mL	10 ⁵ UFC/mL	10 ³ UFC/mL	10 ⁵ UFC/mL	10 ³ UFC/mL	10 ⁵ UFC/mL
PRIMER ENSAYO	Se colocaron las muestras a refrigeración a una temperatura de 4-8°C	PRESENCIA	Se identificó en la carne de res (chuleta) a <i>Salmonella spp</i> a una concentración de 10 ⁵ UFC/mL, donde se le agrego a las muestras concentraciones de <i>Salmonella spp</i> a 10 ³ y 10 ⁵ UFC/mL teniendo al final en las muestras con concentraciones de 10 ⁸ y 10 ¹⁰ UFC/mL	Se estandarizó el <i>Lactobacillus acidophilus</i> a concentraciones de 10 ³ y 10 ⁵ UFC/mL							
					24 Hr	510E3	5E6	PRESENCIA	PRESENCIA	5.93	5.93
					48 Hr	340E3	9E6	PRESENCIA	PRESENCIA	5.77	5.79
					72 Hr	250	0	PRESENCIA	PRESENCIA	5.51	5.59
					8 Días	0	0	PRESENCIA	PRESENCIA	5.02	5.16
					15 Días	0	0	PRESENCIA	PRESENCIA	4.78	4.84

Tabla N° 29 Resumen de resultados del segundo ensayo.

ENSAYOS	CONDICIONES	PRESENCIA O AUSENCIA DE <i>Salmonella spp</i>	IDENTIFICACION Y ESTANDARIZACION DE <i>Salmonella spp.</i>	ESTANDARIZACION DE <i>Lactobacillus acidophilus</i>	RECUEENTO DE <i>Lactobacillus acidophilus</i>			PRESENCIA O AUSENCIA DE <i>Salmonella spp.</i>		pH	
					TIEMPO	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL
SEGUNDO ENSAYO	Se colocaron las muestras de concentración 10 ⁶ y 10 ⁷ UFC/mL de <i>Lactobacillus acidophilus</i> en refrigeración a una temperatura de 4-8° C	PRESENCIA	Se identificó en la carne de res (chuleta) a <i>Salmonella spp</i> a una concentración de 10 ⁵ UFC/mL.	Se estandarizó el <i>Lactobacillus acidophilus</i> a concentraciones de 10 ⁶ y 10 ⁷ UFC/mL	24 Hr	23E6	28E7	PRESENCIA	PRESENCIA	5.99	5.96
					48 Hr	23E6	25E7	PRESENCIA	PRESENCIA	6.09	6.07
					72 Hr	22E6	22E7	PRESENCIA	PRESENCIA	6.18	6.20
					8 Días	20E6	18E7	PRESENCIA	PRESENCIA	6.26	6.28
					15 Días	10E6	14E7	PRESENCIA	PRESENCIA	6.33	6.34

Tabla N° 30 Resumen de resultados del tercer ensayo

ENSAYOS	CONDICIONES	PRESENCIA O AUSENCIA DE <i>Salmonella spp</i>	IDENTIFICACION Y ESTANDARIZACION DE <i>Salmonella spp.</i>	ESTANDARIZACION DE <i>Lactobacillus acidophilus</i>	RECUEENTO DE <i>Lactobacillus acidophilus</i>			PRESENCIA O AUSENCIA DE <i>Salmonella spp.</i>		pH	
					TIEMPO	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL
TERCER ENSAYO	Se colocaron las muestras de concentración 10 ⁶ UFC/mL de <i>Lactobacillus acidophilus</i> a congelación (temperatura de 0-4°C) y las concentraciones de 10 ⁷ UFC/mL en refrigeración a una temperatura de 4-8°C	PRESENCIA	Se identificó en la carne de res (chuleta) a <i>Salmonella spp</i> a una concentración de 10 ⁶ UFC/mL.	Se estandarizó el <i>Lactobacillus acidophilus</i> a concentraciones de 10 ⁶ y 10 ⁷ UFC/mL	24 Hr	23E6	28E7	PRESENCIA	PRESENCIA	5.84	6.0
					48 Hr	23E6	25E7	PRESENCIA	PRESENCIA	5.96	6.09
					72 Hr	22E6	22E7	PRESENCIA	PRESENCIA	6.07	6.18
					8 Días	20E6	18E7	PRESENCIA	PRESENCIA	6.21	6.28
					15 Días	10E6	14E7	PRESENCIA	PRESENCIA	6.29	6.37

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Las muestras de carne de res (chuleta), analizadas no cumplieron los requerimientos microbiológicos para inocuidad de alimentos establecidos en el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08 Grupo de alimentos: carnes y productos cárnicos, subgrupo de alimentos: productos cárnicos diferentes al pollo en cuanto se comprobó la presencia de *Salmonella spp* en todas las muestras analizadas siendo este un criterio de riesgo tipo A, cuyo límite máximo establecido en dicho reglamento es la ausencia.
2. En el primer ensayo la concentración (10^8 UFC/mL) de *Salmonella spp*. fue superior a la concentración 10^5 UFC/mL esto ocasionó que disminuyera el crecimiento del *Lactobacillus acidophilus* a partir de las 72 horas y provocó que la carne entrara en su etapa de descomposición por lo que las concentraciones del *Lactobacillus acidophilus* 10^3 y 10^5 UFC/mL no fueron lo suficiente para realizar su efecto bioconservador de la carne de res.
3. El *Lactobacillus acidophilus* a una concentración 10^6 UFC/mL logra inhibir el crecimiento de *Salmonella spp* a concentración 10^5 UFC/mL, y la condición óptima para que ejerza su efecto bioconservador es a temperaturas entre 0-4°C (congelación) a los 8 y 15 días. En estas condiciones la carne mantuvo la característica de color sin alteración.
4. El *Lactobacillus acidophilus* a una concentración 10^7 UFC/mL logró inhibir el crecimiento de *Salmonella spp* a concentración 10^5 UFC/mL y realizó la bioservación a temperaturas de refrigeración (4-8°C), por

lo que el *Lactobacillus acidophilus* a esas condiciones ejerce su actividad bioconservadora en la carne de res.

5. El pH de la carne de res (chuleta) es alterado por la incorporación del *Lactobacillus acidophilus* a concentraciones 10^3 y 10^5 UFC/mL probablemente por alguna interacción con la bacteria patógena *Salmonella spp* en concentración 10^8 y 10^{10} UFC/mL.

6. Las bacterias ácido lácticas como el *Lactobacillus acidophilus* pueden ser utilizadas en el método de la bioconservación a condiciones del 5% de CO₂ utilizando sobres de anaerobiosis certificados y a temperaturas controladas de refrigeración y congelación, para disminuir el número de bacterias patógenas en la carne de res (chuleta), y así prolongar su tiempo de vida útil.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Que futuros trabajos de graduación, relacionados a esta temática, los análisis de la calidad microbiológica de la carne de res (chuleta) se realicen con una mayor cantidad de muestras, y verificar si cumplen o no todos los requerimientos del Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) Grupo de alimentos: carnes y productos cárnicos, subgrupo de alimentos.
2. Que se realicen en futuros trabajos de investigación el análisis del material de empaque primario ya que está en contacto directo con la carne de res (chuleta) y tiene que proteger las características del producto durante su almacenamiento.
3. Que los organismos competentes y las cadenas de supermercados tengan mejores estándares de calidad relacionados a las buenas prácticas de manufactura, para evitar la contaminación de los productos cárnicos crudos.
4. Al implementar la metodología de bioconservación en carnes es necesario mantener las muestras de carne de res inoculadas con algún probiótico en ambientes controlados de temperaturas y con el 5% de CO₂, para lograr así mejores resultados de bioconservación y mantener las características de la carne de res.
5. Al realizar estudios de bioconservación para la preservación de alimentos se recomiendan las concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁶

UFC/mL a temperatura de congelación y 10^7 a temperaturas de refrigeración.

6. Que los organismos correspondientes promuevan el uso de bacterias ácido lácticas como cultivo bioprotector para extender la vida útil de la carne de res fresca y seguridad microbiológica en la conservación de la carne comercial y sustituir los conservantes químicos que son dañinos para la salud de la población.

BIBLIOGRAFIA

1. Arriola Alarcón M. I., Magaña Vanegas J. G. (2014). Análisis microbiológico y recuento de bacterias ácido lácticas en yogures comercializados en supermercados del distrito dos del área metropolitana de san salvador.
2. Barahona Avalos E. P., Zuleta Chávez R. C. (2014). Efecto antagónico de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* sobre microorganismo patógenos: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*.
3. Bergey D. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. [Libro en línea]. 9th ed. USA; 1994. [Acceso el 15 de febrero de 2015].
Disponible en:
<http://books.google.com.sv/books?id=9cwgo9lyTUC&pg=PA1257&dq=6.%09David+Bergey.+Bergey's+Manual+of+Determinative+Bacteriology.+9th+Ed.USA:+Editorial+;1994.&hl=es419&sa=X&ei=ChFuUfTMO6qr0AHhsoCwCw&ved=0CC4Q6AEwAA#v=onepage&q=6.%09David%20Bergey.%20Bergey's%20Manual%20of%20Determinative%20Bacteriology.%209th%20Ed.USA%3A%20Editorial%20%3B1994.&f=false>
4. Bermúdez E. Pruebas bioquímicas para enterobacterias fundamentos. [Presentación power point] 2010 [acceso 10 de abril de 2015].
Disponible en:
<http://es.scribd.com/doc/4743830/pruebasbioquimicasparaenterobacterias>.
5. Bonilla, G. (1996). Estadística I. *Elementos de estadística descriptiva y probabilidad*. (4ª ed). San Salvador, El Salvador: UCA editores.

6. Calderón O, Padilla C, Chávez C, Villalobos L, Arias L. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. archivos latinoamericanos de nutrición.[revista en internet]. 2007 [consultado el 20 de marzo de 2015]; 57(1). Disponible en : http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S000406222007000100007&script=sci_arttext
7. Certificado de análisis. *L. acidophilus*. Material 1248156, [Acceso el 03 de Septiembre de 2015] disponible en <http://www.danisco.com>
8. Dabes, A.C, Santos, W.L.M., Pereira E.M. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas aisladas de productos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Arq Brasileiro Medicina Veterinaria e Zootecnia 2001. [Acceso el 18 de Marzo de 2015]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/PreserFood/nd-pharma-biotech-pulicaciones-bacteriocinas-derivadas-del-acido-lctico-articulo>
9. Fagro. Microbiología de la carne disponible en: <http://www.fagro.edu.uy/~alimentos/cursos/carne/Unidad%206/MICROBIOLOGIA.pdf>
10. Feria Caceres, P. Aislamiento y caracterización Bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 en suero de leche. Tesis Msc Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Medellín - Colombia, 2007 [Acceso el 18 de Marzo de 2015]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n1/v16n1a09>

11. Gámez H. J.¹, Montalvo Rodríguez C.², Ramírez Toro C.³ y Bolívar G.⁴. (2011). Efecto de bioconservación de carne molida de cerdo, tipo hamburguesa con *Lactobacillus acidophilus* cepa ATCC 4356 y *Staphylococcus carnosus* NRRLO2
12. García, T., Martín, R., Sanz, B., Hernández, P E. Extensión de la vida útil de la carne fresca. El envasado en atmósfera modificada y utilización de bacterias ácido lácticas y bacteriocinas, Rev Española Cienc Tecnol AI 1995. [Acceso el 18 de Marzo de 2015]. Disponible en: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=3616930>
13. González Martínez B. E., Jiménez Salas Z., Heredia Rojas N. L., Villarreal Treviño L., García Díaz G., Gómez Treviño M. (2006) Efecto de microorganismos probióticos sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* var. *Typhimurium*. Ciencia UANL, 9 (4).
14. Grande Burgos M^a J., Lucas R., López Aguayo M^a. C., Pérez Pulido R., Gálvez. A. (2009). BIOCONSERVACIÓN DE ALIMENTOS CÁRNICOS
15. Jawetz, E. Melnick, J. Adelberg, E. Microbiología Médica. (18^a ed). México: El Manual Moderno. (2005).
16. Klaenhammer, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev 1993. [Acceso el 18 de Marzo de 2015]. Disponible en: <http://femsre.oxfordjournals.org/content/12/1-3/39.abstract>
17. Lininger, C. A.; Warwick, D. p. La encuesta por muestreo: Teoría y práctica. Primera edición, Mexico DF, editorial Continental. SA de CV. (1985)

18. Moreira Do Santos, W. L. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producidas por *pediocoecus sp* 347 de origen cárnico. Tesis Doctorado Universidad Complutense de Madrid Facultad de Veterinaria. Departamento de Nutrición y Bromatología III. (1993) [Acceso el 18 de Marzo de 2015]. Disponible en: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/19911996/D/2/D2016101.pdf>
19. Organización mundial de la salud, organización de las naciones unidas la agricultura y la alimentación. Codex Alimentarius Producción de alimentos de origen animal (segunda edición). Roma. (2009). [Acceso 12 de Marzo del 2015]. Disponible en: ftp://ftp.fao.org/codex/publications/Booklets/Animal/Animal_Food_Prod_ES.pdf
20. Producción de bacteriocinas, Rev Española Cienc Tecnol Al 1995. [Acceso el 18 de Marzo de 2015]. Disponible en: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=3616951>
21. Publica Resolución N° 243 - 2009 (COMIECOLV) aprobación del Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos. [Acceso 12 de Marzo del 2015]. Disponible en: <http://www.mag.go.cr/legislacion/2009/de-35485.pdf>
22. Requena, T., Pelaez C. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne, [Acceso el 18 de Marzo del 2015] disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182009000100007&script=sci_arttext
23. Romano Perez, M. A.; Valladares Cortez, C. E.: Prediseño de una planta procesadora de productos cárnicos con enfoque de

sistemas Integrados de gestión [tesis de grado]. San Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Ingeniería y Arquitectura; 2012.179p.

24. Samaniego Fernández LM, Sosa del Castillo M. Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora [Acceso el 16 de Marzo del 2015] disponible en: <http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH011d/e18c5081.dir/doc.pdf>
25. Santos A, Vega D. Estandarización del proceso de fermentación de leche ultrapasteurizada con gránulos de kéfir. [tesis de grado.] San Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia; 2012. 102p
26. Torrico E, Trigoso C. Manual de procedimiento Bauer-Kirby y su control de calidad interno.1ª ed. La Paz: OPS/OMS, 2003. [Acceso el 2 de abril de 2015]. Disponible en: <http://enfermeria.bvsp.org.bo/textocompleto/bvsp/boxp79/tcd/nacional/nman13.pdf>
27. Urrego Velázquez, M. C, Cadavid Rojas, L. A. Efecto sobre la calidad microbiológica, sensorial y reológica, de la aplicación de tres diferentes niveles de ácido láctico en un corte de carne de res (Huevo de Solomo). Trabajo de grado Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medellín – Colombia. 2005 [Acceso el 18 de Marzo de 2015]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/PreserFood/nd-pharmabiotech-pulicaciones-bacteriocinas-derivadas-del-acido-lctico-artculo>

28. Valoración objetiva de la carne [Acceso el 21 abril de 2015] disponible en:http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/02_17_30_3c_carne_3c.pdf
29. Vásquez M., Suárez M., Zapata B. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en conservación de la carne. (2009). [Revista en internet], [Acceso 18 de Marzo del 2015]. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182009000100007
30. Venegas, A. M y Ruiz, L. B. *Compendio de bacteriología*. (1^a ed). Guadalajara, Jalisco: CUCEI editores. (2010).
31. Wallace A, Hammack T. *Salmonella*. Bacteriological Analytical Manual [Manual en línea] 1998 [Acceso el 22 de marzo de 2015]. (8a ed.). Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/>

GLOSARIO

Alimentos no procesados: Un alimento no procesado es cualquier clase de comida que se encuentra en su estado natural y no ha sido alterada.⁽¹⁴⁾

Anaqueles: es el soporte fabricado en obra, madera, metal u otro material resistente, como derivados del vidrio y el plástico, que aplicado o instalado horizontalmente en paredes, muros, huecos de alacenas ó armarios, o disponiendo de patas, sirve de superficie de base de muy variado uso en hogares, establecimientos de venta, industrias, talleres, etc.⁽¹⁰⁾

Bacteriocina: Las bacteriocinas son proteínas o péptidos bactericidas sintetizados en el ribosoma de las bacterias ácido lácticas, la célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina.⁽¹⁾

Bioconservación: se basa en la ayuda de la utilización de un microorganismo de la microbiota natural el cual por medio de la producción de bacteriocinas y ácido láctico pueden inhibir o disminuir el crecimiento de una bacteria patógena.⁽⁵⁾

Carne: se define como:

- La porción comestible de canales bovinos, borregos, cabras, cerdo y caballo; incluye tejido muscular y órganos.⁽⁴⁾
- Todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin.⁽⁴⁾

Carne cruda: Carne fresca, picada o separada mecánicamente.⁽⁴⁾

Carne fresca: Carne que, aparte de haber sido refrigerada, no ha recibido, a los efectos de su conservación, otro tratamiento que el envasado protector y que conserva sus características naturales.⁽⁴⁾

Durapax: Material plástico celular y rígido fabricado a partir del moldeo de perlas preexpandidas de poliestireno expandible o uno de sus copolímeros, que presenta una estructura celular cerrada y rellena de aire.⁽⁸⁾

Inocuidad de alimentos: La inocuidad de los alimentos engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos. Las políticas y actividades que persiguen dicho fin deberán de abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción al consumo.⁽¹²⁾

Lactobacillus acidophilus: es un tipo de bacteria (bacilo gram positivo) que vive de forma natural en el cuerpo humano y se encuentra principalmente en los intestinos y la vagina. *Lactobacillus acidophilus* se usa como probiótico.⁽⁷⁾

Mioglobina: La mioglobina es una proteína cuya función principal es transportar el oxígeno a los músculos, necesario para su funcionamiento. Su estructura es muy similar a la de la hemoglobina que transporta el oxígeno en la sangre.⁽³⁾

La mioglobina también está considerada como un pigmento, ya que es la responsable del color rojo de los músculos.⁽⁶⁾

Probiótico: Según la Organización Mundial para la Salud se define como Microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo hospedador.⁽⁹⁾

Salmonella spp: es un bacilo en forma de bastoncillo gram-negativo, anaerobio facultativo, que pertenece a la familia enterobacteriaceae.⁽¹⁸⁾

ANEXOS

ANEXO N°1



Figura N°20 Mapa del distrito 2 del área metropolitana de San Salvador.

ANEXO N° 2

Tabla N°32 Código de Supermercados.

CADENA COMERCIAL	SUCURSAL	CÓDIGO
Despensa de Don Juan	Los Héroes	DJH01
	Escalón Norte	DJE02
Super Selectos	Metro Sur	SS001
	Metro Centro	SS002
	Miralvalle 1	SS003
	Miralvalle 2	SS004
	San Luís	SS005
	Gigante	SS006

ANEXO N° 3

FECHA:_____	HORA DE RECOLECCION:_____
NUMERO DE MUESTRA:_____	TEMPERATURA:_____
CODIGO DEL SUPERMERCADO:_____	
NOMBRE DEL MUESTREADOR:_____	

Figura N°21 Etiqueta para la identificación de carne de res (chuleta) a muestrear

ANEXO N° 4

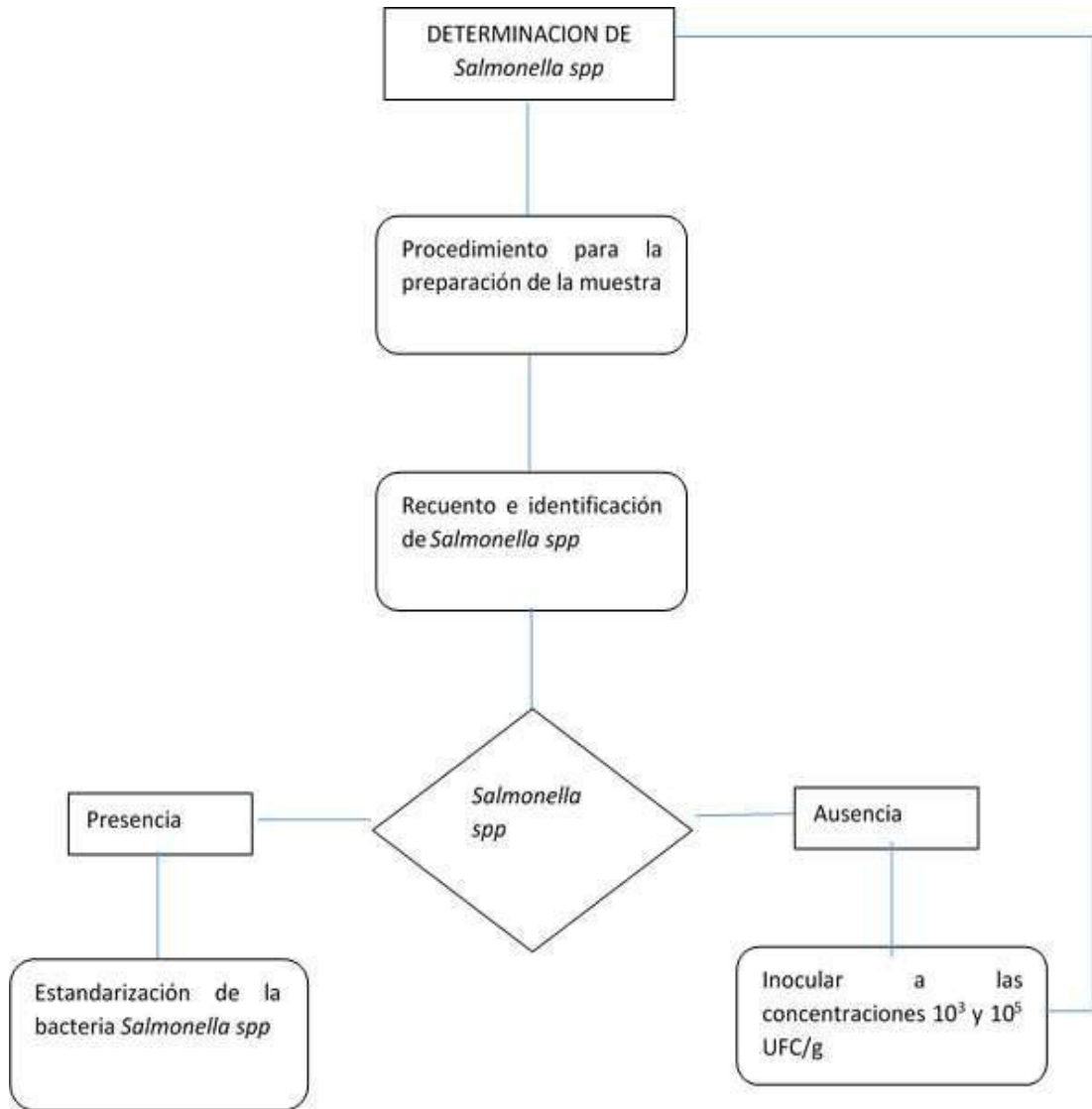


Figura N°22 Flujograma para la determinación de *Salmonella* spp

ANEXO N° 5

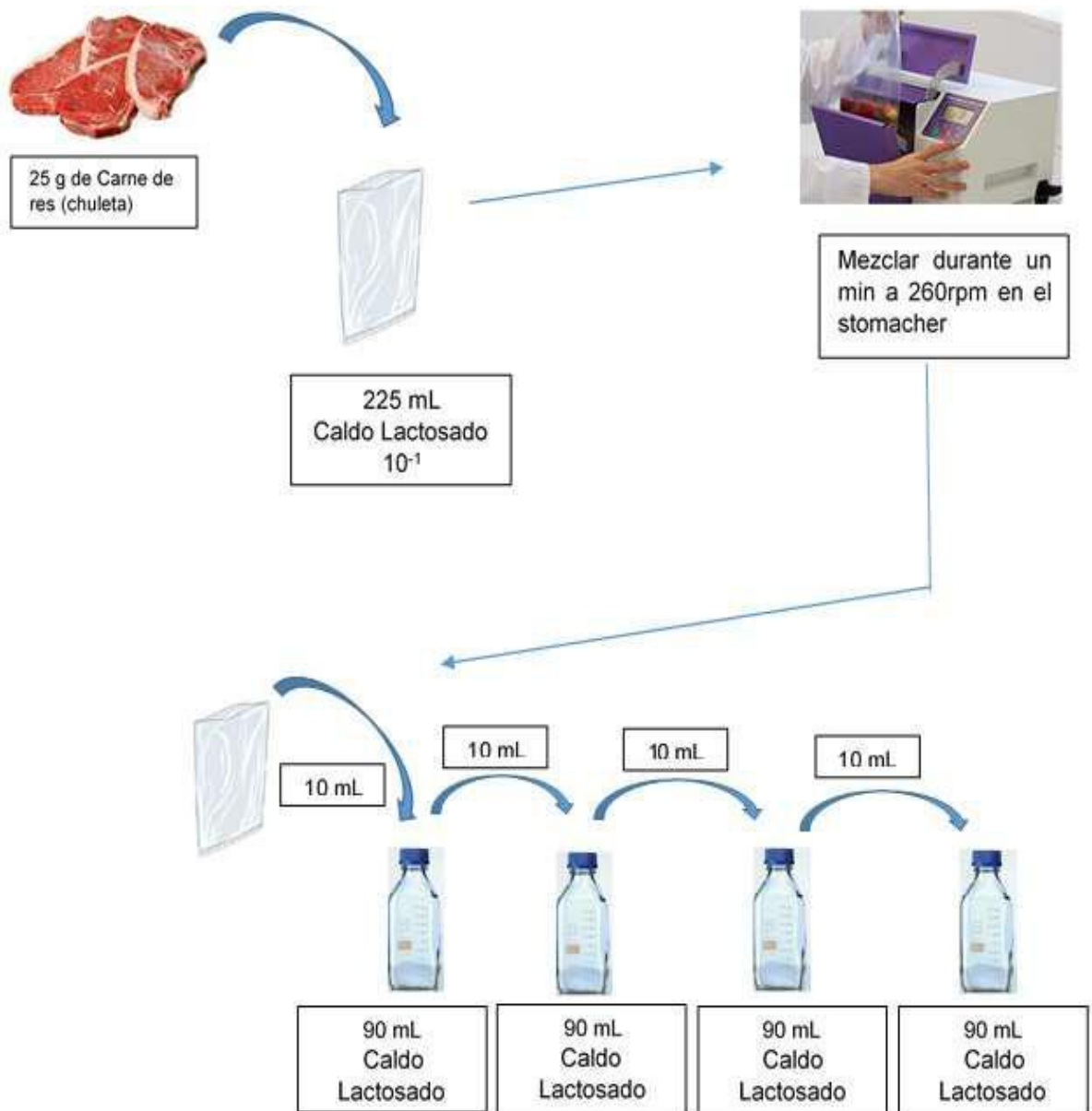


Figura N°23 Procedimiento general para la preparación de muestra.

ANEXO N° 6

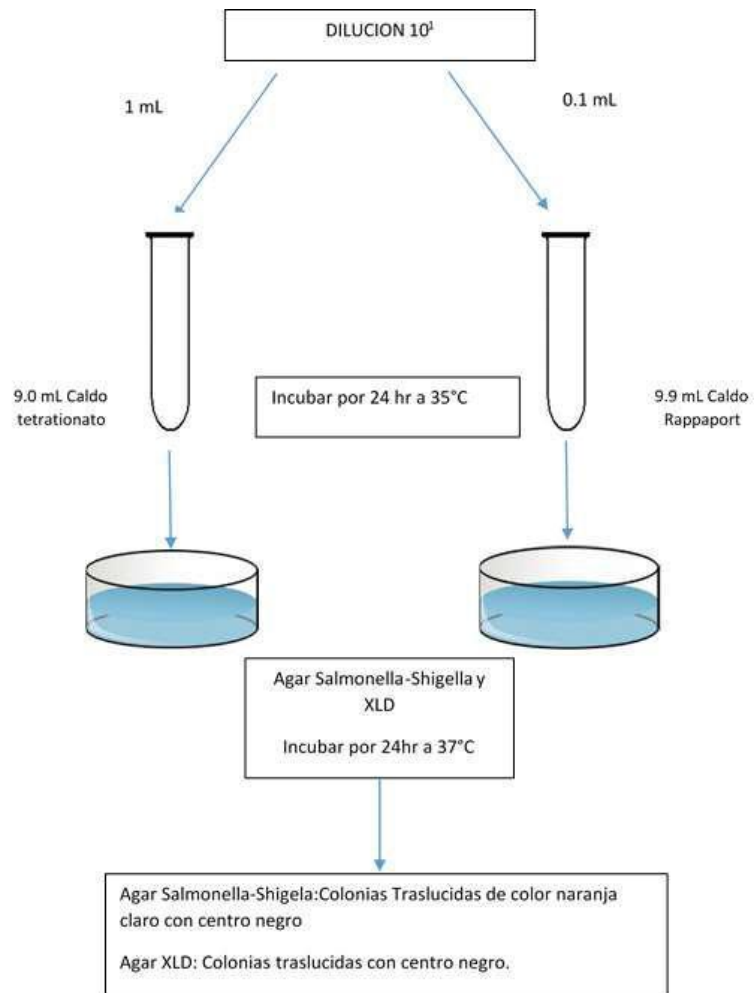


Figura N° 24 Identificación de *Salmonella spp*

ANEXO N° 7

Pruebas bioquímicas para la identificación de *Salmonella spp*

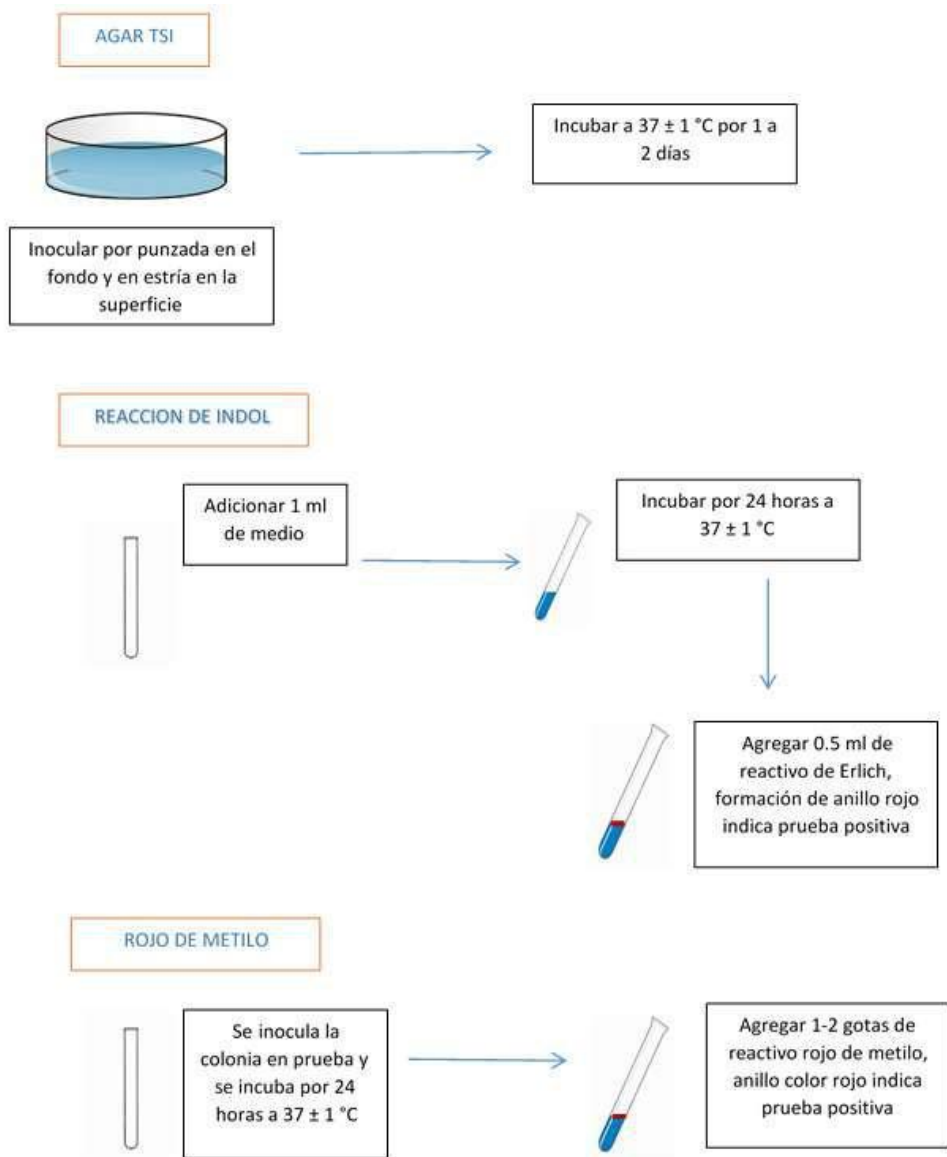


Figura N° 25 Pruebas bioquímicas para la identificación de *Salmonella* spp

PRUEBA DE MOTILIDAD



Se inocula la colonia en prueba y se incuba por 24 horas a 37 ± 1 °C



Se confirma por la formación de crecimiento en forma de sombrilla en el medio

VOGES PROSKAUER



Se inocula la colonia en prueba y se incuba por 24 horas a 37 ± 1 °C



Luego se agrega 3 gotas de solución alcohólica de alfa naftol y 2 gramos de solución de hidróxido de sodio



Color rosado luego de 15 minutos indica reacción positiva

Figura N° 25 (continuación)

ANEXO N° 8

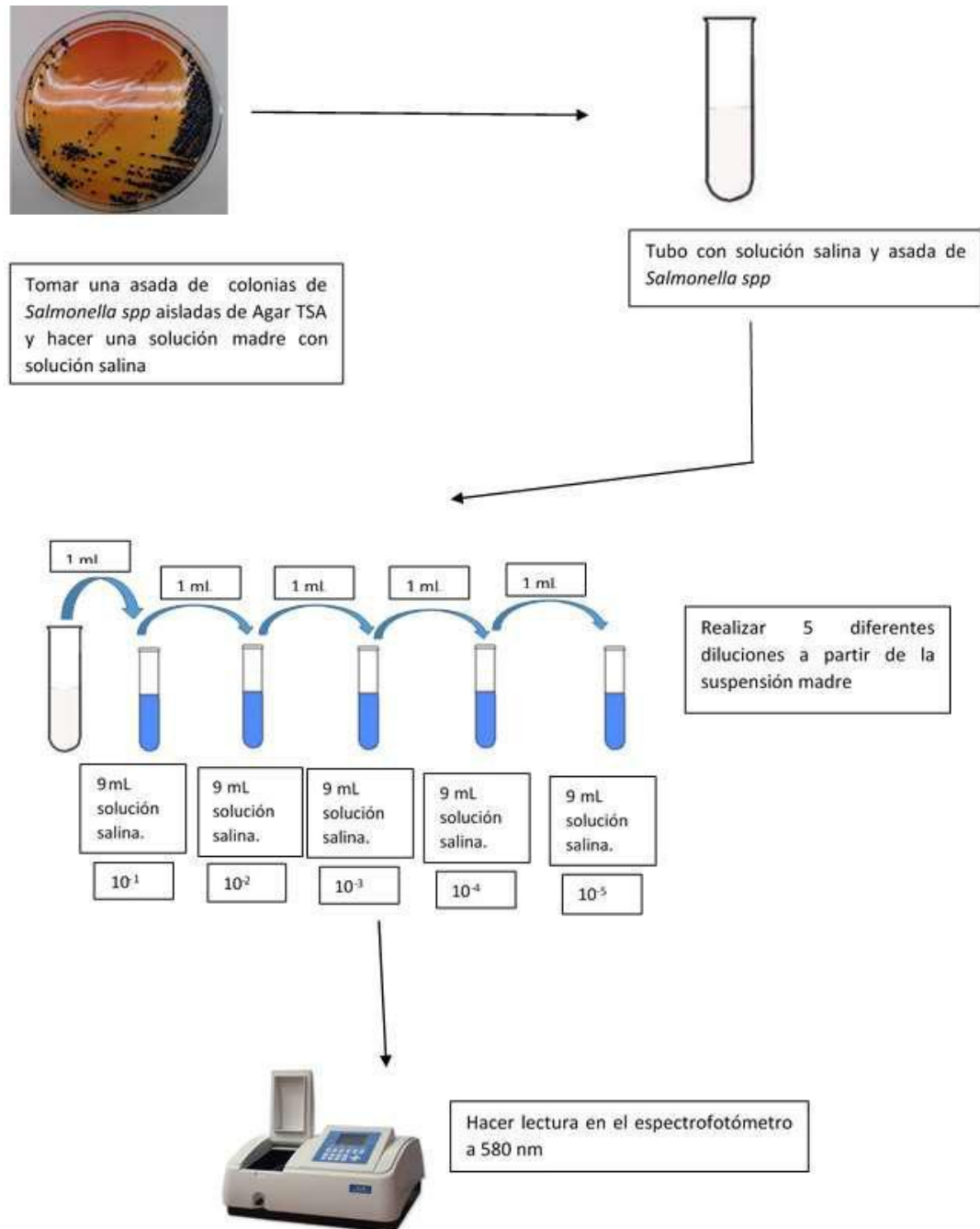


Figura N° 26 Estandarización de la bacteria patógena *Salmonella spp*

ANEXO N° 9

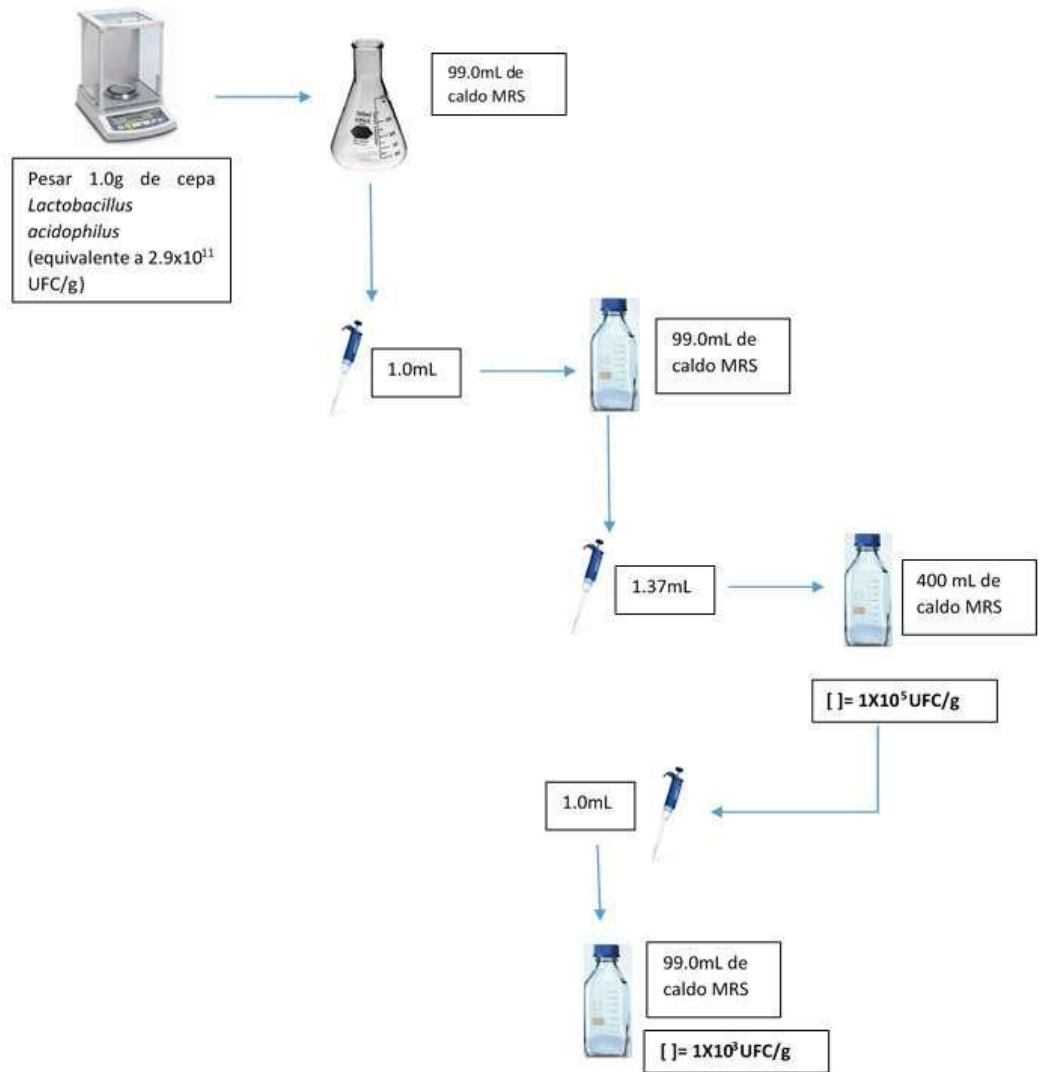


Figura N° 27 Preparación de la concentración de *Lactobacillus acidophilus*

ANEXO N° 10

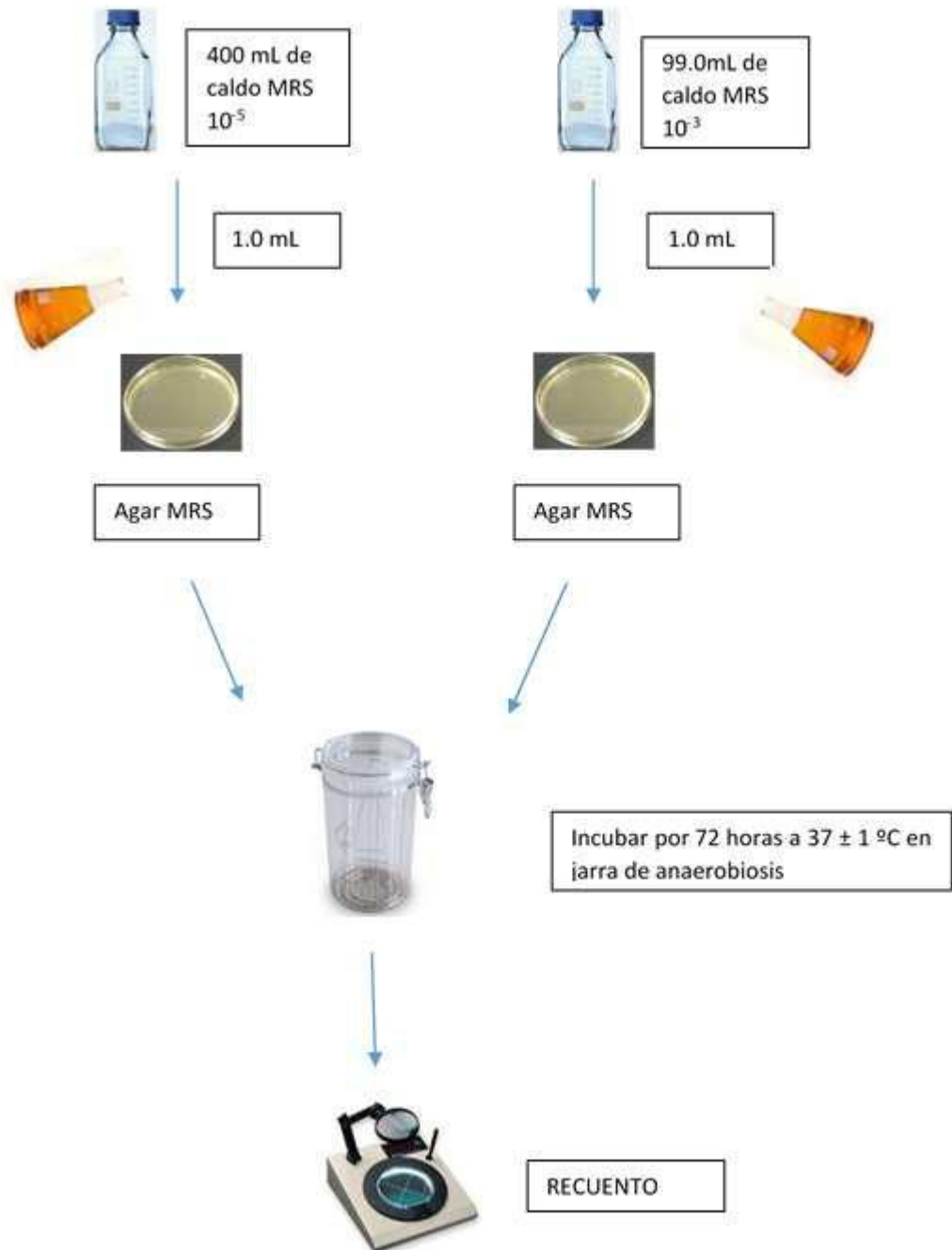


Figura N° 28 Conteo de bacterias ácido lácticas.

ANEXO N° 11

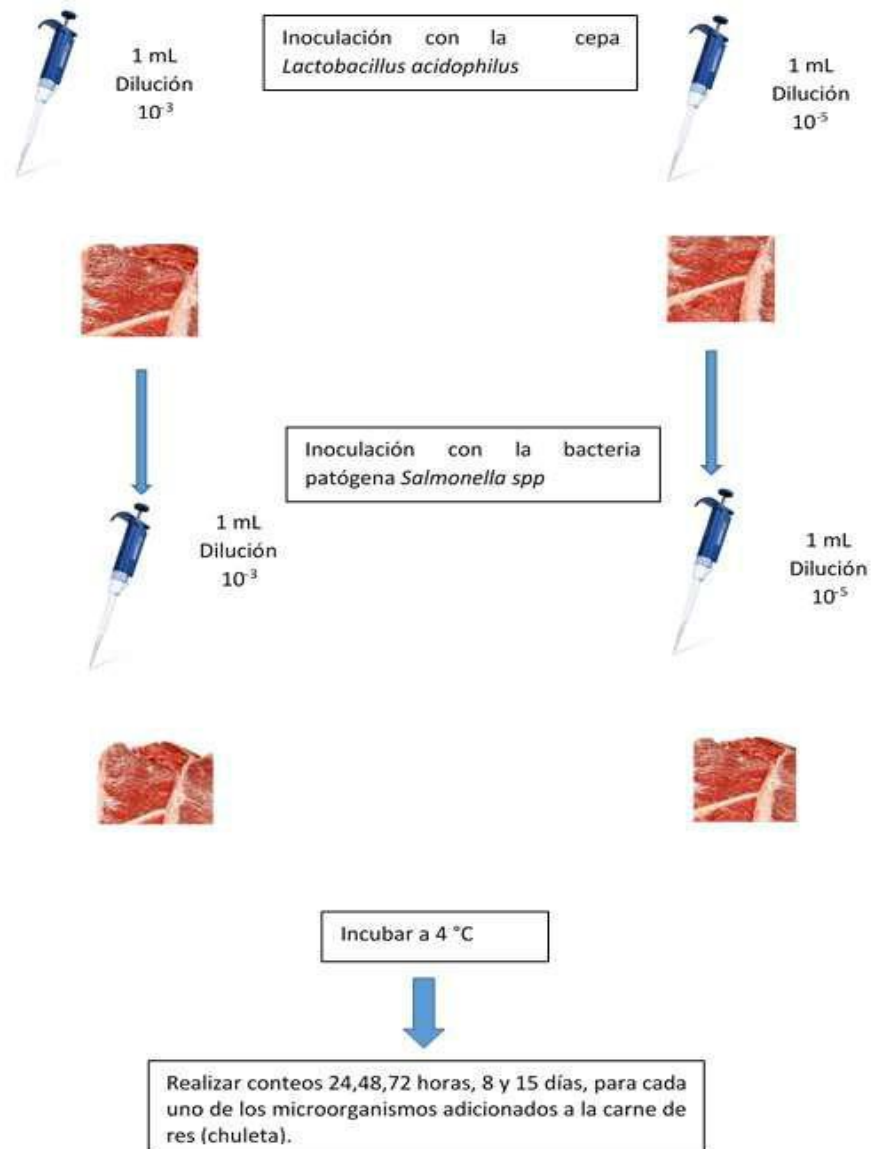


Figura N° 29 Inoculación de la carne de res (chuleta) con el probiótico *Lactobacillus acidophilus* y la bacteria patógena *Salmonella spp*

ANEXO N° 12

Tabla N°33 Ejemplo de realización de pesadas para cada muestra

Código de muestra DJH01		
Concentración	Tiempo de incubación	Peso
Dilucion 10 ³	24hr	25 g
	48hr	
	72hr	
	8 días	
	15 días	
Dilucion 10 ⁵	24hr	
	48hr	
	72hr	
	8 días	
	15 días	

Anexo N°13

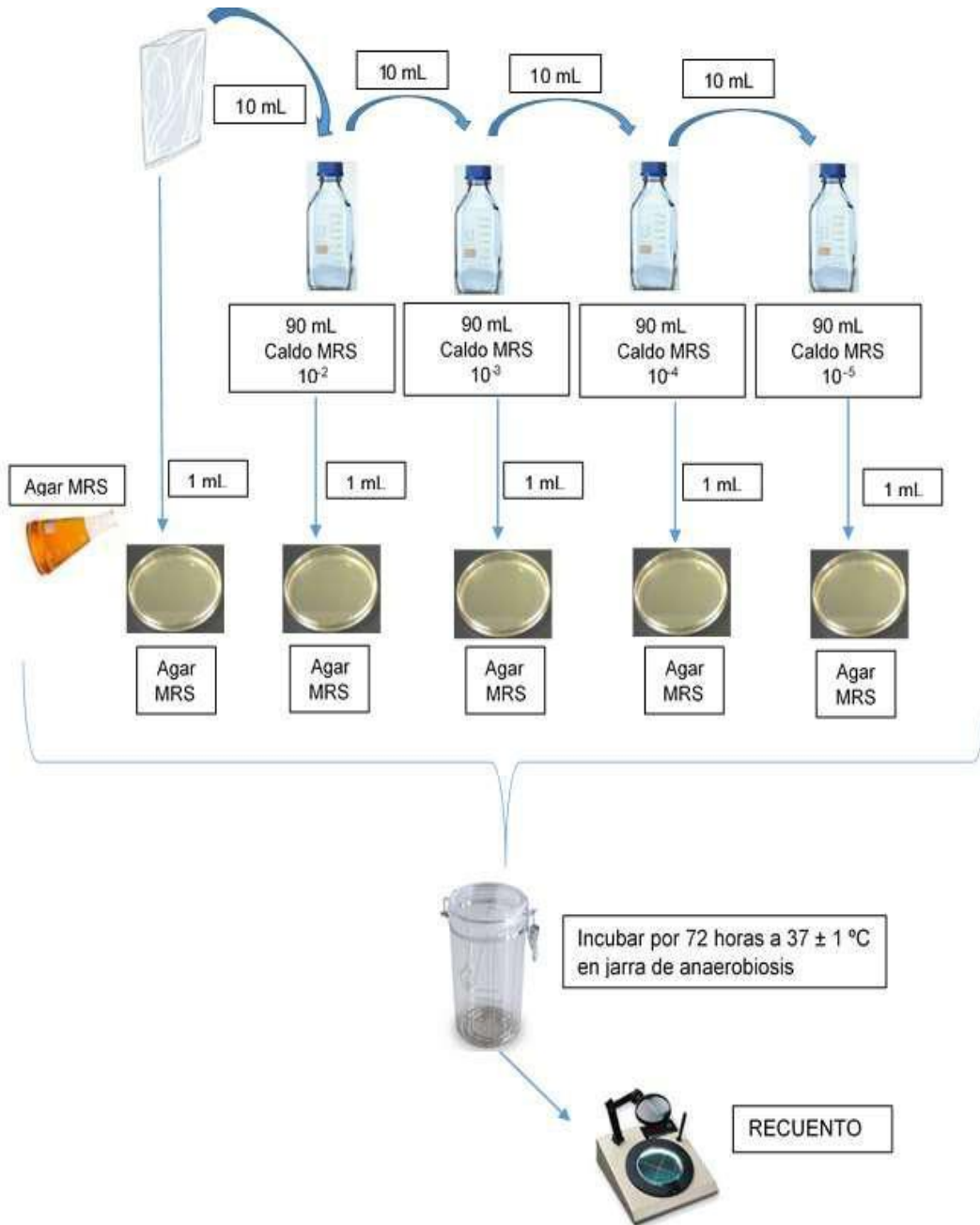


Figura N°30 Recuento de *Lactobacillus acidophilus*

ANEXO N° 14



Realizar
lecturas a 25
°C ±2

Figura N° 31 Medición de pH

ANEXO N° 15

8.0 Grupo de Alimento: Carnes y productos cárnicos. Esta categoría incluye todos los tipos de productos cárnicos, de aves de corral y caza, en piezas y cortados o picados, frescos y procesados, carnes congeladas, incluyendo empanizados y rebosados y carnes enlatadas			
8.1 Subgrupo del alimento: Productos cárnicos crudos (empacados). No incluidas materias primas			
8.1.1 Subgrupo del Alimento: Productos cárnicos crudos diferentes al pollo			
Parámetro	Categoría	Tipo de riesgo	Limite máximo permitido
<i>Escherichia coli</i> O157:H7/25g (carne molida, picada y tortas para hamburguesas)	10	A	Ausencia
<i>Salmonella ssp/</i> 25 g	10		Ausencia
<i>Escherichia coli</i>	5		10 UFC/g

Figura N°32: Criterios microbiológicos, Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50.08. Alimentos, criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos.

ANEXO N° 16

RESULTADOS DE PRIMER ENSAYO

Tabla N°34 Resultado de pruebas bioquímicas

PRUEBA	RESULTADO ESPERADO	RESULTADO OBTENIDO	OBSERVACIONES
INDOL	Positivo	Positivo	Formación de un anillo color rojo
VOGES-PROSKAUER	Positivo	Positivo	Coloración naranja a rosa
ROJO DE METILO	Positivo	Positivo	Coloración roja
MOTILIDAD	Positivo	Positivo	Movilidad mas alla de la punzada de la siembra
TSI	Positivo Producción de H ₂ S (gas)	Positivo	Producción de gas (H ₂ S)
CITRATO	Positivo	Positivo	Coloración verde en el bisel

Tabla N°35 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10³ UFC/mL en carne de res (chuleta) 24 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	RESULTADO UFC/mL
SS001A	>250	>2500	504000	510000
SS001B	>250	>2500	500000	500000
SS002A	>250	>2500	508000	510000
SS002B	>250	>2500	503000	500000
SS003A	>250	>2500	505000	510000
SS003B	>250	>2500	498000	500000
SS004A	>250	>2500	505000	510000
SS004B	>250	>2500	504000	500000
SS005A	>250	>2500	505000	510000
SS005B	>250	>2500	504000	500000
SS006A	>250	>2500	508000	510000
SS006B	>250	>2500	505000	510000
DJH01A	>250	>2500	508000	510000
DJH01B	>250	>2500	505000	510000
DJH02A	>250	>2500	504000	500000
DJH02B	>250	>2500	508000	510000
Promedio	>250	>2500	504617.8119	510,000

Tabla N°36 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10³ UFC/mL en carne de res (chuleta) 48 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	RESULTADO UFC/mL
SS001A	>250	>2500	486000	490000
SS001B	>250	>2500	493000	490000
SS002A	>250	>2500	490000	490000
SS002B	>250	>2500	501000	500000
SS003A	690	2500	239000	240000
SS003B	>250	>2500	498000	500000
SS004A	760	6300	400000	400000
SS004B	780	7800	420000	420000
SS005A	250	3700	120000	120000
SS005B	730	5400	350000	350000
SS006A	>250	>2500	480000	480000
SS006B	230	3300	163000	160000
DJH01A	780	5500	348000	350000
DJH01B	630	2900	276000	280000
DJH02A	241	5800	343000	340000
DJH02B	650	2600	275000	290000
Promedio			341991.5885	340,000

Tabla N°37 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10³ UFC/mL en carne de res (chuleta) 72 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	RESULTADO UFC/mL
SS001A	320	600	1000	1000
SS001B	410	300	0	0
SS002A	360	200	0	0
SS002B	390	800	2000	2000
SS003A	0	0	0	0
SS003B	300	700	1000	1000
SS004A	130	0	0	0
SS004B	190	100	0	0
SS005A	0	0	0	0
SS005B	180	0	0	0
SS006A	320	100	0	0
SS006B	0	0	0	0
DJH01A	190	0	0	0
DJH01B	150	0	0	0
DJH02A	60	0	0	0
DJH02B	160	0	0	0
Promedio			250	250

Tabla N°38 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10³ UFC/mL en carne de res (chuleta) 8 días

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	RESULTADO UFC/mL
SS001A	10	0	0	0
SS001B	60	0	0	0
SS002A	0	0	0	0
SS002B	0	0	0	0
SS003A	0	0	0	0
SS003B	0	0	0	0
SS004A	0	0	0	0
SS004B	0	0	0	0
SS005A	0	0	0	0
SS005B	0	0	0	0
SS006A	20	0	0	0
SS006B	0	0	0	0
DJH01A	0	0	0	0
DJH01B	0	0	0	0
DJH02A	0	0	0	0
DJH02B	0	0	0	0
Promedio			0	-

Tabla N°39 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10³ UFC/mL en carne de res (chuleta) 15 días

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	RESULTADO UFC/mL
SS001A	0	0	0	0
SS001B	0	0	0	0
SS002A	0	0	0	0
SS002B	0	0	0	0
SS003A	0	0	0	0
SS003B	0	0	0	0
SS004A	0	0	0	0
SS004B	0	0	0	0
SS005A	0	0	0	0
SS005B	0	0	0	0
SS006A	0	0	0	0
SS006B	0	0	0	0
DJH01A	0	0	0	0
DJH01B	0	0	0	0
DJH02A	0	0	0	0
DJH02B	0	0	0	0
Promedio			0	-

Tabla N°40 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10³ en carne de res (chuleta)

TIEMPO	CONCENTRACION UFC/mL
24 Hr	510000
48 Hr	340000
72 Hr	250
8 DIAS	0
15 DIAS	0

Tabla N°41 Promedio de resultados de presencia o ausencia *Salmonella spp* en carne res (chuleta).

TIEMPO	PRESENCIA O AUSENCIA DE SALMONELLA SPP
24 Hr	10000
48 Hr	10000
72 Hr	10000
8 DIAS	10000
15 DIAS	10000

Tabla N°42 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁵ UFC/mL en carne de res (chuleta) 24 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	498000	2620000	5600000
SS001B	>250	>2500	500000	2500000	5300000
SS002A	>250	>2500	475000	2500000	4800000
SS002B	>250	>2500	503000	2590000	5500000
SS003A	>250	>2500	504000	2620000	4600000
SS003B	>250	>2500	504000	2590000	4900000
SS004A	>250	>2500	432000	2330000	5800000
SS004B	>250	>2500	505000	2560000	3500000
SS005A	>250	>2500	505000	2500000	5900000
SS005B	>250	>2500	506000	2210000	6300000
SS006A	>250	>2500	505000	2170000	4900000
SS006B	>250	>2500	509000	2560000	4600000
DJH01A	>250	>2500	508000	2620000	5300000
DJH01B	>250	>2500	509000	2360000	4700000
DJH02A	>250	>2500	508000	2780000	3800000
DJH02B	>250	>2500	508000	2750000	5100000
Promedio	>250	>2500	498300.2094	510,000	4984102.718

Tabla N°43 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁵ UFC/mL en carne de res (chuleta) 48 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL
SS001A	220	>2500	486000	2600000	5500000
SS001B	390	2300	493000	2620000	700000
SS002A	>250	>2500	490000	2590000	4300000
SS002B	>250	>2500	501000	2570000	3500000
SS003A	623	2500	239000	1900000	300000
SS003B	>250	>2500	498000	2500000	4900000
SS004A	730	6300	400000	2330000	800000
SS004B	780	7800	420000	2560000	300000
SS005A	250	3700	120000	2500000	200000
SS005B	710	5400	350000	2210000	600000
SS006A	>250	>2500	480000	2170000	4200000
SS006B	>251	>2500	450000	2560000	3900000
DJH01A	780	5200	348000	2620000	300000
DJH01B	630	2500	276000	2360000	700000
DJH02A	241	5800	343000	2780000	100000
DJH02B	650	2600	275000	2750000	400000
Promedio			364400.934	510,000	934369.739

Tabla N°44 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁵ UFC/mL en carne de res (chuleta) 72 horas.

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL
SS001A	260	800	1000	0	0
SS001B	430	1200	0	0	0
SS002A	360	200	0	0	0
SS002B	390	1100	12000	10000	0
SS003A	250	600	0	0	0
SS003B	300	700	1000	0	0
SS004A	130	900	2000	0	0
SS004B	190	100	0	0	0
SS005A	120	200	0	0	0
SS005B	180	300	1000	10000	0
SS006A	320	100	0	0	0
SS006B	360	1300	15000	10000	0
DJH01A	190	100	0	0	0
DJH01B	150	500	1000	0	0
DJH02A	30	0	0	0	0
DJH02B	170	200	0	0	0
Promedio		0	2065.5	1,875	0

Tabla N° 45 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁵ UFC/mL en carne de res (chuleta) 8 días

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL
SS001A	0	0	0	0	0
SS001B	0	0	0	0	0
SS002A	0	0	0	0	0
SS002B	0	0	0	0	0
SS003A	0	0	0	0	0
SS003B	0	0	0	0	0
SS004A	0	0	0	0	0
SS004B	0	0	0	0	0
SS005A	0	0	0	0	0
SS005B	0	0	0	0	0
SS006A	0	0	0	0	0
SS006B	0	0	0	0	0
DJH01A	0	0	0	0	0
DJH01B	0	0	0	0	0
DJH02A	0	0	0	0	0
DJH02B	0	0	0	0	0
Promedio			0	-	0

Tabla N°46 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁵ UFC/mL en carne de res (chuleta) 15 días

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL
SS001A	0	0	0	0	0
SS001B	0	0	0	0	0
SS002A	0	0	0	0	0
SS002B	0	0	0	0	0
SS003A	0	0	0	0	0
SS003B	0	0	0	0	0
SS004A	0	0	0	0	0
SS004B	0	0	0	0	0
SS005A	0	0	0	0	0
SS005B	0	0	0	0	0
SS006A	0	0	0	0	0
SS006B	0	0	0	0	0
DJH01A	0	0	0	0	0
DJH01B	0	0	0	0	0
DJH02A	0	0	0	0	0
DJH02B	0	0	0	0	0
Promedio	0	0	0	0	0

Tabla N°47 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁵ UFC/mL en carne de res (chuleta)

Tiempo	Concentracion 10 ³ UFC/mL	Concentracion 10 ⁵ UFC/mL
24Hr	510000	5000000
48Hr	340000	900000
72Hr	250	0
8Dias	0	0
15Dias	0	0

Tabla N°48 Ausencia o presencia de *Salmonella spp* en concentraciones 10³ y 10⁵ UFC/mL.

Tiempo	Concentracion 10 ³ UFC/mL	Concentracion 10 ⁵ UFC/mL
24Hr	Presencia	Presencia
48Hr	Presencia	Presencia
72Hr	Presencia	Presencia
8Dias	Presencia	Presencia
15Dias	Presencia	Presencia

Tabla N°49 Resultados de la determinación de color en las muestras de carne de res (chuleta) con la concentración 10^3 UFC/g de *Lactobacillus acidophilus*

TIEMPO	COLOR		PORCENTAJE	
	ROJO	VERDE-AZUL	ROJO	VERDE-AZUL
24 HORAS	16	0	100	0
48 HORAS	14	2	87.5	12.5
72 HORAS	9	7	56.25	43.75
8 DIAS	1	15	6.25	93.75
15 DIAS	0	0	0	100

Tabla N°50 Resultados de la determinación de color en las muestras de carne de res (chuleta) con la concentración 10^5 UFC/g de *Lactobacillus acidophilus*

TIEMPO	COLOR		PORCENTAJE	
	ROJO	VERDE-AZUL	ROJO	VERDE-AZUL
24 HORAS	16	0	100	0
48 HORAS	15	1	93.75	6.25
72 HORAS	10	6	62.5	37.5
8 DIAS	1	15	6.25	93.75
15 DIAS	0	16	0	100

Tabla N°51 Determinación de pH en muestras de carne de res (chuleta)
concentración 10^3 UFC/g de *Lactobacillus acidophilus*.

Muestras (código)	24 Hr	48 Hr	72 Hr	8 Días	15 Días
SS001A	6.03	6.02	5.8	5.1	4.7
SS002A	5.78	5.62	5.44	5	4.93
SS003A	5.6	5.48	5.13	4.78	4.4
SS004A	5.79	5.66	5.6	5.22	5
SS005A	5.8	5.59	5.31	4.88	4.7
SS006A	5.99	5.75	5.38	4.61	4.36
DJH01A	6.36	6.11	5.65	5.23	5.12
DJH02A	6.3	6.23	5.81	5.09	4.89
SS001B	5.99	5.88	5.51	4.77	4.5
SS002B	5.58	5.43	5.26	4.83	4.7
SS003B	5.78	5.73	5.45	4.61	4.55
SS004B	5.99	5.78	5.69	5.51	5.12
SS005B	5.9	5.71	5.39	4.98	4.62
SS006B	6.04	5.81	5.61	5.33	5.09
DJH01B	6.12	5.95	5.83	5.17	5.01
DJH02B	5.89	5.66	5.44	5.21	4.93
PROMEDIO	5.93375	5.775625	5.51875	5.02	4.78875

Tabla N°52 Determinación de pH en muestras de carne de res (chuleta)
concentración 10^3 UFCg de *Lactobacillus acidophilus*.

Muestras (código)	24 Hr	48 Hr	72 Hr	8 Días	15 Días
SS001A	6	5.88	5.73	5.3	4.8
SS002A	5.87	5.79	5.55	5.19	4.82
SS003A	5.73	5.57	5.52	4.98	4.55
SS004A	5.97	5.81	5.4	5.11	4.93
SS005A	5.66	5.31	5.19	4.98	4.89
SS006A	6.09	5.99	5.78	5.0	4.43
DJH01A	6.42	6.35	6.13	5.8	5.22
DJH02A	6.21	6.03	5.92	5.49	4.92
SS001B	5.89	5.88	5.61	4.97	4.66
SS002B	5.65	5.53	5.13	4.93	4.74
SS003B	5.69	5.56	5.33	4.99	4.78
SS004B	5.87	5.62	5.51	5.44	5.38
SS005B	5.82	5.73	5.55	4.78	4.54
SS006B	6.0	5.93	5.71	5.21	4.96
DJH01B	6.22	6.05	5.95	5.37	5.12
DJH02B	5.89	5.61	5.49	5.17	4.85
PROMEDIO	5.93625	5.79	5.59375	5.169375	4.849375

ANEXO N° 17

RESULTADOS DE SEGUNDO ENSAYO

Tabla N°53 Resultado de pruebas bioquímicas

PRUEBA	RESULTADO ESPERADO	RESULTADO OBTENIDO	OBSERVACIONES
INDOL	Positivo	Positivo	Formación de un anillo color rojo
VOGES-PROSKAUER	Positivo	Positivo	Coloración naranja a rosa
ROJO DE METILO	Positivo	Positivo	Coloración roja
MOTILIDAD	Positivo	Positivo	Movilidad mas alla de la punzada de la siembra
TSI	Positivo Producción de H ₂ S (gas)	Positivo	Producción de gas (H ₂ S)
CITRATO	Positivo	Positivo	Coloración verde en el bisel

Tabla N°54 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁶ UFC/mL en carne de res (chuleta) 24 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	>25000	2620000	6100000	19000000
SS001B	>250	>2500	>25000	2500000	6400000	10000000
SS002A	>250	>2500	>25000	2500000	4800000	38000000
SS002B	>250	>2500	>25000	2590000	5500000	28000000
SS003A	>250	>2500	>25000	2620000	5600000	9000000
SS003B	>250	>2500	>25000	2590000	4900000	11000000
SS004A	>250	>2500	>25000	2330000	5800000	14000000
SS004B	>250	>2500	>25000	2560000	3500000	33000000
SS005A	>250	>2500	>25000	2500000	5900000	38000000
SS005B	>250	>2500	>25000	2210000	6300000	36000000
SS006A	>250	>2500	>25000	2170000	5300000	24000000
SS006B	>250	>2500	>25000	2560000	4600000	29000000
DJH01A	>250	>2500	>25000	2620000	5300000	30000000
DJH01B	>250	>2500	>25000	2360000	4700000	26000000
DJH02A	>250	>2500	>25000	2780000	3800000	22000000
DJH02B	>250	>2500	>25000	2750000	5100000	29000000
Promedio	>250	>2500	>25000	510,000	5158182.79	22521584.3

Tabla N°55 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁶ UFC/mL en carne de res (chuleta) 48 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	>25000	2330000	6100000	19000000
SS001B	>250	>2500	>25000	2500000	6400000	10000000
SS002A	>250	>2500	>25000	2500000	4800000	38000000
SS002B	>250	>2500	>25000	2590000	5500000	28000000
SS003A	>250	>2500	>25000	2590000	5600000	9000000
SS003B	>250	>2500	>25000	2620000	4900000	11000000
SS004A	>250	>2500	>25000	2620000	5800000	14000000
SS004B	>250	>2500	>25000	2170000	3500000	33000000
SS005A	>250	>2500	>25000	2210000	5900000	38000000
SS005B	>250	>2500	>25000	2500000	6300000	36000000
SS006A	>250	>2500	>25000	2560000	5300000	24000000
SS006B	>250	>2500	>25000	2560000	4600000	29000000
DJH01A	>250	>2500	>25000	2620000	5300000	30000000
DJH01B	>250	>2500	>25000	2360000	4700000	26000000
DJH02A	>250	>2500	>25000	2750000	3800000	22000000
DJH02B	>250	>2500	>25000	2780000	5100000	29000000
Promedio	>250	>2500	>25000	3648,659	5158182.79	22521584.3

Tabla N°56 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁶ UFC/mL en carne de res (chuleta) 72 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/MI	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	>25000	2620000	5600000	20000000
SS001B	>250	>2500	>25000	2500000	5300000	19000000
SS002A	>250	>2500	>25000	2500000	4800000	22000000
SS002B	>250	>2500	>25000	2590000	5500000	17000000
SS003A	>250	>2500	>25000	2620000	4600000	24000000
SS003B	>250	>2500	>25000	2590000	4900000	20000000
SS004A	>250	>2500	>25000	2330000	5800000	27000000
SS004B	>250	>2500	>25000	2560000	3500000	11000000
SS005A	>250	>2500	>25000	2500000	5900000	28000000
SS005B	>250	>2500	>25000	2210000	6300000	31000000
SS006A	>250	>2500	>25000	2170000	4900000	24000000
SS006B	>250	>2500	>25000	2560000	4600000	19000000
DJH01A	>250	>2500	>25000	2620000	5300000	21000000
DJH01B	>250	>2500	>25000	2360000	4700000	27000000
DJH02A	>250	>2500	>25000	2780000	3800000	30000000
DJH02B	>250	>2500	>25000	2750000	5100000	25000000
Promedio	>250	>2500	>25000	510,000	4984102.72	22171693.2

Tabla N°57 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁶ UFC/mL en carne de res (chuleta) 8 días

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/MI	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	604000	2620000	4600000	21000000
SS001B	>250	>2500	569000	2620000	4800000	18000000
SS002A	>250	>2500	538000	2590000	4900000	20000000
SS002B	>250	>2500	504000	2590000	5300000	24000000
SS003A	>250	>2500	571000	2500000	5500000	29000000
SS003B	>250	>2500	500000	2560000	5600000	19000000
SS004A	>250	>2500	490000	2560000	5800000	25000000
SS004B	>250	>2500	601000	2500000	3500000	20000000
SS005A	>250	>2500	590000	2500000	5900000	13000000
SS005B	>250	>2500	499000	2330000	6300000	26000000
SS006A	>250	>2500	508000	2210000	4900000	28000000
SS006B	>250	>2500	512000	2170000	3800000	17000000
DJH01A	>250	>2500	473000	2360000	4600000	11000000
DJH01B	>250	>2500	501000	2620000	4700000	20000000
DJH02A	>250	>2500	509000	2750000	5100000	22000000
DJH02B	>250	>2500	511000	2780000	5300000	19000000
Promedio	>250	>2500	528442.397	2510,550	4984102.72	20151671.7

Tabla N°58 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁶ UFC/mL en carne de res (chuleta) 15 días

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	>25000	2620000	5600000	10000000
SS001B	>250	>2500	>25000	2500000	5300000	9000000
SS002A	>250	>2500	>25000	2500000	4800000	11000000
SS002B	>250	>2500	>25000	2590000	5500000	5000000
SS003A	>250	>2500	>25000	2620000	4600000	7000000
SS003B	>250	>2500	>25000	2590000	4900000	10000000
SS004A	>250	>2500	>25000	2330000	5800000	8000000
SS004B	>250	>2500	>25000	2560000	3500000	13000000
SS005A	>250	>2500	>25000	2500000	5900000	11000000
SS005B	>250	>2500	>25000	2210000	6300000	10000000
SS006A	>250	>2500	>25000	2170000	4900000	12000000
SS006B	>250	>2500	>25000	2560000	4600000	10000000
DJH01A	>250	>2500	>25000	2620000	5300000	13000000
DJH01B	>250	>2500	>25000	2360000	4700000	11000000
DJH02A	>250	>2500	>25000	2780000	3800000	10000000
DJH02B	>250	>2500	>25000	2750000	5100000	9000000
Promedio	>250	>2500	>25000	510,000	4984102.72	9697963.96

Tabla N°59 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁶ UFC/mL en carne de res (chuleta)

TIEMPO	CONCENTRACION UFC/mL
24 HORAS	23000000
48 HORAS	23000000
72HORAS	22000000
8 DIAS	20000000
15 DIAS	10000000

Tabla N°60 Promedio de resultados de presencia o ausencia *Salmonell spp* en carne res (chuleta)

TIEMPO	PRESENCIA O AUSENCIA DE SALMONELLA SPP
24 HORAS	10000
48 HORAS	10000
72HORAS	10000
8 DIAS	10000
15 DIAS	10000

Tabla N°61 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁷ UFC/mL en carne de res (chuleta) 24 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁷ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	>25000	2290000	6100000	19000000	50000000
SS001B	>250	>2500	>25000	2330000	6400000	10000000	40000000
SS002A	>250	>2500	>25000	2400000	4800000	38000000	30000000
SS002B	>250	>2500	>25000	2500000	5500000	28000000	50000000
SS003A	>250	>2500	>25000	2590000	5600000	9000000	20000000
SS003B	>250	>2500	>25000	2620000	4900000	11000000	30000000
SS004A	>250	>2500	>25000	2720000	5800000	14000000	40000000
SS004B	>250	>2500	>25000	2560000	3500000	33000000	10000000
SS005A	>250	>2500	>25000	2500000	5900000	38000000	30000000
SS005B	>250	>2500	>25000	2860000	6300000	36000000	50000000
SS006A	>250	>2500	>25000	2780000	5300000	24000000	20000000
SS006B	>250	>2500	>25000	2620000	4600000	29000000	30000000
DJH01A	>250	>2500	>25000	2560000	5300000	30000000	40000000
DJH01B	>250	>2500	>25000	2350000	4700000	26000000	10000000
DJH02A	>250	>2500	>25000	2210000	3800000	22000000	10000000
DJH02B	>250	>2500	>25000	2170000	5100000	29000000	30000000
Promedio	>250	>2500	>25000	2496,234	5158182.79	22521584.3	26957043.9

Tabla N°62 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁷ UFC/mL en carne de res (chuleta) 48 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁷ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	>25000	2330000	6100000	19000000	40000000
SS001B	>250	>2500	>25000	2500000	6400000	10000000	30000000
SS002A	>250	>2500	>25000	2500000	4800000	38000000	30000000
SS002B	>250	>2500	>25000	2590000	5500000	28000000	50000000
SS003A	>250	>2500	>25000	2590000	5600000	9000000	50000000
SS003B	>250	>2500	>25000	2620000	4900000	11000000	50000000
SS004A	>250	>2500	>25000	2620000	5800000	14000000	40000000
SS004B	>250	>2500	>25000	2170000	3500000	33000000	30000000
SS005A	>250	>2500	>25000	2210000	5900000	38000000	20000000
SS005B	>250	>2500	>25000	2500000	6300000	36000000	20000000
SS006A	>250	>2500	>25000	2560000	5300000	24000000	10000000
SS006B	>250	>2500	>25000	2560000	4600000	29000000	10000000
DJH01A	>250	>2500	>25000	2620000	5300000	30000000	40000000
DJH01B	>250	>2500	>25000	2360000	4700000	26000000	10000000
DJH02A	>250	>2500	>25000	2750000	3800000	22000000	10000000
DJH02B	>250	>2500	>25000	2780000	5100000	29000000	30000000
Promedio	>250	>2500	>25000	3648,659	5158182.785	22521584.33	25168201.8

Tabla N°63 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁷ UFC/mL en carne de res (chuleta) 72 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁷ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	>25000	2620000	5600000	20000000	10000000
SS001B	>250	>2500	>25000	2500000	5300000	19000000	20000000
SS002A	>250	>2500	>25000	2500000	4800000	22000000	30000000
SS002B	>250	>2500	>25000	2590000	5500000	17000000	40000000
SS003A	>250	>2500	>25000	2620000	4600000	24000000	50000000
SS003B	>250	>2500	>25000	2590000	4900000	20000000	50000000
SS004A	>250	>2500	>25000	2330000	5800000	27000000	40000000
SS004B	>250	>2500	>25000	2560000	3500000	11000000	30000000
SS005A	>250	>2500	>25000	2500000	5900000	28000000	20000000
SS005B	>250	>2500	>25000	2210000	6300000	31000000	20000000
SS006A	>250	>2500	>25000	2170000	4900000	24000000	40000000
SS006B	>250	>2500	>25000	2560000	4600000	19000000	30000000
DJH01A	>250	>2500	>25000	2620000	5300000	21000000	10000000
DJH01B	>250	>2500	>25000	2360000	4700000	27000000	10000000
DJH02A	>250	>2500	>25000	2780000	3800000	30000000	10000000
DJH02B	>250	>2500	>25000	2750000	5100000	25000000	10000000
Promedio	>250	>2500	>25000	510,000	4984102.72	22171693.2	22190181.7

Tabla N°64 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁷ UFC/mL en carne de res (chuleta) 8 días

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁷ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	604000	2620000	4600000	21000000	10000000
SS001B	>250	>2500	569000	2620000	4800000	18000000	20000000
SS002A	>250	>2500	538000	2590000	4900000	20000000	30000000
SS002B	>250	>2500	504000	2590000	5300000	24000000	20000000
SS003A	>250	>2500	571000	2500000	5500000	29000000	50000000
SS003B	>250	>2500	500000	2560000	5600000	19000000	20000000
SS004A	>250	>2500	490000	2560000	5800000	25000000	10000000
SS004B	>250	>2500	601000	2500000	3500000	20000000	30000000
SS005A	>250	>2500	590000	2500000	5900000	13000000	20000000
SS005B	>250	>2500	499000	2330000	6300000	26000000	20000000
SS006A	>250	>2500	508000	2210000	4900000	28000000	40000000
SS006B	>250	>2500	512000	2170000	3800000	17000000	30000000
DJH01A	>250	>2500	473000	2360000	4600000	11000000	10000000
DJH01B	>250	>2500	501000	2620000	4700000	20000000	10000000
DJH02A	>250	>2500	509000	2750000	5100000	22000000	10000000
DJH02B	>250	>2500	511000	2780000	5300000	19000000	10000000
Promedio	>250	>2500	528442.397	2510,550	4984102.718	20151671.66	18401214.3

Tabla N°65 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁷ UFC/mL en carne de res (chuleta) 15 días

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁷ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	>25000	2620000	5600000	10000000	10000000
SS001B	>250	>2500	>25000	2500000	5300000	9000000	20000000
SS002A	>250	>2500	>25000	2500000	4800000	11000000	10000000
SS002B	>250	>2500	>25000	2590000	5500000	5000000	20000000
SS003A	>250	>2500	>25000	2620000	4600000	7000000	20000000
SS003B	>250	>2500	>25000	2590000	4900000	10000000	20000000
SS004A	>250	>2500	>25000	2330000	5800000	8000000	10000000
SS004B	>250	>2500	>25000	2560000	3500000	13000000	30000000
SS005A	>250	>2500	>25000	2500000	5900000	11000000	20000000
SS005B	>250	>2500	>25000	2210000	6300000	10000000	20000000
SS006A	>250	>2500	>25000	2170000	4900000	12000000	10000000
SS006B	>250	>2500	>25000	2560000	4600000	10000000	30000000
DJH01A	>250	>2500	>25000	2620000	5300000	13000000	10000000
DJH01B	>250	>2500	>25000	2360000	4700000	11000000	10000000
DJH02A	>250	>2500	>25000	2780000	3800000	10000000	10000000
DJH02B	>250	>2500	>25000	2750000	5100000	9000000	10000000
Promedio	>250	>2500	>25000	510.000	4984102.72	9697963.96	14877378.3

Tabla N°66 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁷ UFC/mL en carne de res (chuleta)

TIEMPO	CONCENTRACION UFC/mL
24 HORAS	280000000
48 HORAS	250000000
72HORAS	22000000
8 DIAS	180000000
15 DIAS	140000000

Tabla N°67 Promedio de resultados ausencia o presencia de *Salmonella spp* en carne de res(chuleta).

TIEMPO	PRESENCIA O AUSENCIA DE SALMONELLA SPP
24 HORAS	10000
48 HORAS	10000
72HORAS	8000
8 DIAS	0
15 DIAS	0

Tabla N°68 Resultados de la determinación de color en las muestras de carne de res (chuleta) con la concentración 10^6 UFC/g de *Lactobacillus acidophilus*

TIEMPO	COLOR		PORCENTAJE	
	ROJO	VERDE-AZUL	ROJO	VERDE-AZUL
24 HORAS	16	0	100	0
48 HORAS	15	1	93.75	6.25
72 HORAS	13	3	81.25	18.75
8 DIAS	3	13	18.75	81.25
15 DIAS	1	15	6.25	93.75

Tabla N°69 Resultados de la determinación de color en las muestras de carne de res (chuleta) con la concentración 10^6 UFC/g de *Lactobacillus acidophilus*

TIEMPO	COLOR		PORCENTAJE	
	ROJO	VERDE-AZUL	ROJO	VERDE-AZUL
24 HORAS	16	0	100	0
48 HORAS	16	0	100	0
72 HORAS	16	0	100	0
8 DIAS	13	3	81.25	18.75
15 DIAS	11	5	68.75	31.25

Tabla N°70 Determinación de pH en muestras de carne de res (chuleta)
concentración 10^6 UFC/g de *Lactobacillus acidophilus*.

Muestras (código)	24 Hr	48 Hr	72 Hr	8 Días	15 Días
SS001A	5.74	6.02	6.19	6.22	6.26
SS002A	5.92	6	6.06	6.14	6.32
SS003A	5.70	5.91	6.13	6.22	6.23
SS004A	6.20	6.22	6.22	6.24	6.25
SS005A	6.00	6.03	6.10	6.19	6.23
SS006A	6.14	6.19	6.22	6.29	6.34
DJH01A	6.00	6.11	6.21	6.33	6.35
DJH02A	6.25	6.26	6.26	6.28	6.32
SS001B	5.64	5.88	6.15	6.24	6.39
SS002B	5.95	6.03	6.13	6.19	6.27
SS003B	5.87	5.99	6.08	6.27	6.40
SS004B	6.25	6.27	6.29	6.33	6.38
SS005B	5.99	6.05	6.21	6.33	6.39
SS006B	6.04	6.11	6.28	6.38	6.41
DJH01B	6.03	6.26	6.27	6.30	6.44
DJH02B	6.15	6.18	6.20	6.27	6.30
PROMEDIO	5.991875	6.094375	6.1875	6.26375	6.33

Tabla N°71 Determinación de pH en muestras de carne de res(chuleta)
concentración 10^7 UFC/g de *Lactobacillus acidophilus*.

Muestras (código)	24 Hr	48 Hr	72 Hr	8 Días	15 Días
SS001A	5.72	5.92	6.11	6.37	6.47
SS002A	5.92	6.02	6.13	6.22	6.25
SS003A	5.85	5.93	6.17	6.21	6.36
SS004A	6.08	6.11	6.15	6.31	6.43
SS005A	6.04	6.14	6.20	6.25	6.3
SS006A	6.03	6.11	6.21	6.29	6.31
DJH01A	6.22	6.31	6.32	6.39	6.40
DJH02A	6.11	6.22	6.27	6.28	6.33
SS001B	5.33	5.55	6.15	6.23	6.27
SS002B	6.06	6.12	6.17	6.22	6.26
SS003B	5.75	5.99	6.14	6.21	6.25
SS004B	6.20	6.27	6.30	6.39	6.41
SS005B	6.10	6.14	6.21	6.33	6.39
SS006B	6.01	6.11	6.24	6.35	6.41
DJH01B	6.00	6.19	6.29	6.30	6.36
DJH02B	6.07	6.13	6.22	6.27	6.28
PROMEDIO	5.968125	6.07875	6.205	6.28875	6.3425

ANEXO N° 18

RESULTADOS DE TERCER ENSAYO

Tabla N°72 Resultado de pruebas bioquímicas

PRUEBA	RESULTADO ESPERADO	RESULTADO OBTENIDO	OBSERVACIONES
INDOL	Positivo	Positivo	Formación de un anillo color rojo
VOGES-PROSKAUER	Positivo	Positivo	Coloración naranja a rosa
ROJO DE METILO	Positivo	Positivo	Coloración roja
MOTILIDAD	Positivo	Positivo	Movilidad mas alla de la punzada de la siembra
TSI	Positivo Producción de H ₂ S (gas)	Positivo	Producción de gas (H ₂ S)
CITRATO	Positivo	Positivo	Coloración verde en el bisel

Tabla N°73 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁶ UFC/MI en carne de res (chuleta) 24 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	>25000	2620000	6100000	19000000
SS001B	>250	>2500	>25000	2500000	6400000	10000000
SS002A	>250	>2500	>25000	2500000	4800000	38000000
SS002B	>250	>2500	>25000	2590000	5500000	28000000
SS003A	>250	>2500	>25000	2620000	5600000	9000000
SS003B	>250	>2500	>25000	2590000	4900000	11000000
SS004A	>250	>2500	>25000	2330000	5800000	14000000
SS004B	>250	>2500	>25000	2560000	3500000	33000000
SS005A	>250	>2500	>25000	2500000	5900000	38000000
SS005B	>250	>2500	>25000	2210000	6300000	36000000
SS006A	>250	>2500	>25000	2170000	5300000	24000000
SS006B	>250	>2500	>25000	2560000	4600000	29000000
DJH01A	>250	>2500	>25000	2620000	5300000	30000000
DJH01B	>250	>2500	>25000	2360000	4700000	26000000
DJH02A	>250	>2500	>25000	2780000	3800000	22000000
DJH02B	>250	>2500	>25000	2750000	5100000	29000000
Promedio	>250	>2500	>25000	510,000	5158182.79	22521584.3

Tabla N°74 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁶ UFC/mL en carne de res (chuleta) 48 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻²	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻⁴	Dilución 10 ⁻⁵	Dilución 10 ⁻⁶
SS001A	>250	>2500	>25000	2330000	6100000	19000000
SS001B	>250	>2500	>25000	2500000	6400000	10000000
SS002A	>250	>2500	>25000	2500000	4800000	38000000
SS002B	>250	>2500	>25000	2590000	5500000	28000000
SS003A	>250	>2500	>25000	2590000	5600000	9000000
SS003B	>250	>2500	>25000	2620000	4900000	11000000
SS004A	>250	>2500	>25000	2620000	5800000	14000000
SS004B	>250	>2500	>25000	2170000	3500000	33000000
SS005A	>250	>2500	>25000	2210000	5900000	38000000
SS005B	>250	>2500	>25000	2500000	6300000	36000000
SS006A	>250	>2500	>25000	2560000	5300000	24000000
SS006B	>250	>2500	>25000	2560000	4600000	29000000
DJH01A	>250	>2500	>25000	2620000	5300000	30000000
DJH01B	>250	>2500	>25000	2360000	4700000	26000000
DJH02A	>250	>2500	>25000	2750000	3800000	22000000
DJH02B	>250	>2500	>25000	2780000	5100000	29000000
Promedio	>250	>2500	>25000	3648,659	5158182.79	22521584.3

Tabla N°75 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁶ UFC/mL en carne de res (chuleta) 72 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	>25000	2620000	5600000	20000000
SS001B	>250	>2500	>25000	2500000	5300000	19000000
SS002A	>250	>2500	>25000	2500000	4800000	22000000
SS002B	>250	>2500	>25000	2590000	5500000	17000000
SS003A	>250	>2500	>25000	2620000	4600000	24000000
SS003B	>250	>2500	>25000	2590000	4900000	20000000
SS004A	>250	>2500	>25000	2330000	5800000	27000000
SS004B	>250	>2500	>25000	2560000	3500000	11000000
SS005A	>250	>2500	>25000	2500000	5900000	28000000
SS005B	>250	>2500	>25000	2210000	6300000	31000000
SS006A	>250	>2500	>25000	2170000	4900000	24000000
SS006B	>250	>2500	>25000	2560000	4600000	19000000
DJH01A	>250	>2500	>25000	2620000	5300000	21000000
DJH01B	>250	>2500	>25000	2360000	4700000	27000000
DJH02A	>250	>2500	>25000	2780000	3800000	30000000
DJH02B	>250	>2500	>25000	2750000	5100000	25000000
Promedio	>250	>2500	>25000	510,000	4984102.72	22171693.2

Tabla N°76 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁶ UFC/mL en carne de res (chuleta) 8 días

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	604000	2620000	4600000	21000000
SS001B	>250	>2500	569000	2620000	4800000	18000000
SS002A	>250	>2500	538000	2590000	4900000	20000000
SS002B	>250	>2500	504000	2590000	5300000	24000000
SS003A	>250	>2500	571000	2500000	5500000	29000000
SS003B	>250	>2500	500000	2560000	5600000	19000000
SS004A	>250	>2500	490000	2560000	5800000	25000000
SS004B	>250	>2500	601000	2500000	3500000	20000000
SS005A	>250	>2500	590000	2500000	5900000	13000000
SS005B	>250	>2500	499000	2330000	6300000	26000000
SS006A	>250	>2500	508000	2210000	4900000	28000000
SS006B	>250	>2500	512000	2170000	3800000	17000000
DJH01A	>250	>2500	473000	2360000	4600000	11000000
DJH01B	>250	>2500	501000	2620000	4700000	20000000
DJH02A	>250	>2500	509000	2750000	5100000	22000000
DJH02B	>250	>2500	511000	2780000	5300000	19000000
Promedio	>250	>2500	528442.397	2510,550	4984102.72	20151671.7

Tabla N°77 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁶ UFC/mL en carne de res (chuleta) 15 días

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/MI	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	>25000	2620000	5600000	10000000
SS001B	>250	>2500	>25000	2500000	5300000	9000000
SS002A	>250	>2500	>25000	2500000	4800000	11000000
SS002B	>250	>2500	>25000	2590000	5500000	5000000
SS003A	>250	>2500	>25000	2620000	4600000	7000000
SS003B	>250	>2500	>25000	2590000	4900000	10000000
SS004A	>250	>2500	>25000	2330000	5800000	8000000
SS004B	>250	>2500	>25000	2560000	3500000	13000000
SS005A	>250	>2500	>25000	2500000	5900000	11000000
SS005B	>250	>2500	>25000	2210000	6300000	10000000
SS006A	>250	>2500	>25000	2170000	4900000	12000000
SS006B	>250	>2500	>25000	2560000	4600000	10000000
DJH01A	>250	>2500	>25000	2620000	5300000	13000000
DJH01B	>250	>2500	>25000	2360000	4700000	11000000
DJH02A	>250	>2500	>25000	2780000	3800000	10000000
DJH02B	>250	>2500	>25000	2750000	5100000	9000000
Promedio	>250	>2500	>25000	510,000	4984102.72	9697963.96

Tabla N°78 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁶ UFC/mL en carne de res (chuleta)

TIEMPO	CONCENTRACION UFC/mL
24 HORAS	23000000
48 HORAS	23000000
72HORAS	22000000
8 DIAS	20000000
15 DIAS	10000000

Tabla N°79 Promedio de resultados de presencia o ausencia *Salmonella spp* en carne de res(chuleta).

TIEMPO	PRESENCIA O AUSENCIA DE SALMONELLA SPP
24 HORAS	10000
48 HORAS	10000
72HORAS	10000
8 DIAS	10000
15 DIAS	10000

Tabla N°80 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁷ UFC/mL en carne de res (chuleta) 24 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁷ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	>25000	2290000	6100000	19000000	50000000
SS001B	>250	>2500	>25000	2330000	6400000	10000000	40000000
SS002A	>250	>2500	>25000	2400000	4800000	38000000	30000000
SS002B	>250	>2500	>25000	2500000	5500000	28000000	50000000
SS003A	>250	>2500	>25000	2590000	5600000	9000000	20000000
SS003B	>250	>2500	>25000	2620000	4900000	11000000	30000000
SS004A	>250	>2500	>25000	2720000	5800000	14000000	40000000
SS004B	>250	>2500	>25000	2560000	3500000	33000000	10000000
SS005A	>250	>2500	>25000	2500000	5900000	38000000	30000000
SS005B	>250	>2500	>25000	2860000	6300000	36000000	50000000
SS006A	>250	>2500	>25000	2780000	5300000	24000000	20000000
SS006B	>250	>2500	>25000	2620000	4600000	29000000	30000000
DJH01A	>250	>2500	>25000	2560000	5300000	30000000	40000000
DJH01B	>250	>2500	>25000	2350000	4700000	26000000	10000000
DJH02A	>250	>2500	>25000	2210000	3800000	22000000	10000000
DJH02B	>250	>2500	>25000	2170000	5100000	29000000	30000000
Promedio	>250	>2500	>25000	2496,234	5158182.79	22521584.3	26957043.9

Tabla N°81 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁷ UFC/mL en carne de res (chuleta) 48 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁷ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	>25000	2330000	6100000	19000000	40000000
SS001B	>250	>2500	>25000	2500000	6400000	10000000	30000000
SS002A	>250	>2500	>25000	2500000	4800000	38000000	30000000
SS002B	>250	>2500	>25000	2590000	5500000	28000000	50000000
SS003A	>250	>2500	>25000	2590000	5600000	9000000	50000000
SS003B	>250	>2500	>25000	2620000	4900000	11000000	50000000
SS004A	>250	>2500	>25000	2620000	5800000	14000000	40000000
SS004B	>250	>2500	>25000	2170000	3500000	33000000	30000000
SS005A	>250	>2500	>25000	2210000	5900000	38000000	20000000
SS005B	>250	>2500	>25000	2500000	6300000	36000000	20000000
SS006A	>250	>2500	>25000	2560000	5300000	24000000	10000000
SS006B	>250	>2500	>25000	2560000	4600000	29000000	10000000
DJH01A	>250	>2500	>25000	2620000	5300000	30000000	40000000
DJH01B	>250	>2500	>25000	2360000	4700000	26000000	10000000
DJH02A	>250	>2500	>25000	2750000	3800000	22000000	10000000
DJH02B	>250	>2500	>25000	2780000	5100000	29000000	30000000
Promedio	>250	>2500	>25000	3648,659	5158182.785	22521584.33	25168201.8

Tabla N°82 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁷ UFC/mL en carne de res (chuleta) 72 horas

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁷ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	>25000	2620000	5600000	20000000	10000000
SS001B	>250	>2500	>25000	2500000	5300000	19000000	20000000
SS002A	>250	>2500	>25000	2500000	4800000	22000000	30000000
SS002B	>250	>2500	>25000	2590000	5500000	17000000	40000000
SS003A	>250	>2500	>25000	2620000	4600000	24000000	50000000
SS003B	>250	>2500	>25000	2590000	4900000	20000000	50000000
SS004A	>250	>2500	>25000	2330000	5800000	27000000	40000000
SS004B	>250	>2500	>25000	2560000	3500000	11000000	30000000
SS005A	>250	>2500	>25000	2500000	5900000	28000000	20000000
SS005B	>250	>2500	>25000	2210000	6300000	31000000	20000000
SS006A	>250	>2500	>25000	2170000	4900000	24000000	40000000
SS006B	>250	>2500	>25000	2560000	4600000	19000000	30000000
DJH01A	>250	>2500	>25000	2620000	5300000	21000000	10000000
DJH01B	>250	>2500	>25000	2360000	4700000	27000000	10000000
DJH02A	>250	>2500	>25000	2780000	3800000	30000000	10000000
DJH02B	>250	>2500	>25000	2750000	5100000	25000000	10000000
Promedio	>250	>2500	>25000	510,000	4984102.72	22171693.2	22190181.7

Tabla N°83 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁷ en carne de res (chuleta) 8 días

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/ml	Dilución 10 ⁻² UFC/ml	Dilución 10 ⁻³ UFC/ml	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/ml	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁷ UFC/ml
SS001A	>250	>2500	604000	2620000	4600000	21000000	10000000
SS001B	>250	>2500	569000	2620000	4800000	18000000	20000000
SS002A	>250	>2500	538000	2590000	4900000	20000000	30000000
SS002B	>250	>2500	504000	2590000	5300000	24000000	20000000
SS003A	>250	>2500	571000	2500000	5500000	29000000	50000000
SS003B	>250	>2500	500000	2560000	5600000	19000000	20000000
SS004A	>250	>2500	490000	2560000	5000000	25000000	10000000
SS004B	>250	>2500	601000	2500000	3500000	20000000	30000000
SS005A	>250	>2500	590000	2500000	5900000	13000000	20000000
SS005B	>250	>2500	499000	2330000	6300000	26000000	20000000
SS006A	>250	>2500	508000	2210000	4900000	20000000	40000000
SS006B	>250	>2500	512000	2170000	3800000	17000000	30000000
DJH01A	>250	>2500	473000	2360000	4600000	11000000	10000000
DJH01B	>250	>2500	501000	2620000	4700000	20000000	10000000
DJH02A	>250	>2500	509000	2750000	5100000	22000000	19000000
DJH02B	>250	>2500	511000	2780000	5300000	19000000	10000000
Promedio	>250	>2500	528442.397	2510.550	4984102.718	20151671.66	18401214.3

Tabla N°84 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁷ UFC/mL en carne de res (chuleta) 15 días

Muestras (código)	Dilución 10 ⁻¹ UFC/mL	Dilución 10 ⁻² UFC/mL	Dilución 10 ⁻³ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁴ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁵ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁶ UFC/mL	Dilución 10 ⁻⁷ UFC/mL
SS001A	>250	>2500	>25000	2620000	5600000	10000000	10000000
SS001B	>250	>2500	>25000	2500000	5300000	9000000	20000000
SS002A	>250	>2500	>25000	2500000	4800000	11000000	10000000
SS002B	>250	>2500	>25000	2590000	5500000	5000000	20000000
SS003A	>250	>2500	>25000	2620000	4600000	7000000	20000000
SS003B	>250	>2500	>25000	2590000	4900000	10000000	20000000
SS004A	>250	>2500	>25000	2330000	5800000	8000000	10000000
SS004B	>250	>2500	>25000	2560000	3500000	13000000	30000000
SS005A	>250	>2500	>25000	2500000	5900000	11000000	20000000
SS005B	>250	>2500	>25000	2210000	6300000	10000000	20000000
SS006A	>250	>2500	>25000	2170000	4900000	12000000	10000000
SS006B	>250	>2500	>25000	2560000	4600000	10000000	30000000
DJH01A	>250	>2500	>25000	2620000	5300000	13000000	10000000
DJH01B	>250	>2500	>25000	2360000	4700000	11000000	10000000
DJH02A	>250	>2500	>25000	2780000	3800000	10000000	10000000
DJH02B	>250	>2500	>25000	2750000	5100000	9000000	10000000
Promedio	>250	>2500	>25000	510,000	4984102.72	9697963.96	14877378.3

Tabla N°85 Concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* 10⁷ UFC/mL en carne de res (chuleta)

TIEMPO	CONCENTRACION UFC/mL
24 HORAS	280000000
48 HORAS	250000000
72HORAS	220000000
8 DIAS	180000000
15 DIAS	140000000

Tabla N°86 Promedio de resultado de presencia o ausencia de *Salmonella spp* en carne de res (chuleta).

Tiempo	Concentración 10 ⁶ UFC/mL	Concentración 10 ⁷ UFC/mL
24Hr	10000	10000
48Hr	8000	7000
72Hr	5000	2000
8Dias	0	0
15Dias	0	0

Tabla N°87 Resultados de la determinación de color en las muestras de carne de res (chuleta) con la concentración 10^6 ufc/g de *Lactobacillus acidophilus*

TIEMPO	COLOR		PORCENTAJE	
	ROJO	VERDE-AZUL	ROJO	VERDE-AZUL
24 HORAS	16	0	100	0
48 HORAS	16	0	100	0
72 HORAS	16	0	100	0
8 DIAS	16	0	100	0
15 DIAS	16	0	100	0

Tabla N°88 Resultados de la determinación de color en las muestras de carne de res (chuleta) con la concentración 10^7 UFC/g de *Lactobacillus acidophilus*

TIEMPO	COLOR		PORCENTAJE	
	ROJO	VERDE-AZUL	ROJO	VERDE-AZUL
24 HORAS	16	0	100	0
48 HORAS	16	0	100	0
72 HORAS	16	0	100	0
8 DIAS	16	0	100	0
15 DIAS	16	0	100	0

Tabla N°89 Determinación de pH en muestras de carne de res (chuleta)
concentración 10^7 UFC/g de *Lactobacillus acidophilus*.

Muestras (código)	24 Hr	48 Hr	72 Hr	8 Días	15 Días
SS001A	5.64	5.78	5.91	6.12	6.26
SS002A	5.32	5.55	5.78	6.21	6.31
SS003A	5.69	5.81	5.96	6.19	6.23
SS004A	6.02	6.13	6.18	6.22	6.25
SS005A	6	6.08	6.12	6.21	6.26
SS006A	6.03	6.1	6.18	6.26	6.31
DJH01A	6	6.11	6.21	6.28	6.36
DJH02A	6.05	6.18	6.21	6.26	6.29
SS001B	6.03	6.12	6.18	6.21	6.25
SS002B	5.87	5.93	6.08	6.19	6.26
SS003B	5.41	5.73	5.94	6.15	6.28
SS004B	5.52	5.78	5.98	6.14	6.3
SS005B	5.71	5.87	6.01	6.13	6.27
SS006B	5.89	5.92	6.04	6.25	6.33
DJH01B	6.08	6.11	6.17	6.24	6.31
DJH02B	6.1	6.17	6.22	6.26	6.37
PROMEDIO	5.835	5.960625	6.073125	6.2075	6.29

Tabla N°89 Determinación de pH en muestras de carne de res (chuleta)
concentración 10^7 UFC/g de *Lactobacillus acidophilus*.

Muestras (código)	24 Hr	48 Hr	72 Hr	8 Días	15 Días
SS001A	6.03	6.15	6.22	6.31	6.47
SS002A	5.89	5.92	6.07	6.17	6.25
SS003A	5.79	5.81	5.94	6.26	6.36
SS004A	6.00	6.13	6.25	6.31	6.43
SS005A	5.98	6.08	6.14	6.21	6.30
SS006A	6.01	6.13	6.18	6.28	6.31
DJH01A	6.17	6.18	6.21	6.33	6.40
DJH02A	6.15	6.18	6.20	6.27	6.33
SS001B	5.81	6.09	6.16	6.21	6.30
SS002B	5.79	6.03	6.15	6.26	6.33
SS003B	5.89	5.98	6.16	6.30	6.40
SS004B	6.20	6.22	6.24	6.35	6.40
SS005B	6.00	6.19	6.24	6.29	6.35
SS006B	6.17	6.19	6.21	6.25	6.45
DJH01B	6.00	6.11	6.27	6.32	6.39
DJH02B	6.13	6.17	6.22	6.29	6.37
PROMEDIO	6.000625	6.0975	6.17875	6.275625	6.365

ANEXO N°19

RESULTADOS DE PRUEBA DE LABORATORIO



Figura N°33 Recolección de muestras de carnes en los supermercados

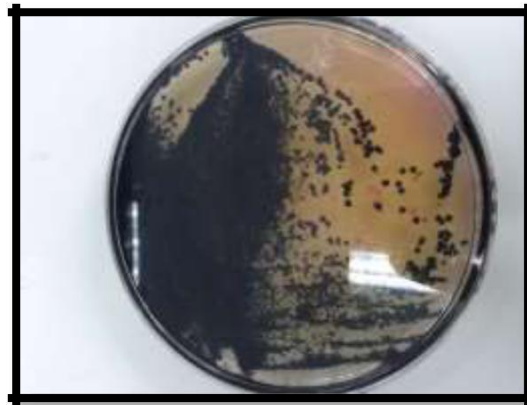


Figura N°34 Resultado de la comprobación de presencia/ausencia de *Salmonella spp* en carne de res(chuelta)



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figura N°35 Resultados de Pruebas bioquímicas presencia o ausencia de *Salmonella spp* en carne de res(chuleta)
a) Prueba rojo de metilo, b)Prueba de indol, c) Prueba de TSI, d)Prueba de Voges-Proskauer, e) Prueba de citrato, f) Prueba de movilidad.



Figura N°36 Inoculación de la muestra con *Salmonella* spp y *Lactobacillus acidophilus*



(a)



(b)

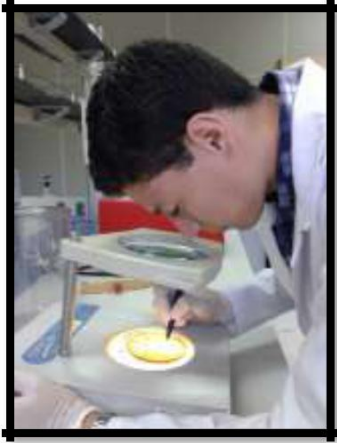


(c)

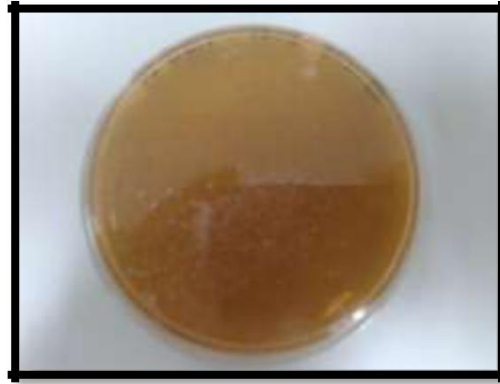


(d)

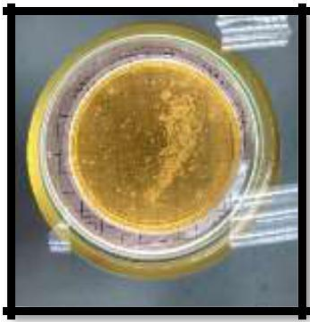
Figura N° 37 Imágenes del procedimiento para el recuento de *Lactobacillus acidophilus*: a) Muestras de carnes de res (chuelta) tratadas por Stomacher, b) Preparación de las diluciones para el recuento de *Lactoacillus acidophilus*, c) Siembras de las diluciones en agar MRS para el recuento del *Lactoacillus acidophilus*, d) Incubación en jarra de anaerobiosis de las muestras para el recuento en agar MRS



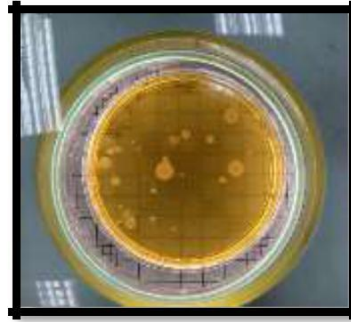
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura N°38 Imágenes del recuento de *Lactobacillus acidophilus*

(a) Realizando el recuento de *Lactobacillus acidophilus*

(b), (c), (d) Placas con *Lactobacillus acidophilus*

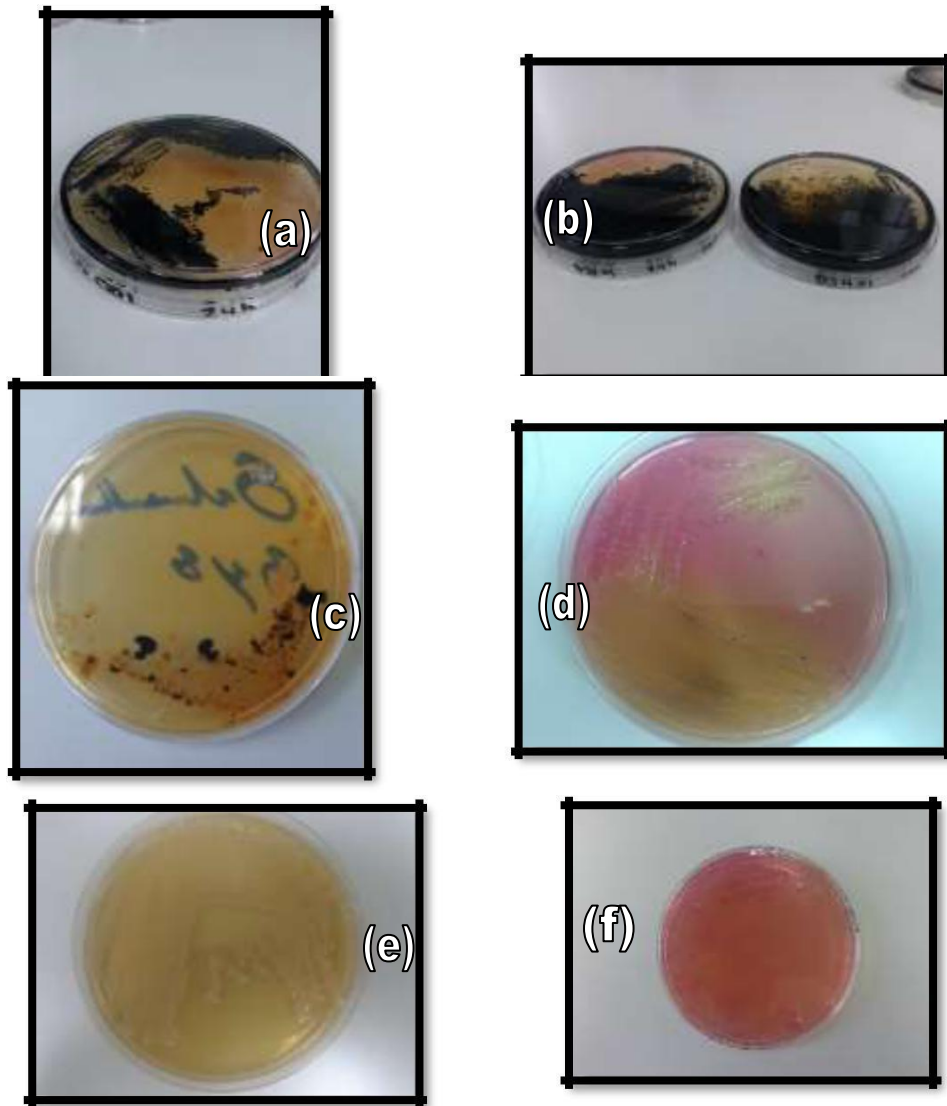



Figura N°39 Imágenes de la comprobación de presencia/ausencia de

Salmonella spp

- (a) Presencia de *Salmonella spp* en una de las placas con *Lactobacillus acidophilus* 10^3 ufc/g (primer ensayo)
- (b) Presencia de *Salmonella spp* en una de las placas con *Lactobacillus acidophilus* 10^5 ufc/g (primer ensayo)
- (c) Presencia de *Salmonella spp* en una de las placas con *Lactobacillus acidophilus* 10^6 ufc/g (segundo ensayo)
- (d) Presencia de *Salmonella spp* en una de las placas con *Lactobacillus acidophilus* 10^7 ufc/g (segundo ensayo)
- (e) Presencia de *Salmonella spp* en una de las placas con *Lactobacillus acidophilus* 10^6 ufc/g (tercer ensayo)
- (f) Presencia de *Salmonella spp* en una de las placas con *Lactobacillus acidophilus* 10^7 ufc/g (tercer ensayo)

ANEXO N° 20

CERTIFICADO DE CALIDAD DE *Lactobacillus acidophilus*

 Insumos y tecnología para la industria alimentaria	FICHA TECNICA L. Acidophilus 50 DCU-S	CI - 260 / 02
		Versión 001
		Página 1 de 3
		Fecha de Emisión: 18-04-13

DANISCO

Descripción

Un cultivo probiótico liofilizado en la forma de polvo para la aplicación de alimento.
 (S=peso estandarizado)

Áreas de aplicación

Lácteos.

Beneficios

Producción

Dosis

Según el producto a elaborar y su formulación.

Instrucciones de uso

Desinfecte el sachet con un desinfectante apropiado antes de abrir.
 Abra el sachet y agregue la cultura directamente al producto. Agite o mezcle para
 aproximadamente 30 minutos en la velocidad baja.

Composición

Lactobacillus acidophilus
 Soporte: dextrosa

Especificaciones fisico-químicas

No aplica.

Especificaciones microbiológicas


Control de calidad Microbiológico - métodos y valores estándar.

Recuento celular:	> = 5.0E+12 CFU/bolsa**
Bacteria no ácido láctico	< 500 CFU/g
Enterobacterias	< 10 CFU/g
Levaduras y Mohos	< 10 CFU/g
Enterococci	< 100 CFU/g
Coagulase-positive staphylococci	< 10 CFU/g
Listeria monocytogenes	neg. / 25 g
Salmonella spp	neg. / 25 g

Los métodos analíticos estan disponibles por la petición.

** 1 DCU = 1.0E + 11 CFU (Unidad Formadora de Colonias.)

Figura N° 40 Certificado de calidad de *Lactobacillus acidophilus*

 <p>cimpa s.a.s. Insumos y tecnología para la industria alimentaria</p>	<p>FICHA TECNICA L. Acidophilus 50 DCU-S</p>	CI - 260 / 02
		Versión 001
		Página 2 de 3
		Fecha de Emisión: 18-04-13

Especificaciones de metales pesados

No aplica.

Datos nutricionales

No aplica.

Almacenamiento

Refrigere en recibo.

El periodo de conservación es 12 meses cuando almacenado (abajo de 4°C) en el paquete original y cerrado.

Embalaje

Folio laminado PE,PET Al

Cantidad

Contenido >=50 DCU/bolsa.

Este producto tiene el peso estandarizado de 50 g.

Pureza y legislación

L. Acidophilus LYO 50 DCU-S responde a las exigencias impuestas por la legislación de la Unión Europea.

Las regulaciones alimentarias de etiquetado deben ser sistemáticamente consultadas en cuanto a la situación de este producto; la legislación en el uso alimentario puede variar en función del país.

Seguridad y manipulación

La ficha de seguridad esta disponible bajo petición.

País de origen

Francia

Certificación Kosher

KOSHER lácteo.

Figura N° 40 Continuación

Certificación Halal

Certificado por Halal Food Council of Europe (HFCE)

GMO

L. Acidophilus LYO 50 DCU-S no consiste de, no contiene, no está producido por organismos genéticamente modificados de acuerdo a la Regulación 1829/2003 (UE) y la Regulación 1830/2003 (UE) del Parlamento Europeo en la Reunión del 22 de septiembre del 2003.

Alergénicos

Esta tabla indica la presencia de los producto alergénicos y derivados siguientes:

Si	No	Alergénicos	Descripción de los componentes
	X	Trigo	
	X	Otros cereales que contengan gluten	
	X	Crustáceos	
	X	Huevos	
	X	Pescado	
	X	Cacahuetes	
	X	Soja	
	X	Leche (incluida la lactosa)	
	X	Frutos de cascara	
	X	Apio	
	X	Mostaza	
	X	Granos de sésamo	
	X	Anhidrido sulfuroso y sulfitos (>10mg/kg)	
	X	Altramucos	
	X	Moluscos	

Las regulaciones locales deberán siempre ser consultadas ya que los requerimientos de etiquetado de alérgenos pueden variar en función del país.



CIMPA S.A.S. declara que los resultados reportados en el presente certificado, son tomados de la información suministrada por nuestro Proveedor, por lo tanto se fundamenta en sus técnicas de análisis autorizadas. Dicha información es enviada a Nuestros Clientes de realizar sus propios análisis.

Figura N° 40 Continuación