

EFECTO DE 2, 4 y 6 kGy SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE HAMBURGUESA DE POLLO ALMACENADAS A 2 ± 2 °C

Torres Z. ⁽¹⁾ ztorres@ipen.gob.pe, Vivanco M. ⁽¹⁾, Basurto H. ⁽²⁾, Silva M. ⁽²⁾

(1) Instituto Peruano de Energía Nuclear / Lima, Perú

(2) Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) / Lima, Perú

RESUMEN

Se determinó la dosis de reducción decimal (D_{10}) de *S. typhimurium* en caldo Casoy (TSB) e inoculada en hamburguesa de pollo obteniéndose D_{10} de 0,425 y 0,547 kGy respectivamente, siendo el segundo valor 22,3 % superior. Posteriormente, hamburguesas previamente radioesterilizadas a 15 kGy fueron inoculadas con *S. typhimurium*, y sometidas a dosis de 2, 4 y 6 kGy, que fueron almacenadas por 57 días a 2 ± 2 °C y HR 90-95%. Otro lote de hamburguesas, sin radioesterilización, fue sometido también a 2, 4 y 6 kGy y almacenadas bajo las mismas condiciones con el fin de estudiar la flora natural. Se observó que existe un efecto sinérgico entre dosis de irradiación y tiempo de almacenamiento ($\alpha=5\%$) en el recuento de *S. typhimurium*. En hamburguesas sin irradiar, el número de coliformes totales se incrementó de 29 a 4250 NMP/g en el día 22 y para coliformes fecales de 4 a 240 NMP/g, para volver a disminuir al final del periodo de almacenamiento mientras que en las muestras irradiadas no se encontró presencia de coliformes. Las bacterias mesófilas y psicrófilas nativas disminuyeron su capacidad de formar colonias, proporcionalmente a la dosis de irradiación aplicada. Sin embargo, conforme avanzó el tiempo de almacenamiento, estas bacterias recuperaron su capacidad de crecimiento y de causar deterioro.

ABSTRACT

Decimal reduction dose (D_{10}) of *S. typhimurium* irradiated in Casoy broth (TSB) and inoculated in chicken burger was found to be 0,425 y 0,547 kGy respectively being the second value 22,3 % higher than the first one. Then, chicken burger previously radioesterilized at 15 kGy were inoculated with *S. typhimurium*, irradiated at 2, 4 y 6 kGy and kept under storage for 57 days at 2 ± 2 °C y HR 90–95%. Another batch of

chicken burger without radiosterilization was irradiated at 2, 4 y 6 kGy and stored under the same conditions than the previous one in order to study the natural bacterial flora. It was observed that does exist a synergic effect irradiation dose a time of storage ($\alpha=5\%$) in the counting of *S. typhimurium*. In unirradiated chicken burger, the number of total coliforms was increased from 29 NMP/g at the beginning to 4250 NMP/g at the day 22 and fecal coliforms from 4 to 240 NMP/g; subsequently the number of these bacteria dropped again at the end of the storage time, while in irradiated samples there was not found coliforms. Mesophilic and psychrotrophic bacteria diminished its ability of growing up and making colonies, proportionally at the applied irradiation doses. However, as the storage time advanced these bacteria recovered its ability of growing up and of causing spoilage.

1. INTRODUCCIÓN

El pollo es la fuente de proteína animal de mayor consumo en el Perú [1]. Los grandes volúmenes de producción han permitido la segmentación del mercado creando subproductos con alto valor agregado como la hamburguesa de pollo (carne de pollo, grasa, sal, polifosfatos y pan rayado). Este producto, además de presentar características favorables para el desarrollo de microorganismos (alta A_w , pH cercano a 7 y nutrientes fácilmente disponibles) está expuesto durante su proceso de elaboración a la contaminación microbiana proveniente de diversas fuentes [2]. A los saprófitos ya conocidos *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Achromobacter*, *Proteus* y *Micrococcus* se suman los patógenos *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* y diferentes especies de *Salmonellas*, los cuales están presentes en el 30% de las carcasas de las aves de consumo humano siendo *Salmonella typhimurium* la más importante por su difusión y patogenicidad [3] y por ser en el

Perú la segunda causa de enfermedades diarreicas sólo superado por *V. cholerae* [1]. Debido a las características de su proceso de elaboración, este no ha recibido tratamiento para reducir su carga microbiana, por lo que tiene que estar sometido a una rigurosa cadena de frío. Además, algunas cepas de *S. typhimurium*, han demostrado ser resistentes a temperaturas tan bajas como -18°C en sistemas alimenticios [4]. La irradiación ha demostrado ser un buen método para controlar los microorganismos patógenos y en especial *S. typhimurium* que contamina la carne de pollo (ver Refs [5-8]). Además, el 21 de septiembre de 1992, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos aprobó la irradiación de carne fresca y congelada de pollo hasta una dosis de 3 kGy para controlar ciertas bacterias comunes a la carne de pollo que pueden causar enfermedad cuando el pollo no es bien cocido o es mal manipulado [9].

Los objetivos del presente estudio fueron: determinar la dosis de reducción decimal (D_{10}) de *Salmonella typhimurium* en Caldo Casoy (TSB) y en hamburguesa de pollo para determinar su resistencia, así como evaluar el comportamiento de *S. typhimurium* inoculada y de la carga microbiana natural de hamburguesa almacenadas a $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$ luego de haber sido sometidas a dosis de 2, 4 y 6 kGy.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN) del proyecto Planta de Irradiación Multiuso (PIMU).

2.1 Métodos de análisis

Recuento de bacterias aeróbicas mesófilas viables.- Mediante recuento estándar en placa [11] utilizando Agar tripticosa de soya (TSA) (Merck) con adición del colorante 2-3-5-trifenil-2H-tetrazolo (TTC) (Merck) en una concentración de 10 mg/L de agar (de aquí en adelante llamado TSA+TTC). Se contaron las colonias rojas, rojas con halo transparente y las colonias no pigmentadas.

Recuento de bacterias psicrótrofas.- Mediante recuento estándar en placa [10] utilizando Agar TSA+TTC. Se contaron las

colonias rojas, rojas con halo transparente y las colonias no pigmentadas.

Recuento de coliformes.- Según lo propuesto por [11] usando el Caldo Lauril Sulfato (Merck), Caldo EC (Merck), Caldo Verde Brillante Bilis-Lactosa (BRILA) (Merck), Agar Eosina Blue Metilene-Lattasio sec. Levine (EMB) y galería INVIC (Merck).

Detección de Salmonella.- Método propuesto por [11] usando como medio de pre-enriquecimiento no selectivo Caldo TSB, Caldo Rappaport-Vasilliadis (Merck), y Caldo Tetrionato (TT) (Merck).

Detección de *Staphylococcus aureus*.- Según [11] usando como medio Agar Baird Parker (Merck).

Recuento de mohos y levaduras.- Recuento en placa usando Agar Oxitetraclina Glucosa Extracto de levadura (OGY) con Oxitetraclina (Merck) [11].

2.2 Preparación de muestras

Hamburguesas de pollo (100 g peso, 9 cm diámetro y 0,8 cm espesor aproximadamente) adquiridas de una empresa local fueron trozadas en pedazos de 25 g, transferidos asépticamente a bolsas de polietileno de alta densidad y mantenidos a -18°C hasta su uso.

2.3 Conservación de la cepa

Una cepa de *S. typhimurium* serotipo (O): B (H). I; 1,2 certificada por la unidad de cultivos enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud (INS) fue repicada asépticamente sobre Agar TSA e incubada por 18-24 h a 35°C , y conservada en refrigeración. Antes de cada uso, se verificó la pureza de la cepa mediante inoculación en agar TSI (Merck), LIA (Merck) y medio SIM (Oxoid).

2.4 Determinación del valor D_{10} en caldo TSB

Se sembró *S. typhimurium* sobre Agar TSA e incubó a 35°C por 24 ± 2 h. Las células se recuperaron enjuagando la superficie del agar con 100 mL de caldo TSB consiguiéndose una concentración promedio de 9,7 log ufc/mL. 10 mL de esta

suspensión se vertió en tubos de ensayo de 2 cm de diámetro previamente esterilizados con calor seco a 190 °C por 2 h. Luego estas alícuotas fueron irradiadas a 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1 kGy (Irradiador Gammacell 220, fuente de ⁶⁰Co, Nordion Inc. Canadá) a 20 ± 2 °C en condiciones aerobias y a una tasa de dosis promedio de 2,1 kGy/h. Luego de la irradiación se dejó reposar 30 min para luego ser incubadas, previa dilución, a 35 °C por 24 ± 2 h en placas con agar TSA+TTC y contadas.

2.5 Determinación del valor D₁₀ en hamburguesa de pollo

Con la finalidad que la flora nativa no interfiera en el recuento de *S. typhimurium* a ser inoculada, las hamburguesas fueron previamente radioesterilizadas a 15 kGy y dejadas en reposo por un día, enseguida las hamburguesas fueron inoculadas con *S. typhimurium* vertiendo trozos de 25 g en caldo TSB que contenía un cultivo de 24 h (8 log ufc/mL aproximadamente). El tiempo de contacto fue de 12 h a temperatura ambiente, luego se embolsaron en polietileno de alta densidad, se sellaron y se procedió a irradiar a dosis de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1 kGy a temperatura ambiente (20 ± 2 °C), condiciones aerobias y presión atmosférica. Luego se dio un reposo de 30 min, se realizaron las diluciones y se incubó a 35 °C por 24 ± 2 h en placas con agar TSA+TTC. Se contaron las colonias de color rojo de forma ovalada o esférica.

2.6 Almacenamiento

Trozos de hamburguesa de 25 g usadas para la inoculación de *S. typhimurium* fueron radioesterilizadas a 15 kGy. La inoculación de *S. typhimurium* se realizó igual que en el caso anterior (8 log ufc/mL aproximadamente). Se embolsaron en polietileno de alta densidad en condiciones asépticas, luego se sellaron. Inmediatamente después se realizó la irradiación de las hamburguesas inoculadas así como las no inoculadas a dosis de 2, 4 y 6 kGy más un tratamiento control (sin irradiar). Seguidamente se inició el almacenamiento a 2 ± 2°C, con evaluaciones cada siete días

por 57 días. Otro lote de hamburguesas sin inocular fue irradiado, embolsado y con almacenamiento en las mismas condiciones, en el transcurso del cual se analizaron coliformes totales, coliformes fecales, bacterias aerobias mesófilas viables y bacterias psicrótrofas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

La tabla 1 muestra los recuentos microbiológicos iniciales. Estos resultados están por debajo de los límites máximos permitidos para los diferentes grupos de microorganismos especificados por las normas competentes para carne de pollo [12] excepto el recuento de bacterias psicrótrofas, que incluso es mayor al de las bacterias mesófilas. Estos valores elevados pueden estar relacionados a la alta manipulación sufrida durante el proceso de elaboración así como a las condiciones de almacenamiento en congelación (a -12 °C).

El recuento de coliformes totales fue de 25,4 NMP/g, el cual está muy por debajo del límite máximo de 100 NMP/g que establece la norma. Los hongos presentes posiblemente provengan del pan rallado y de las especias, las cuales contienen normalmente alrededor de 5 log ufc/g [2].

3.1 D₁₀ en caldo TSB

El análisis de la curva de regresión (Fig. 1), indica que existe una relación causa-efecto inversamente proporcional entre dosis de irradiación absorbida por la biomasa microbiana y la tasa de supervivencia. El coeficiente de determinación $r^2 = 0,9943$ indica que la tasa de supervivencia se ajusta al modelo lineal para las dosis de irradiación y concentración de bacterias usadas. El valor D₁₀ indica que la dosis necesaria para reducir la población superviviente en un ciclo logarítmico es 0,425 kGy. Este valor hallado se encuentra dentro del rango de valores reportado por diversos autores [5-8]. Las diferencias pueden deberse a factores experimentales (edad de la cepa, temperatura de incubación e irradiación entre otros).

Tabla 1. Recuentos microbiológicos iniciales de hamburguesa de pollo.

<i>Grupo bacteriano</i>	<i>Promedio de 3 repeticiones (log ufc/g)</i>	<i>Desviación estándar (s¹)</i>	<i>Especificaciones (log ufc/g)²</i>
Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas Viables	5,929	0,022	<6
Recuento de Bacterias psicrótrofas	6,165	0,220	<3
Recuento de mohos y levaduras	6,670	0,056	<3
NMP de Coliformes totales	25,4 NMP/g	3,9	<100 NMP
Detección de Salmonella	Neg./25g	0	neg./25 g
Detección de E. Coli	Neg./25g	0	neg./25 g
Detección de S. Aureus	Neg./25g	0	<2

¹ Desviación estándar.

² Fuente: [12]. Se usaron datos de carne de pollo por no existir norma de referencia para hamburguesa de pollo.

3.2. D₁₀ en hamburguesa

La curva de regresión (Figura 2) indica que existe una relación causa-efecto inversamente proporcional entre dosis de irradiación absorbida y tasa de supervivencia con un coeficiente de determinación $r^2 = 0,9909$ que indica un buen ajuste al modelo lineal.

Comparando los resultados de la radioresistencia de *S. typhimurium* en caldo TSB y en hamburguesas de pollo, se observa que en el segundo caso se incrementó en 0,122 kGy (22,3%). Dickson y Maxcy (1984) citados por [13] afirman que la principal explicación para este incremento se debería a que en los sistemas alimenticios, parte de los productos radiolíticos reaccionarían con el material orgánico produciendo compuestos estables; de no haber material orgánico que reaccione con los compuestos radiolíticos, estos actuarían sobre la célula microbiana.

Comparando la radioresistencia de *S. typhimurium* con las de otros patógenos relacionados a la carne de pollo, se

hallaron valores de D₁₀ de *E. coli* de 0,388 kGy, *Staphylococcus aureus* de 0,419 kGy y *Listeria monocytogenes* 0,27 kGy [6]. En general los valores para estas bacterias varían también en función a los mismos factores que para *S. typhimurium* y como se puede ver, ésta es la más radioresistente, y podría ser utilizada como indicador para la eliminación por irradiación de los otros microorganismos mencionados [8,14].

3.3. Efecto de la irradiación durante el almacenamiento

3.3.1 Efecto sobre *S. typhimurium* artificialmente inoculada

En la figura 3 se observa que existe una relación causa-efecto entre dosis de irradiación, tiempo de almacenamiento y supervivencia de *S. typhimurium*. Para los tratamientos de control y 2 kGy, a medida que se prolongó el tiempo se observó una significativa disminución del número de células viables siendo más severa cuando la dosis de irradiación fue mayor.

Tabla 2. Análisis de varianza de los efectos dosis de irradiación y tiempo de almacenamiento sobre el recuento de *S. typhimurium*² inoculada sobre hamburguesa de pollo.

Fuente de variabilidad	SC	GL	CM	FC	F_(0,05)	Significancia
Total	356,64	35				
Dosis ¹	325,28	1	325,28	35072,25	4,41	*
Tiempo	24,41	8	3,05	328,95	2,51	*
Dosis x Tiempo	6,68	8	0,83	89,98	2,51	*
Error	0,17	18	0,01			
Efectos simples						
Dosis x día 1	20,06	1	20,06	2162,72	4,41	*
Dosis x día 8	24,54	1	24,54	2646,15	4,41	*
Dosis x día 15	34,52	1	34,52	3721,95	4,41	*
Dosis x día 22	37,86	1	37,86	4082,07	4,41	*
Dosis x día 29	28,40	1	28,40	3062,09	4,41	*
Dosis x día 36	70,39	1	70,39	7589,45	4,41	*
Dosis x día 43	70,51	1	70,51	7602,39	4,41	*
Dosis x día 50	69,57	1	69,57	7501,04	4,41	*
Dosis x día 57	67,08	1	67,08	7232,57	4,41	*
Tiempo x Control	3,75	8	0,47	50,48	2,51	*
Tiempo x 2 kGy	27,34	8	3,42	368,45	2,51	*

¹ Solo Control y 2 kGy.

² Expresado como log ufc/g

* = Significativo

En la Tabla 2 podemos observar que existen diferencias significativas en la interacción dosis y tiempo de almacenamiento, lo que indica que existe un efecto sinérgico entre irradiación y el tiempo de almacenaje a la temperatura mencionada, en la inactivación de *S. typhimurium*. Del día 36 al 57, la velocidad de muerte, en el tratamiento control, se hace lenta (0,19 ciclos log), posiblemente debido a una adaptación del microorganismo a su medio ambiente. Con las muestras irradiadas a dosis de 4 y 6 kGy los efectos sobre *S. typhimurium* fueron más severos y no se observó crecimiento durante todo el periodo de evaluación.

3.3.2 Efecto sobre la población de coliformes

En la Figura 4 se puede observar que en el tratamiento control existe una población inicial de coliformes totales de 29 NMP/g y 4 NMP/g de coliformes fecales los cuales se incrementan hasta alcanzar un número de 4250 NMP/g y 240 NMP/g respectivamente a los 22 días, para luego volver a disminuir. El incremento hace suponer que la temperatura de 2±2 °C es apropiada para el desarrollo de algunas especies del grupo coliformes [15]. El

descenso posterior posiblemente se deba al cambio en la composición del medio que experimentó un pronunciado descenso de pH.

En la Tabla 3 se puede apreciar que a las dosis de 2, 4 y 6 kGy no hubo crecimiento, debido, posiblemente, al pequeño número de bacterias presentes y a que su radioresistencia es mucho menor a la de *S. typhimurium* [14].

3.3.3 Efecto sobre las bacterias mesófilas

En la Figura 5 se observa que la irradiación causó una disminución inicial del recuento bacteriano proporcional a las dosis aplicadas. Este fenómeno podría deberse a la presencia de diferentes microorganismos con diferente radioresistencia [2]. Conforme avanza el tiempo de almacenamiento, se produce un incremento en el recuento de las colonias de las muestras irradiadas siendo éste más pronunciado para el tratamiento de 6 kGy, seguido del de 4 kGy, 2 kGy y el tratamiento control. El color de las colonias fue rojo oscuro, al final del periodo de almacenamiento aparecieron colonias de color blanco lechoso.

Tabla 3. Número de coliformes en hamburguesa de pollo durante su vida en anaquel (NMP/ g).

Día	Control		2 kGy	4kGy	6 kGy
	coliformes totales	coliformes fecales	Coliformes totales	Coliformes totales	Coliformes totales
2	29	4	<3	<3	<3
15	150	4	<3	<3	<3
22	4250	240	<3	<3	<3
29	1100	215	<3	<3	<3

3.4 Efecto sobre las bacterias psicrótrofas

Según se observa en la Figura 6 la pendiente del incremento en la población microbiana, luego de haber sido irradiada, es más pronunciada para la dosis de 6 kGy, seguida de la de 4, 2 kGy y el tratamiento control. Se observó también que las colonias son, en general al inicio, de tamaño pequeño.

El color de las colonias, en general, fue al principio rojo oscuro, o rojo con halo transparente; sin embargo, conforme avanzó el tiempo de almacenamiento se apreciaron en todos los tratamientos, colonias con centro rojo y halo transparente mientras que al final de éste también se observaron colonias de color blanco lechoso que fueron más pequeñas.

Los recuentos más altos de las bacterias psicrótrofas respecto a las bacterias mesófilas indicarían que éstas tuvieron mayor poder de recuperación que las mesófilas, posiblemente debido a que la

temperatura de almacenamiento les fue más favorable.

Al igual que en las bacterias mesófilas, el color de las colonias fue rojo oscuro, al final del periodo de almacenamiento aparecieron colonias de color blanco lechoso.

4. CONCLUSIONES

En las hamburguesas de pollo, la dosis de 2 kGy permitió reducir una población de *S. typhimurium* de 8 log ufc/g a 3 log ufc/g, el cual fue reducido a 0 ufc en 25 g durante el almacenamiento a 2 ± 2 °C. Esta dosis también permitió reducir a <3 NMP/g la población nativa de enterobacterias. Las dosis de 4 y 6 kGy tuvieron efectos más severos sobre *S. typhimurium* y coliformes, que no formaron colonias visibles; sin embargo las bacterias mesófilas y psicrótrofas, que fueron también afectadas significativamente, volvieron a multiplicarse y causaron deterioro.

5. REFERENCIAS

- [1] WEBB, R., FERNANDEZ, G. Perú en números. Cuánto. Lima Perú. (1999) 1199 p.
- [2] ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). Ecología microbiana de los alimentos. Vol II. Ed. Acribia. Zaragoza España. (1980)
- [3] MINISTERIO DE AGRICULTURA.. Industria avícola y desafíos para el quinquenio 1996-2000 Lima. Perú. (1995) 15 p.
- [4] NOSKOWA, G.. Microbiología de las carnes conservadas por frío, Editorial Acribia, España. (1972) 111 p.
- [5] MULDER, R. Ionising energy treatment of poultry. National Symposium on Ionising Treatment of Foods. Sydney 5-6 october 1983. 4p.
- [6] PATTERSON, M.. Sensitivity of bacteria to irradiation on poultry meat under various atmospheres. Letters in Applied Microbiology (1988) 7, 55-58.
- [7] THAYER, D. y BOYD, G.. Effect of ionizing radiation dose, temperature, and atmosphere on the survival of *Salmonella typhimurium* in sterile,

mechanically deboned chicken meat. Poultry Science (1991) 70: 381 – 388

pollo, gallina y pato. Lima Perú. (1983) 8 p.

[8] GIDDINGS, G. y MARCOTTE, M.. Poultry irradiation: for hygiene and safety and market-life enhancement. Food reviews International (1991) 7(3), 259-282.

[13] DION, P. ; CHARBONNEAU, R.; Effect of ionizing dose rate on the radioresistance of some food pathogenic bacterias. Can. J. Microbiology 40 (1994) p. 369-374.

[9] USDA. Poultry Irradiation and preventing foodborne illness. FSIS backgrounder. Sep. 1992 p. 5.

[14] INGRAM, M.. Microbiology of foods pasteurized by ionizing radiation. International Project in the field of Food Irradiation, Karlsruhe, West Germany. (1975) 50 p.

[10] FAO. Análisis microbiológicos. Manuales para el control de calidad de los alimentos. N° 4 Italia. Roma. (1981) 231 p.

[11] USFDA. Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition. MD. USA. (1995) 618 p.

[15] ADAMS, M.; MOSS, M.; Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza España. (1995) 464 p.

[12] INDECOPI.. Norma Técnica Peruana 011.214. Aves para consumo. Definiciones y requisitos de carnes de

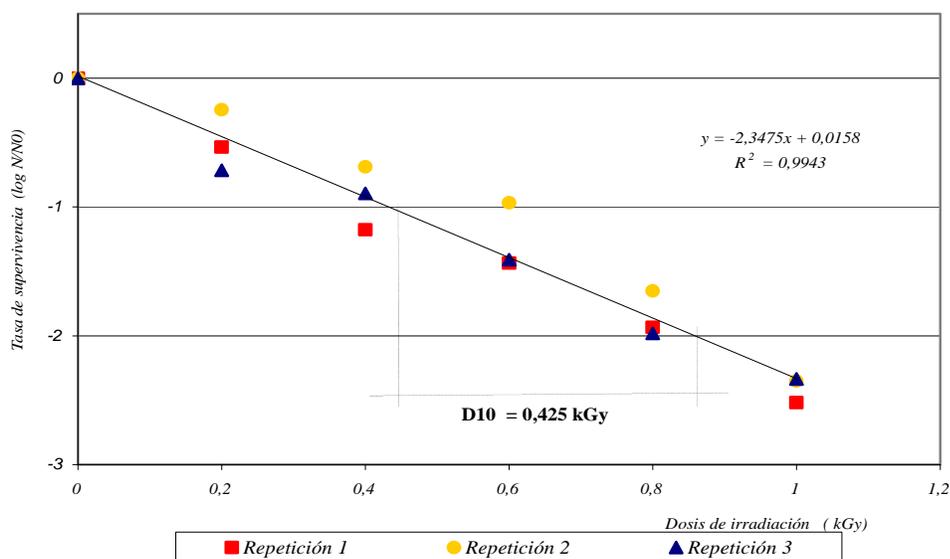


Figura 1. Tasa de supervivencia de salmonella typhimurium sometida a diferentes dosis de irradiación en caldo casoy (TSB).

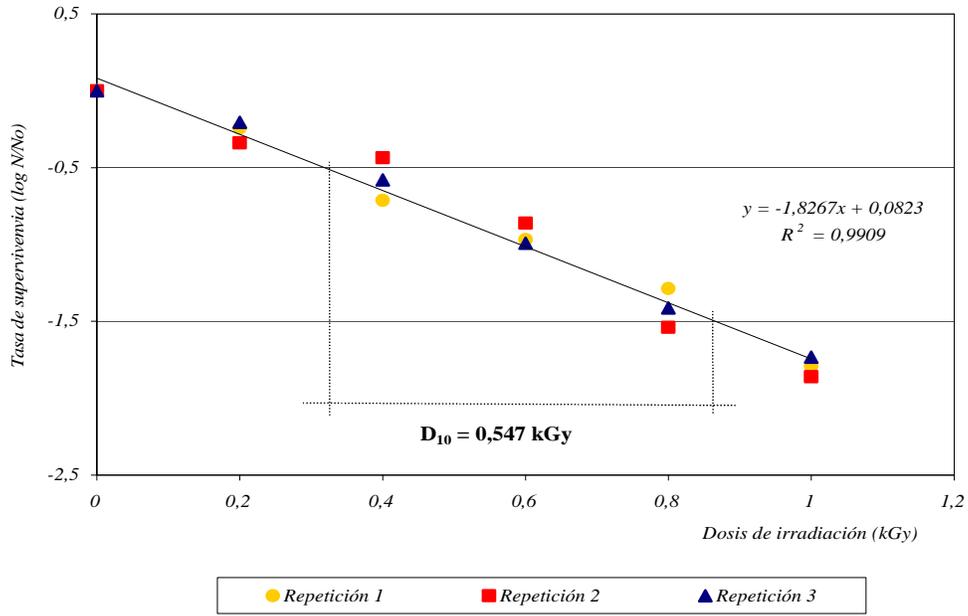


Figura 2. Tasa de supervivencia de salmonella typhimurium sometida a diferentes dosis de irradiación en hamburguesa de pollo.

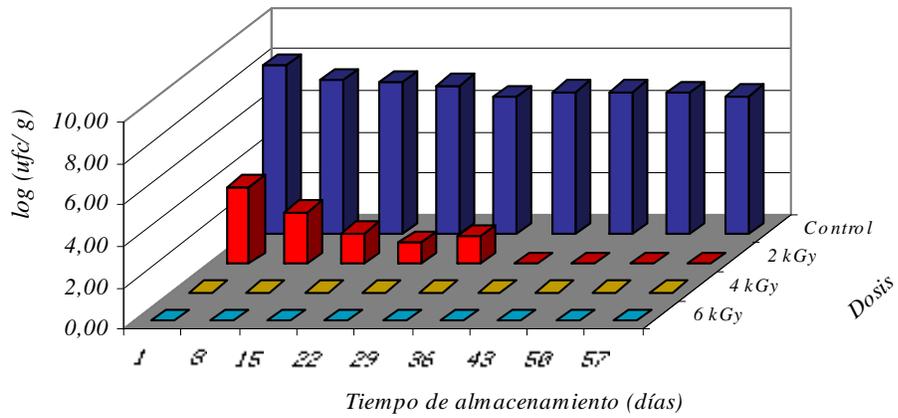


Figura 3. Efecto de la irradiación sobre la supervivencia de salmonella typhimurium inoculada en hamburguesa de pollo y almacenada a $2\pm 2^\circ\text{C}$.

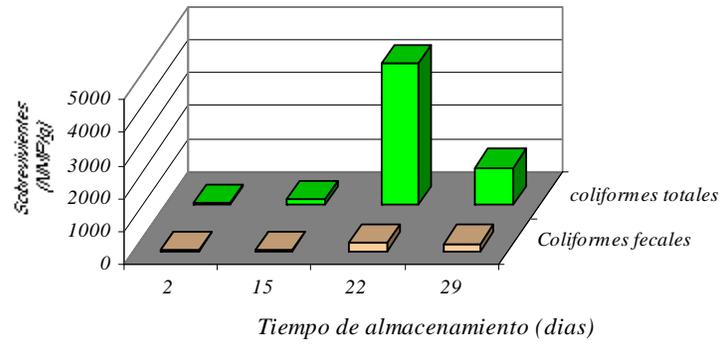


Figura 4. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la supervivencia de coliformes fecales y coliformes totales presentes en hamburguesa de pollo sin irradiar.

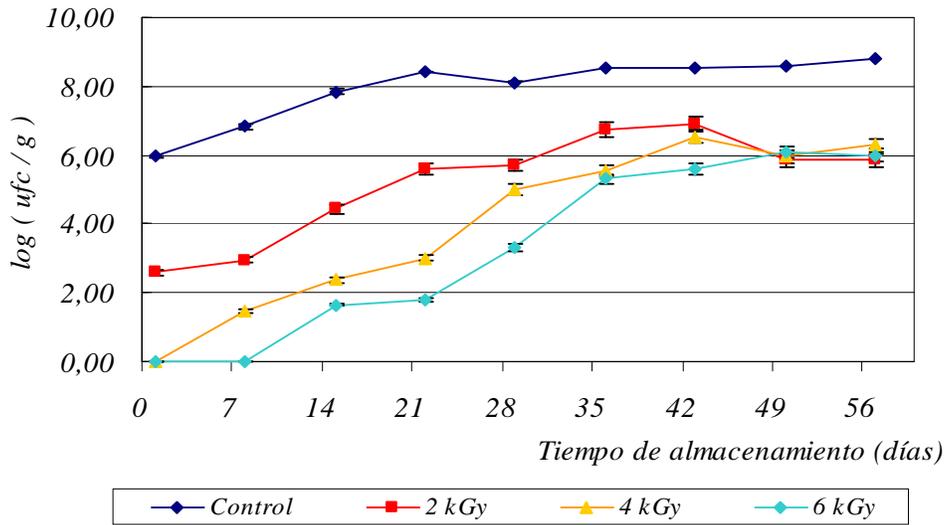


Figura 5. Efecto de la irradiación sobre el recuento de bacterias mesófilas en hamburguesas de pollo almacenadas a 2±2°C.

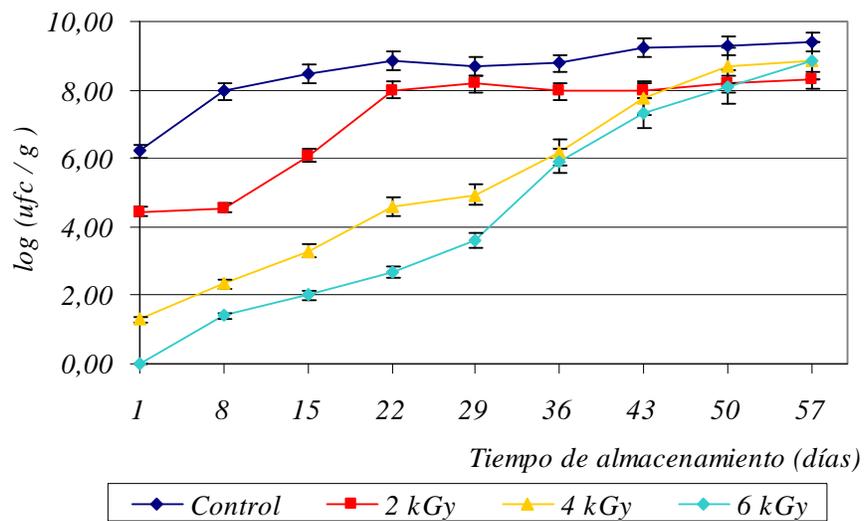


Figura 6. Efecto de la irradiación sobre el recuento de bacterias psicrótrofas en hamburguesa de pollo almacenadas a 2±2°C.