

Efecto de las microondas sobre la sobrevivencia de bacterias esporuladas inoculadas en carne molida

María Laura Arias, Manuel Jiménez, Florencia Antillón

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

RESUMEN. Debido a la creciente tendencia de cocinar y recalentar en horno de microondas platillos a base de carne y a la posibilidad de que estos transmitan enfermedades de origen bacteriano, se evaluó la capacidad de sobrevivencia de esporas de bacterias inoculadas en carne molida y tratadas en horno de microonda. Las tortas de carne fueron inoculadas con un número conocido de esporas de *Bacillus cereus* o *Clostridium perfringens* y posteriormente cocinadas en horno de microondas Amana de 2450 Hz. Se utilizó la técnica descrita por Vanderzant y Splittstoesser para determinar la tasa de sobrevivencia y la actividad de la enzima fosfatasa ácida como parámetro de conocimiento. Las esporas de *B. cereus* mostraron una tendencia a disminuir en número, conforme aumenta el tiempo de exposición a la radiación, pero sin llegar a desaparecer totalmente. Las esporas de *C. perfringens* disminuyen en número al aumentar el tiempo de exposición, pero presentan un segundo aumento asociado a la germinación de esporas sobrevivientes.

Palabras clave: Horno de microondas, carne molida, bacteria, esporas.

SUMMARY. Microwave effect on the survival of sporulated bacteria inoculated in minced meat. Due to the current tendency of cooking and heating meat prepared foods in microwave ovens and the possibility that they transmit bacterial diseases, the survival rate of spore-forming bacteria was evaluated in minced meat samples. Meat was inoculated with a known number of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* spores, and laterly thawed and cooked in an Amana microwave oven (2450 Hz). Survival rate was determined according to the methodology described by Vanderzant & Splittstoesser, and the activity of the enzyme acid phosphatase was determined as cooking parameter. *B. cereus* spore showed a decrease in its number as the time of exposition increased, but without fully disappearing. *C. perfringens* spores also decreased in number, but showed a later increase, associated with the germination of survival spores.

Key words: Microwave oven, minced meat, bacteria, spores.

INTRODUCCION

En la sociedad actual, tanto los consumidores como la industria alimenticia están muy interesados en aquellos métodos que permitan reducir el tiempo de cocción necesario para la preparación de alimentos (1).

El empleo de los hornos de microondas ofrece una alternativa para acelerar el proceso de cocción de alimentos. Es sabido que uno de los principales objetivos de los procesos de cocción es la destrucción térmica de los microorganismos. Debido a que el tiempo requerido para cocinar los alimentos mediante el empleo de microondas es inferior al requerido en un horno convencional, existen opiniones divergentes con respecto a la eficacia del horno de microondas en la destrucción de bacterias. Algunos autores citan que la cocción por microondas es más eficiente que los métodos convencionales en la destrucción de bacterias (2,3), otros señalan lo contrario e incluso indican que este tipo de tratamiento frecuentemente provoca la estimulación de las esporas bacterianas, favoreciendo su germinación, y consecuentemente aumentando el recuento final de microorganismos (4-6).

El *Bacillus cereus* y el *Clostridium perfringens* son dos bacilos Gram positivos, esporulados, asociados a

toxiinfecciones de origen alimentario. Existen diversos estudios que señalan que los alimentos a base de carne cocinada actúan frecuentemente como posibles vehículos de estas bacterias patógenas, ya que por sus condiciones de preparación y almacenamiento permiten la germinación de formas esporuladas y su multiplicación a números elevados, alcanzándose la dosis infectante (7-9).

En Costa Rica se carece de una estadística que revele el impacto de estas dos bacterias sobre la salud pública, pero los cuadros gastrointestinales que producen son numerosos y frecuentes, implicando una gran pérdida económica debido a incapacidad laborales.

Debido a la creciente tendencia de cocinar y recalentar en horno de microondas platillos a base de carne y a la posibilidad de que estos transmitan enfermedades de origen bacteriano, se justifica evaluar el efecto de las microondas sobre la sobrevivencia de una cantidad conocida de esporas de *B. cereus* y *C. perfringens* inoculadas en tortas de carne molida. El punto final adecuado de cocción se determinó con base a la inactivación de la enzima fosfatasa ácida, cuya actividad desaparece en el punto en que la carne se considera organolépticamente cocida, tal y como lo recomienda USDA-FIS 1986 (10).

MATERIAL Y METODOS

Ubicación

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Microbiología, entre enero y julio 1997.

Microorganismos evaluados

Las cepas de microorganismos empleadas fueron las siguientes: *Bacillus cereus* aislada a partir de una muestra de cereal infantil y *Clostridium perfringens* aislada a partir de carne de res.

Preparación de los inóculos de esporas

El *B. cereus* se puso a esporular en agar yema de huevo (FDA 1995) 24 h a 30°C y en aerobiosis, para posteriormente ser resuspendido en CTS. Se realizó una tinción de esporas con el fin de cuantificar la cantidad de esporas presentes por campo, según la técnica de Vanderzant y Splittstoesser, 1992 (11).

Las esporas de *C. perfringens* fueron preparadas mediante la transferencia de un cultivo de formas vegetativas de 24 h a un tubo con 110 ml de caldo tioglicolato dextrosa (TBD, Difco) que se calentó en baño maría a 75°C durante 10 min y se incubó a 35°C por 18 h. Luego se inoculó 0.75 mL del cultivo en 15 mL de caldo Duncan-Strong, medio ideal para esporular (12), y se incubó a 35°C en una atmósfera anaeróbica (Gas Pack) 24 h. El cultivo se lavó tres veces mediante centrifugación (15 min, 10000 x g), se suspendió en agua desionizada y sonico (50w) (Ultrasonic Homogenizer, Cole Parmer Inst) por 20 min con el fin de eliminar las células vegetativas. Se determinó el número de esporas mediante una tinción de esporas.

Preparación de las muestras

Se adquirió carne molida de res (1 kg) en diferentes supermercados del Area Metropolitana del país, la cual fue mezclada con 50 ml del cultivo de esporas, ya sea de *B. cereus* o *C. perfringens* de manera que la concentración final de esporas fuera aproximadamente de 1×10^6 UFC/g. La carne fue homogenizada usando un Stomacher (IUL Instruments) y luego preparada en tortas de 50 g cada una, todas con igual diámetro y espesor. Las tortas fueron congeladas por 2-3 días a -4°C y después fueron procesadas en horno de microondas.

Protocolo de cocimiento

Se utilizó un horno de microondas Amana Radavange de 2450 Hz para descongelar y cocinar las muestras. Se procedió a descongelarlas individualmente según su peso, después de lo cual fueron sometidas a 60%, 70%, 80% y 90% de poder durante 15, 45, 60, 90, 120, 150 y 180 segundos cada una. Se utilizó una muestra control sin inocular (blanco de carne) y otra inoculada pero no tratada con microondas, con el fin de obtener el 100% de actividad de fosfatasa ácida.

Luego del proceso de cocción, cada muestra fue resuspendida en 225 mL de agua peptonada estéril (APE) 0.1% y de nuevo homogenizada. A partir de esta suspensión, se hizo la determinación de la actividad de fosfatasa ácida y las diluciones necesarias para el recuento de microorganismos sobrevivientes.

Determinación de la actividad de fosfatasa ácida

Se determinó la actividad de fosfatasa ácida en cada una de las muestras de torta de carne, para lo cual se emplearon reactivos de la casa Wiener (Fosfatest 405), lote 407510 y un espectrofotómetro Shimadzu UV-160. Se calculó el porcentaje de actividad residual en cada muestra empleando como 100% la actividad enzimática presente en la muestra sin tratamiento térmico.

Análisis microbiológico

Cada muestra de 25 g fue suspendida en 225 mL de agua peptonada estéril (0.1%) y homogenizada en Stomacher. Se prepararon diluciones decimales hasta 10^7 , las cuales fueron tratadas siguiendo la técnica de Número de Más Probable descrita por Vanderzant y Splittstoesser para cuantificar cada microorganismo (11).

Para *B. cereus* se preenriqueció cada dilución, por triplicado, en caldo nutritivo incubado a 48 h a 37°C y se confirmó el crecimiento utilizando agar Manitol Yema de Huevo Polimixina (MYP) incubado 24 h a 30°C.

Para *C. perfringens* se preenriqueció cada dilución, por triplicado, en caldo carne picada incubado a 46°C por 4-6 horas, y se confirmó el crecimiento mediante el aislamiento de los tubos que presentaron turbidez en agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS), incubado a 35°C por 24 h en anaerobiosis.

Evaluación de la sobrevivencia de las bacterias

Se evaluó la sobrevivencia de las bacterias relacionándola con la temperatura y tiempo de cocción de cada muestra.

RESULTADOS

El análisis de los resultados de la actividad de la enzima fosfatasa ácida indica un comportamiento similar tanto en la evaluación de *B. cereus* como de *C. perfringens*. En ambos casos, se necesitó un mínimo de 60 s para su inactivación, tiempo en que la muestra de carne presenta un aspecto de cocinada. La Figura 1 presenta la variación en el comportamiento de la fosfatasa ácida según el tiempo y porcentaje de poder utilizarlo.

Los datos de sobrevivencia de *B. cereus* (Figura 2) demuestran una tendencia de las esporas a disminuir en número conforme aumenta el tiempo de exposición a la radiación, independientemente del porcentaje de poder utilizado. Las formas esporuladas llegan a los niveles más bajos (sin desaparecer completamente) después de más de 150 s de calentamiento, tiempo mayor a aquel en que la carne se

considera cocida, desde el punto de vista enzimático y organoléptico.

FIGURA 1
Porcentaje de actividad de fosfatasa ácida según temperatura y nivel de cocimiento

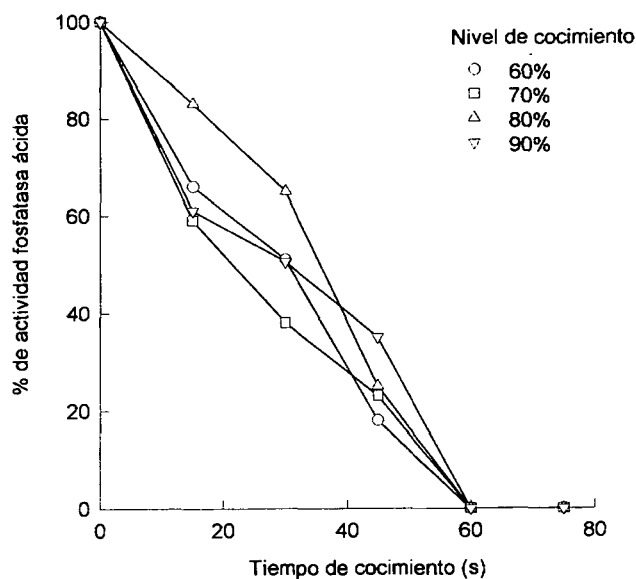
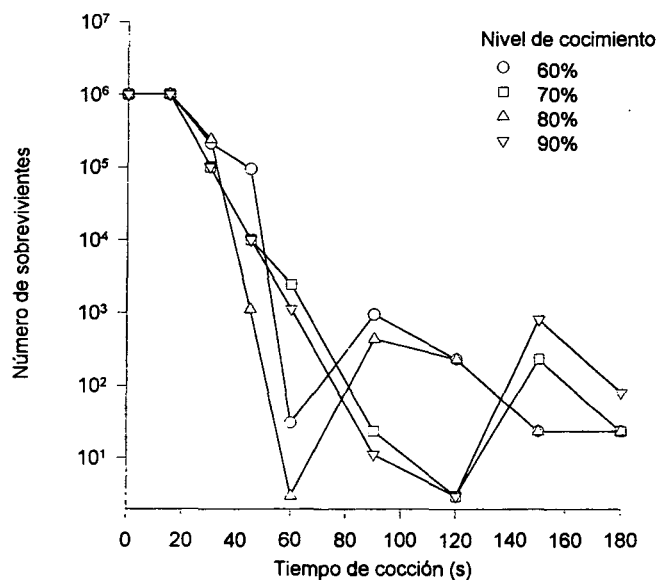


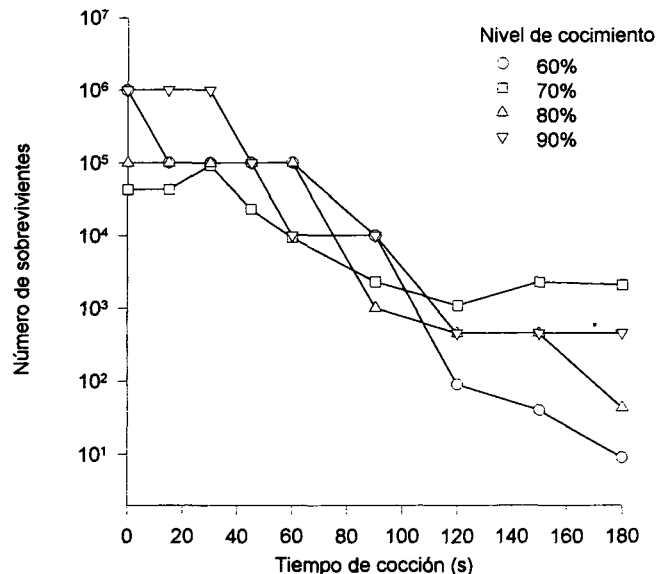
FIGURA 2
Sobrevivencia de esporas de *Bacillus cereus* a diferentes tiempos y niveles de cocimiento



El *C. perfringens* presentó un comportamiento diferente a *B. cereus*, ya que luego de sufrir una disminución en el número de sobrevivientes al aumentar el tiempo de exposición, se da un aumento, asociado a la germinación de esporas sobrevivientes y su recuperación en el medio de cultivo de

enriquecimiento (Figura 3). En los lotes de carne tratada a 60 y 80% de poder, hay un aumento en el recuento a los 90 s de tratamiento, en la carne tratada a 70 y 90% de poder, este repunte se da después de los 150 s de tratamiento. En ambos casos la elevación del recuento de bacterias se da luego de la inactivación de la fosfatasa ácida.

FIGURA 3
Sobrevivencia de esporas de *Clostridium perfringens* a diferentes tiempos y niveles de cocimiento



DISCUSION

En los últimos años se ha realizado una serie de investigaciones para determinar el efecto de las microondas en los microorganismos presentes en diferentes alimentos (13), incluyendo bacterias esporuladas, ya que se presentan variaciones importantes dependiendo de factores tales como composición de alimentos, presencia de puntos fríos en el horno, etc.

En el presente trabajo, el horno de microondas provocó una reducción importante en el número de esporas de *B. cereus* inoculadas (4 logaritmos), pero no se consiguió una destrucción total de éstas, ni en el tiempo de tratamiento donde se considera enzimática y organolépticamente cocinada, ni en tiempos mayores. Este comportamiento coincide con los resultados de Buono et al., quienes determinaron que las esporas de *B. cereus* no pueden ser destruidas en su totalidad mediante la cocción en horno de microondas (14).

Este comportamiento permite predecir que si las esporas sobrevivientes germinan y el alimento es almacenado a temperatura ambiente durante un tiempo prolongado, como sucede en establecimientos de comida rápida, instituciones públicas y hogares, se dará un aumento en el número de células vegetativas que podría llegar a producir toxiinfección.

El *C. perfringens* presentó un comportamiento diferente.

Primero, el número de esporas se reduce (4 logs) al aumentar el tiempo de exposición a la radiación, para luego presentar un incremento de al menos 1 log. El leve aumento en el número de microorganismos que se presenta puede deberse a que, al existir puntos fríos en el alimento, ocurre la germinación de esporas sobrevivientes. También es posible que por tratarse de un alimento de homogeneidad variable y con mucha grasa, exista gran cantidad de fluctuaciones en las temperaturas internas del alimento (15).

Este mismo efecto ha sido descrito por diferentes autores (5,16), quienes concluyen que el calentamiento con microondas estimula la germinación de esporas y debido al tiempo de generación tan corto que presenta esta bacteria, se puede llegar a alcanzar grandes números en un período de tiempo corto (17).

El hecho de que ambas bacterias sean recuperables en el momento en que la carne se considera cocinada es preocupante, principalmente si el producto se almacena por largo tiempo a una temperatura que permita la reproducción de éstas (40-60 °C) y se alcancen poblaciones altas. Por otro lado, la diferencia de comportamiento observada entre *B. cereus* y *C. perfringens* puede explicarse con base a la termorresistencia de las esporas bacterianas, donde las esporas de *B. cereus* se inactivan normalmente entre 1.7 y 20 min a 100 °C, mientras que las *C. perfringens* necesitan de 100-520 min en iguales condiciones (7).

Concluyendo, los resultados obtenidos permiten evidenciar que el efecto de las microondas sobre las bacterias depende en gran medida de la composición del alimento y del tipo de bacteria tratada. También confirma observaciones previas (1,3-5) que establecen que el cocimiento en horno de microondas es menos efectivo en la destrucción de microorganismos que el tratamiento en el horno convencional.

AGRADECIMIENTO

Se agradece el financiamiento otorgado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, proyecto 430-96-206, así como el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) y la cooperación de la Sra. Laura Villalobos.

REFERENCIAS

1. Ockerman HW, Cahill VR, Plimpton RF & Parret NA. Cooking inoculated pork in microwaves and conventional ovens. *J Milk Food Tech.* 1976; 39(11):771-773.
2. Dessel M, Bowersox EM & Jetter WS. Bacterial in electronically cooked foods. *J Am Diet Assn.* 1960; 37:230.
3. Mudgett R. Microwave properties and heating characteristics of food. *Food Tech.* 1986; 40(6):194-195.
4. Aleixo AG, Swaminathan B, Jameson KS & Pratt DE. Destruction of pathogenic bacteria in turkeys roasted in microwaves. *J Food Sci.* 1985; 50:873-875.
5. Blanco JF & Dawson LE. Survival of *Clostridium perfringens* on chicken cooked by microwave energy. *Poultry science.* 1974; 53:1823-1830.
6. Rosenberg U & Bögl W. Der Einfluss der Microwellenerhitzung auf den Keimgehalt von Lebensmitteln. *Fleischwirtschaft.* 1982; 69(9):1182-1187.
7. Frazier WC & Westhoff DC. *Microbiología de los alimentos.* Zaragoza: Acribia, 1993.
8. Montoya M. Estudio de la calidad microbiológica de la carne molida de res que se expende en el Distrito primero de la provincia de Alajuela. Tesis. San José Universidad de Costa Rica, 1995.
9. Montero R. Estudio microbiológico de la carne molida que se expende en el Area Metropolitana de San José. Tesis, San José, Universidad de Costa Rica, 1981.
10. USDA-FIS. Determination of internal cooking temperature (acid phosphatase activity). *Food Safety and Inspection Service, Chemistry Laboratory Guidebook N.* 1986; 3.018:3-49.
11. Vanderzant C & Splittstoesser D. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods.* Washington, APHA, 1992; 140-155.
12. Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual.* 8th edition, USA, 1995.
13. AMDEA (Association for the manufacture of domestic electrical appliances) Models of microwave ovens tested by the AFRC Institute of Food Research Study commissioned by MAFF. Press Release, 6 december, 1989.
14. Buono M, Niroomand F, Fung YC & Erickson L. Destruction of indigenous *Bacillus* spores in soymilk by heat. *J Food Prot.* 1989; 52(11):825-826.
15. Craven S & Lillard S. Effect of microwave heating on precooked chicken on *Clostridium perfringens*. *J Food Sci.* 1984; 39:211-212.
16. Wright-Rudolph L, Walker HW & Parish JR. Survival of *Clostridium perfringens* and aerobic bacteria found in ground beef patties during microwave and conventional cooking. *J Food Prot.* 1984; 49:203-206.

Recibido: 19-11-1997

Aceptado: 20-02-1998