

Caracterización microbiológica y de conservación de la carne de pollos de engorde asociada a miopatías

Silvana A. Correa; Mercedes C. Piaggio; Carlos D. Gornatti Churría; Francisco Procura; Natalia Sosa; Florencia Campostrini; Tamara A. López, Julieta M. Irigoytia

Autoras/es: Facultad de Bromatología, Universidad Nacional de Entre Ríos. Perón 1154, CP. 2820, Gualeguaychú, Argentina.

Contacto: silvana.correa@uner.edu.ar

ARK: <https://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/ymlca5txf>

Resumen

La carne de pollo es una de las más consumidas a nivel mundial, con un crecimiento sostenido en Argentina. Sin embargo, el rápido desarrollo genético y productivo ha generado el incremento de miopatías musculares, que afectan la calidad sensorial y la estabilidad de la carne. Estas alteraciones provocan cambios en el pH, color, textura y comportamiento frente a tratamientos térmicos y de conservación.

En otros países, estudios han demostrado que las miopatías severas modifican la microbiota de la carne, favoreciendo el crecimiento de microorganismos deteriorantes, especialmente Enterobacteriaceae. En Argentina, si bien se ha investigado la prevalencia y caracterización de las miopatías, no se ha profundizado en su impacto microbiológico.

Este proyecto aporta conocimientos sobre las características microbiológicas y la conservación de la carne de pollo afectada por miopatías, con el objetivo de diseñar estrategias de intervención. Se busca evaluar los parámetros de conservación que permitan una mejor comprensión del crecimiento microbiano durante la vida útil del producto para mejorar su calidad sensorial y funcional, contribuyendo así a la seguridad y sostenibilidad de la industria avícola.

Palabras clave: Miopatías aviares; Calidad microbiológica, Conservación de carne de pollo

Objetivos propuestos y cumplidos

Objetivo General

Generar conocimientos respecto de la caracterización microbiológica y de conservación de la carne de pollo asociada a miopatías.

Contribuir a esclarecer la etiología de las miopatías y poder implementar estrategias tecnológicas para mejorar la calidad y la conservabilidad del producto.

Objetivos específicos:

Aislar, identificar y caracterizar las bacterias causantes del deterioro de la carne de pollo asociada a miopatías.

Evaluar distintos medios de cultivo apropiados para identificar las bacterias deteriorantes de la carne de pollo.

Caracterizar fenotípicamente los aislamientos a través de ensayos de actividad proteolítica, lipolítica y biosurfactante.

Evaluar el periodo de conservación de la carne de pollo asociada a miopatías.

Caracterizar genéticamente las bacterias deteriorantes.

Marco teórico y metodológico (síntesis)

Desde hace algunas décadas, la carne de pollo es uno de los productos de mayor demanda en el mercado mundial de carnes. Según estimaciones representa el 45% de la carne comercializada mundialmente, con una producción estimada de 2.5 mil toneladas. La Argentina ocupa el lugar N° 10, con una participación del 2% de la producción mundial (Paolilli y col., 2021). El consumo interno también tiene perspectivas favorables, experimentado un crecimiento sostenido que puede visualizarse en los datos de consumo per cápita estimados desde el año 2003 (20 kg/persona/año) al año 2019 (43Kg/persona/año).

La creciente demanda de carne de pollo ha ido acompañada de un gran desarrollo en la selección genética de los animales y la optimización en los sistemas de producción de los pollos comerciales. Esto, a su vez, ha incrementado ampliamente la tasa de crecimiento de los animales y ha reducido significativamente los tiempos de producción, con lo cual se pueden obtener aves de aproximadamente 2kg en un período de 40 días (Petracci y col, 2017; Anton, 2017). Si bien estos aspectos resultan muy beneficiosos para la producción avícola, como consecuencia de la elevada tasa de crecimiento también se han generado algunos problemas que han afectado la calidad de la carne obtenida. Entre ellos se encuentra el desarrollo de miopatías.

Las miopatías pueden definirse como una enfermedad emergente en pollos de engorde asociada a las altas tasas de crecimiento, que producen lesiones agudas y crónicas en las fibras musculares, principalmente en el músculo de la pechuga, afectando la calidad de la carne destinada a consumo humano. Estas miopatías son producto de cambios histológicos y bioquímicos que modifican los tejidos de los músculos (Petracci y Cavani, 2012), por lo cual se presentan nuevos desafíos técnicos y económicos a la industria. La carne obtenida de estos animales presenta atributos sensoriales alterados, particularmente en los músculos que conforman la pechuga de pollo (m. pectoralis major y m. pectoralis minor), y, además, presentan cambios en el pH, color, dureza al corte, e incluso alteraciones en el comportamiento de la carne frente a las tecnologías de conservación o frente a los tratamientos térmicos (pérdidas por cocción, pérdidas por congelamiento, etc.). A su vez, estos atributos alterados repercuten en la conser-

vabilidad de la carne, principalmente debido a la proliferación de microorganismos deteriorantes (Tiemi Kanabata et al., 2021)

Los agentes biológicos causantes del deterioro de las carnes de pollo son principalmente de naturaleza bacteriana. En otros países del mundo se han efectuado investigaciones acerca de los microorganismos deteriorantes de la carne de pollo asociadas a miopatías y su período de conservación. Se obtuvieron resultados tales como que la presencia de miopatías severas aumentó la diversidad de la microflora endógena y promovió el crecimiento de Enterobacteriaceae (Young et al. 2018), Gratta et al. (2019) mencionan que son necesarios más estudios para dilucidar los factores y los mecanismos que pueden modular el crecimiento y la composición microbiana durante el almacenamiento. En Argentina se han estudiado en estos últimos años la prevalencia y caracterización de las diferentes miopatías por lo que sería relevante completar su estudio desde el punto de vista microbiológico.

Por tal motivo, desde el presente proyecto se pretende generar conocimiento respecto de las características microbiológicas y de conservación de la carne de pollo asociada a miopatías, con la finalidad de diseñar estrategias de intervención y métodos de conservación destinados a extender su vida útil y mejorar la calidad sensorial y funcional de la carne.

Metodología

Las muestras de carne de pollo para el presente estudio fueron suministradas por el Frigorífico Bonnin Hnos, el cual, desde el año 2018 firmó un convenio específico con la Facultad, y que se ha renovado oportunamente y sigue vigente durante el período de estudio. Las tomas de muestras fueron efectuadas por integrantes del proyecto, especialistas en el reconocimiento de las miopatías, siguiendo los criterios para los estudios microbiológicos.

Análisis microbiológico de la carne de pollo con y sin presencia de miopatías

1. Diseño experimental

1.1 Clasificación de muestras según miopatías

Se seleccionaron pechugas de pollo y se clasificaron en dos grupos:

Grupo A: Pechugas sin signos macroscópicos de miopatías (control).

Grupo B: Pechugas con miopatías, definidas a través de la inspección visual de lesiones típicas (“white striping”, “woody breast”).

1.2 Número de muestras y replicados

En cada uno de los estudios efectuados, para cada grupo se tomaron 6 muestras de pechugas por grupo, totalizando 24 unidades, con el fin de garantizar la representatividad estadística. Cada pechuga se sometió a un análisis en dos tiempos:

Tiempo 0: Análisis inmediato posterior a la recepción de la pechuga. El tiempo transcurrido desde la toma de muestra hasta el análisis fue fijado en 6 h como máximo, cumpliendo en todos los casos dicho requisito.

Tiempo 4° día: Análisis después de 4 días de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ en envases de polietileno sellado.

Si bien en los estudios iniciales se había planteado el diseño experimental en 3 puntos temporales: T0, T1 (4to día) y T2 (8vo día), debido a que las muestras presentaban

una alteración sustancial en el T2, es que se decidió no realizar el análisis microbiológico en el octavo día.

1.3 Hipótesis y comparación

La hipótesis principal plantea que las pechugas con miopatías presentarán una mayor carga microbiana (indicadores y/o patógenos) tras varios días de refrigeración, en comparación con aquellas exentas de miopatías. Se utilizaron análisis estadísticos (ANOVA de dos vías o prueba t de muestras independientes) para determinar si las diferencias son estadísticamente significativas.

1.4 Procedimiento de toma de muestras

Previo a la jornada de toma de muestra se preparó el equipamiento e insumos necesarios para llevar a cabo un retiro que garantice los resultados microbiológicos: se incluyeron guantes desechables, cuchillos esterilizados, bolsas de plástico estériles, alcohol para la desinfección de superficies y conservadora con hielo para transporte de las muestras. Las muestras fueron seleccionadas y tomadas en la línea de producción del frigorífico, y remitidas inmediatamente al laboratorio para su análisis microbiológico. Todas las muestras presentaron condiciones de manipulación similar: fueron extraídas asépticamente, colocadas en bolsas de plástico estériles individuales, etiquetadas incluyendo la miopatía observada, la fecha y la hora para su posterior identificación y análisis. Luego se colocaron en conservadoras con hielo, para su transporte refrigerado.

1.5 Análisis de muestras

Los estudios experimentales se realizaron en dos períodos: uno en 2023 y otro en 2024, en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Bromatología (UNER).

Paralelamente se realizaron pruebas fisicoquímicas e instrumentales dependientes del PID UNER-novel 9131.

Las pechugas controles y las afectadas por miopatías fueron pesadas en su envase estéril y se utilizó la técnica de enjuague para efectuar los estudios microbiológicos. En cada bolsa se agregaron 100 mL de agua peptonada (0,1%) y se procedió a un lavado manual energético de las muestras por 2 minutos. Asépticamente se tomaron 25 mL de agua de lavado y se depositaron en 225 mL del mismo diluyente anterior. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 y se inocularon por duplicado en la superficie de placas de agar selectivos para cada indicador, siguiendo las técnicas de recuento de microorganismos en placa. El análisis de patógenos se realizó por técnicas cualitativas (presencia/ ausencia). En la tabla N° 1 se resumen los análisis microbiológicos realizados en ambos grupos (con y sin miopatías) y en ambos tiempos (0 y 4 días).

Tabla N°1: Análisis microbiológico de la carne de pollo con y sin presencia de miopatías y su metodología de estudio.

Parámetro	Tiempo 0	Tiempo 4 día	Método
Recuento de bacterias aerobias mesófilas totales	Recuento	Recuento	ISO 4833-2:2013 Técnica de siembra en superficie (PCA)

Tabla 1, continuación

Recuento de mohos y levaduras	Recuento	Recuento	APHA 2001 , Cap. 20 Técnica de recuento en placa (DRBC + cloranfenicol)
Recuento de bacterias coliformes totales	Recuento	Recuento	BAM Online (2002), Cap. 4, pto. G Técnica de recuento en placa (VRB)
Cuantificación de <i>Escherichia coli</i>	Recuento	Recuento	Procedimiento de confirmación de <i>E. coli</i> tras la cuantificación de coliformes totales. Capítulo 4 del BAM Se confirmaron con pruebas bioquímicas (IMViC)
Recuento de <i>Staphylococcus coagulasa positiva</i>	Recuento	Recuento	ISO 6888-1/-2/-3 Técnica de recuento en placa (ej. Baird Parker + prueba de coagulasa)
Recuento de <i>Pseudomonas spp</i>	Recuento	Recuento	ICMSF Uso de agar selectivo para <i>Pseudomonas</i> (Agar cetrimida)
Detección de <i>Salmonella spp.</i>	Presencia/ Ausencia	Presencia/ Ausencia	ISO 6579-1:2017 Test rápido Reveal® 2.0 Enriquecimiento en BPW y RVS/MKTTn, aislamiento en XLD, SS, etc.
Detección de <i>Listeria spp</i>	Presencia/ Ausencia	Presencia/ Ausencia	ISO 11290-1 Test rápido Reveal® 2.0 Enriquecimiento en medios selectivos y verificación bioquímica
Detección de <i>Escherichia coli</i> O157	Presencia/ Ausencia	Presencia/ Ausencia	USDA/FSIS Test rápido Reveal® 2.0, inmunomagnética y agar selectivo (CT-SMAC, CHROMagar)

2. Procedimiento detallado

2.1 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales (ISO 4833-2:2013)

La preparación de la muestra y las diluciones seriadas se realizaron según la descripción anterior. Se transfirió 0.1 ml de la suspensión inicial y de las diluciones sucesivas al centro de dos placas de Petri conteniendo Agar para Recuento en Placa (PCA). El inóculo se extendió de manera uniforme con perlitas de vidrio estériles. Las placas se incubaron invertidas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $72 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$, observándose diariamente.

Al finalizar, se seleccionaron las placas con < 300 colonias (y al menos 10). Se realizó el cálculo según la fórmula establecida en la norma, teniendo en cuenta la suma de colonias (ΣC), el volumen de inóculo (V) y la dilución (d). Los resultados se expresaron como UFC/g de muestra.

El control de temperatura se realizó con un termómetro calibrado y, en cada lote de incubaciones, se realizaron los controles de esterilidad de los medios.

La figura N° 6. esquematiza el diagrama de flujo de los procedimientos realizados.

ISO 4833-2:2013. Diagrama de flujo del procedimiento para recuento de Microorganismos aerobios mesófilos

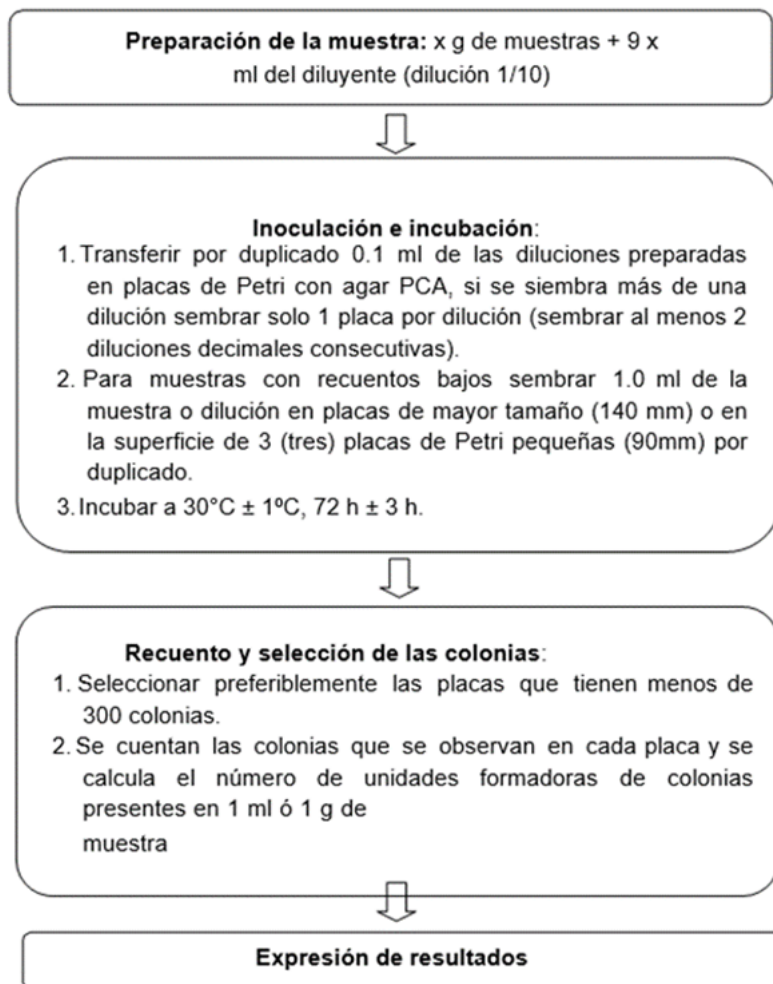


Figura N° 1: Diagrama de flujo del procedimiento de recuento de microorganismos aerobios mesófilos

2.2 Recuento de mohos y levaduras (APHA 2001, Cap. 20)

Se empleó DRBC con cloranfenicol (100 µg/ml). Tras sembrar 0.1 ml de la suspensión inicial y de sus diluciones, las placas se incubaron sin invertir por 5 días a 25°C. Se mantuvo un máximo de 3 placas apiladas para evitar diseminación de esporas.

Se contaron colonias de mohos (aspecto filamentoso, algodonoso o pulverulento) por separado de las levaduras (colonias cremosas). Para confirmar la morfología, se realizaron observaciones microscópicas con azul de algodón (mohos) y azul de metileno (levaduras). Los resultados se expresaron en UFC/g. La figura N°2 esquematiza el diagrama de flujo de los procedimientos realizados.

APHA 2001. Capítulo 20. procedimiento para recuento de mohos y levaduras

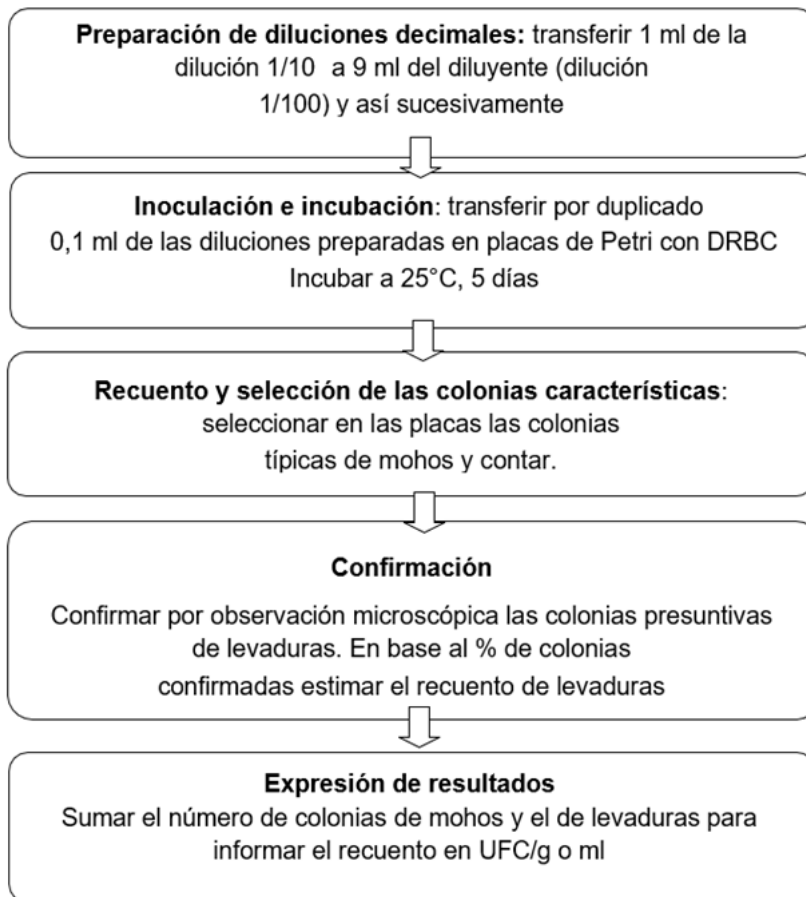


Figura 2. Diagrama de flujo para Mohos y Levaduras.

2.3 Recuento de coliformes totales en medio sólido (BAM Online, 2002)

Se transfirió 1 ml de la suspensión inicial y diluciones a placas de Petri, añadiendo Agar VRB (10 ml) temperado a 48°C. Una vez solidificado, se vertieron otros 5 ml de agar para formar la segunda capa.

La incubación fue invertida a 35°C ± 1°C durante 18-24 h. Se contaron colonias rojas o con zona de precipitación como sospechosas de coliformes. Para confirmarlas, se repicaron en Caldo Bilis Verde Brillante (BVB) e incubaron a 35°C, registrando la producción de gas a las 24 y 48 h.

Los resultados se expresaron como UFC/g. Para su control, se incluyeron cepas positivas y negativas (p. ej., *E. coli* ATCC 25922 como positivo y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como negativo).

La figura 8 esquematiza el diagrama de flujo de los procedimientos realizados.

Procedimiento para recuento de Coliformes totales por método de recuento en placa

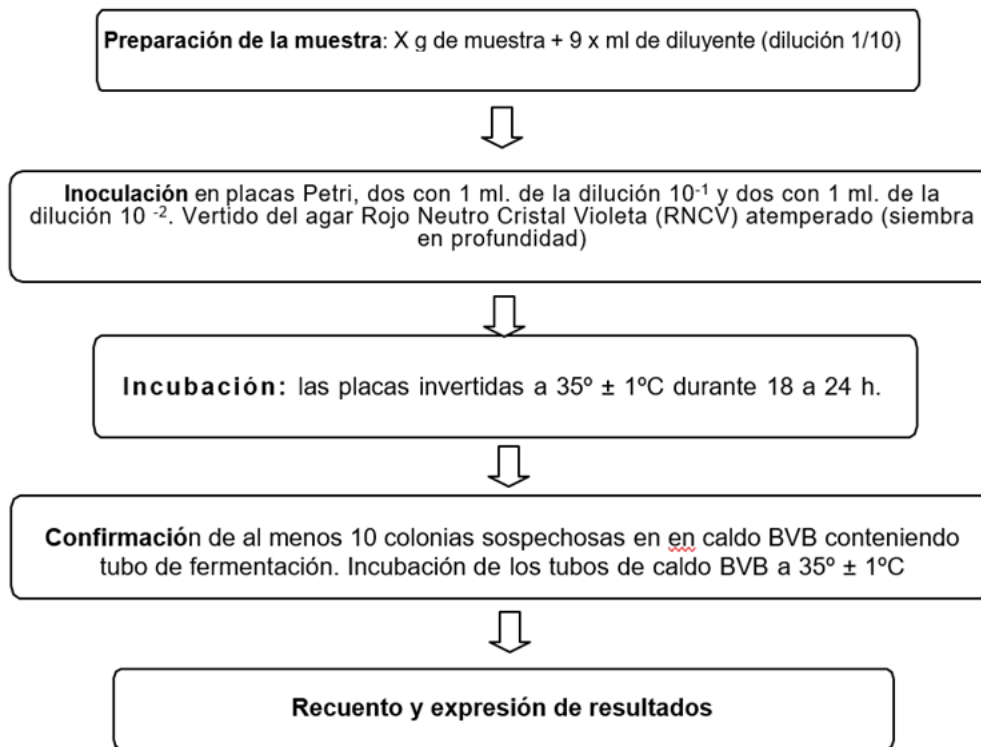


Figura 3. Diagrama de flujo para Coliformes totales.

2.4 Procedimiento de confirmación de *E. coli* tras la cuantificación de coliformes totales. Capítulo 4 del BAM

A partir del caldo BVB positivo, se sembraron bucles en caldo EC a 44.5 ± 0.1°C (24-48 h). Los tubos con gas se consideraron positivos para *E. coli*; luego, se aisló la bacteria en Agar EMB u otro medio diferencial (p. ej., TBX o MacConkey) y se confirmaron con pruebas IMViC (Indol, Rojo Metilo, Voges-Proskauer, Citrato) o métodos equivalentes.

Para recuento directo, se recomienda la ISO 16649-2 (o método BAM online) con siembra en agar selectivo y conteo de colonias típicas; posteriormente, se realizan pruebas bioquímicas.

2.5 Recuento de *Staphylococcus coagulasa positiva* (ISO 6888)

Para determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo, se sembró un volumen 1 mL de la dilución elegida sobre placas de agar Baird-Parker (BP), mediante siembra en superficie. A continuación, las placas se incubaron en posición invertida a 35 ± 1 °C durante 48 horas. Al finalizar el periodo de incubación, se observaron las colonias sospechosas, que se caracterizan por ser negras o grisáceas y presentar un halo claro debido a la acción de la yema de huevo incluida en el medio.

A fin de confirmar que se trataba de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo, se tomaron varias colonias sospechosas y se inocularon en caldo BHI, incubando a 35 ± 1 °C durante 24 horas. Posteriormente, se mezcló un volumen del cultivo con plasma de conejo, observándose la formación de un coágulo antes de las 24 horas como indicati-

vo de prueba de coagulasa positiva. Por último, se seleccionaron las placas contables y se calculó el recuento de *S. aureus* coagulasa positivo, expresándose en UFC/g de pechuga, según la dilución y el volumen de inóculo empleados.

2.6 Recuento de *Pseudomonas* spp

Para aislar *Pseudomonas*, se procedió según las directrices de ICMSF, usando agar selectivo cetrimida e incubación preferentemente a 36°C (24-48 h). Se caracterizaron colonias típicas (pigmento verde-azulado) y se realizaron pruebas bioquímicas simples (oxidasa positiva, etc.).

2.7. Detección de patógenos específicos

2.7.1 Detección, aislamiento e identificación de *Salmonella* spp.. En muestras de alimentos. Procedimiento según ISO 6579: 2002

El método utilizado consistió en cinco etapas. En el primer paso se agregaron 25 ml del diluyente de enjuague de las pechugas a 225 ml de agua peptona bufferada (BPW). A estas se las incubó a 37°C ± 1°C durante 18 h ± 2 h, lo cual consistió en un pre-enriquecimiento no selectivo. Sobre este cultivo, se realizó un tamizaje, utilizando el test rápido de Reveal® 2.0 para *Salmonella* (método inmunocromatográfico, límite de detección de 1 ufc/unidad analítica/ 106 ufc/mL después del enriquecimiento, Validación AOAC-RI 960801. Sobre los cultivos positivos al tamizaje se procedió a realizar la etapa de enriquecimiento en medio líquido selectivo, a través de la inoculación paralela en los Caldos Rappaport - Vassiliadis con Soja (RVS) y su incubación a 41.5°C ± 1°C y Caldo Muller - Kauffmann tetratoato/ novobiocina (MKTTn) y su incubación a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h. Partiendo de estos tubos, se realizó el aislamiento en medio selectivo y diferencial Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD); Agar *Salmonella*- *Shigella* (ASS) y Agar Bismuto Sulfito (ABS) y las colonias presuntivas aisladas fueron reaisladas para su confirmación por propiedades bioquímicas y por serología. Los resultados se expresaron como presencia/ausencia. La figura 9 esquematiza el diagrama de flujo de los procedimientos realizados

Diagrama de flujo del procedimiento para la detección de *Salmonella* spp.

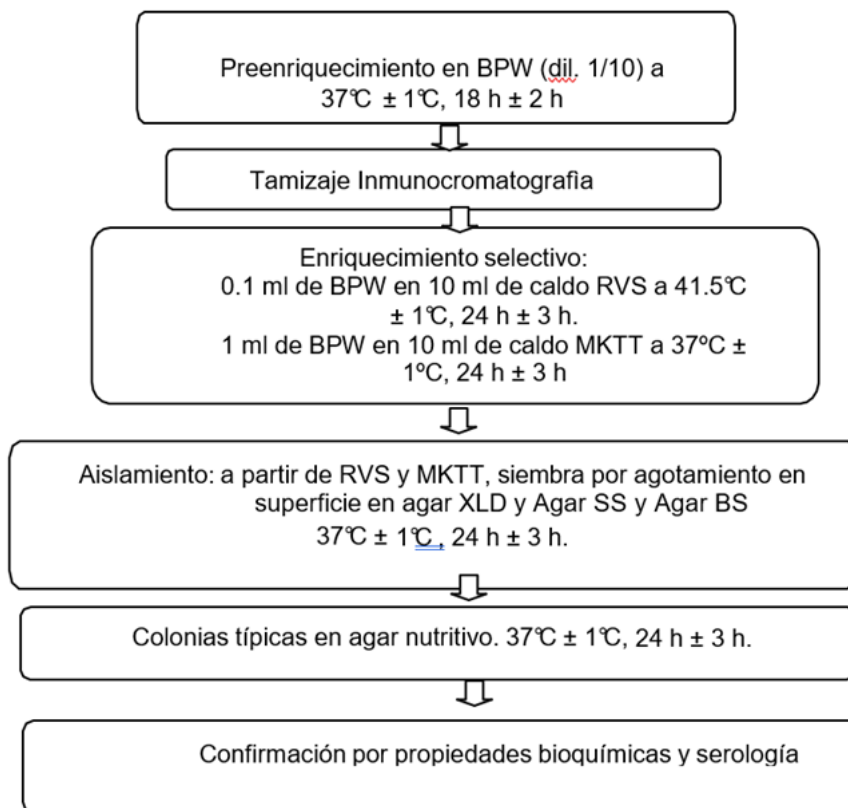


Figura 4. Diagrama de flujo para *Salmonella* spp.

2.7.2 Detección, aislamiento e identificación de *Escherichia coli* O157:H7/nm en productos cárnicos. Procedimiento según USDA/FSIS.

El método utilizado consistió en cinco etapas. En el primer paso se agregaron 25ml del diluyente de enjuague de las pechugas a 225ml de caldo tripticasa soja modificado y adicionado de novobiocina (TSBm+n) y se incubó a $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 h a 22 h (enriquecimiento selectivo). Sobre este cultivo se realizó un tamizaje, utilizando el test rápido de Reveal® 2.0 para *Escherichia coli* O157 (método inmunocromatográfico, límite de detección 1 ufc/25 gramos; 1 ufc/375 g, Validación AOAC Official Method No. 2000.13). Las muestras que dieron un resultado positivo en el test de screening se consideraron presuntivamente positivas para E.coli O157:H7/NM y se continuaron estudiando mediante el método de concentración inmunomagnética, utilizando el procedimiento para Kit Dynabeads anti-E.coli O157 y equipo Dynal MPC-S. El concentrado obtenido se dispensó en placas de Agar MacConkey sorbitol con cefixima-telurito (CT-SMAC) y en medio ChromAgarO157 (50 microlitros respectivamente) y luego de incubaron a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 h a 24 h. Las colonias presuntivas se sometieron a la prueba de aglutinación con el reactivo látex Anti O157 y luego se aislaron en agar tripticasa soja (TSA) para su confirmación bioquímica. Los resultados se expresaron como presencia/ausencia. La figura 10 esquematiza el diagrama de flujo de los procedimientos realizados.

Diagrama de Flujo del procedimiento para la detección, aislamiento e identificación de *E. coli* O157: H7/NM en productos cárnicos.

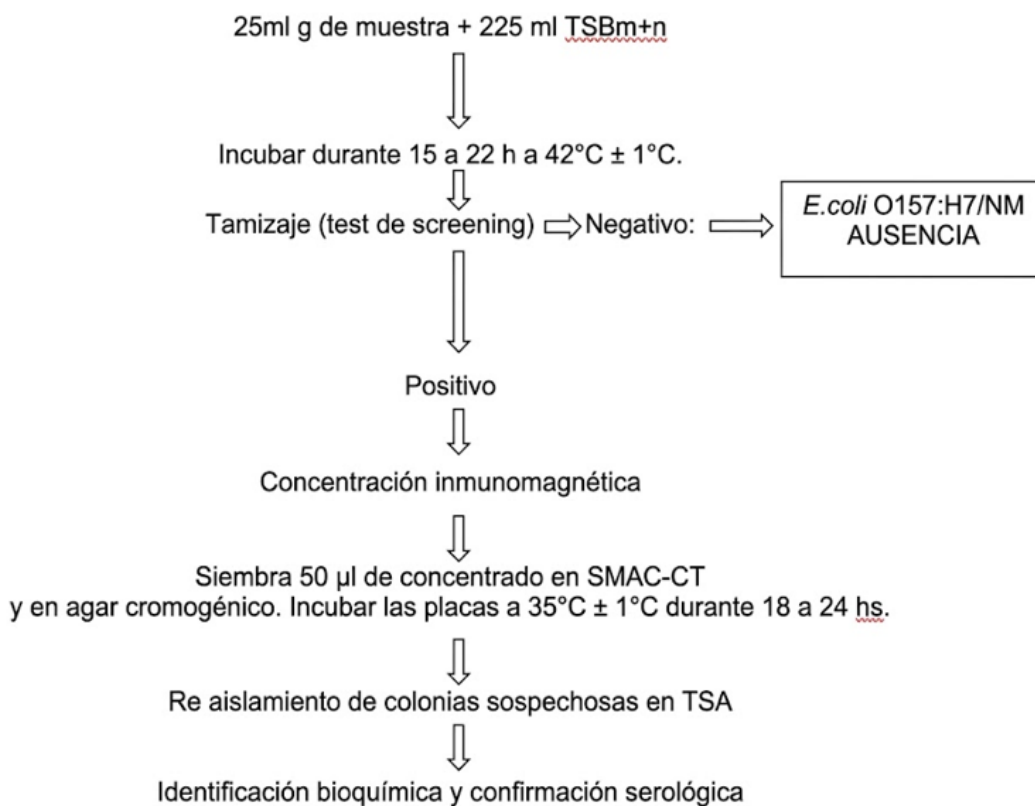


Figura 5. Diagrama de flujo para *E. coli* O157 H7

2.7.3 *Listeria spp* (ISO 11290-1)

Para la detección de *Listeria spp*, se realizó inicialmente un pre-enriquecimiento en caldo Half Fraser (al 50%), incubado a 30 °C durante 24 ± 2 horas. A partir de ese cultivo, se procedió a un enriquecimiento selectivo en caldo Fraser (al 100%), de modo que el caldo resultante sirvió para aplicar el test rápido Reveal® 2.0 que permite el cribado de *Listeria spp*. Los resultados positivos según las indicaciones del fabricante se consideraron presuntivos y se llevaron a siembra en agar PALCAM, donde las placas se incubaron a 37 °C por 24 a 48 horas. Las colonias presuntivas, típicamente de color gris verdoso con halo oscuro, se confirmaron mediante pruebas bioquímicas, entre ellas la hemólisis en agar sangre y la prueba de CAMP. Una vez confirmada la presencia de *Listeria spp*, los resultados se consignaron como presencia/ausencia en la cantidad de muestra analizada.

2.8. Control de calidad

En cada lote de medios y en cada corrida analítica se utilizaron cepas de control (positivas y negativas) para verificar la eficacia de los medios y la incubación.

El laboratorio cumple con procedimientos internos de calidad, para asegurar la fiabilidad de los resultados.

Se registraron la temperatura y el tiempo de incubación con dispositivos calibrados.

3. Caracterización fenotípica de las cepas

3.1 Actividad Biosurfactante

La detección de actividad biosurfactante se llevó a cabo siguiendo el método de colapso de gota descrito por Bodour & Miller-Maier (1998). En primer lugar, se prepararon cultivos puros en caldo soya tripticaseína (CST), los cuales se incubaron durante 48 horas a 22 ± 1 °C. Transcurrido este tiempo, se tomó 1 gota de aceite mineral y se depositó en una superficie inerte (por ejemplo, una placa de Petri estéril). Encima de la gota de aceite, se añadieron 5 μ L del caldo de cultivo y se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente por 2 minutos.

Se consideró que existía actividad biosurfactante positiva cuando la gota se aplanaba; en caso de permanecer inalterada, se clasificaba como negativa. Cada evaluación se repitió por triplicado y se recomendó incluir controles: uno negativo (caldo estéril) y, si resultaba viable, otro positivo (cepa conocida por su actividad biosurfactante).

3.2. Actividad Lipolítica

Para la actividad lipolítica, se adoptó un procedimiento en dos fases: primero, se buscó un indicio preliminar de lipólisis empleando agar Rodamina, y luego se llevó a cabo un ensayo en agar Tween 80, conforme a lo propuesto por Wang et al. (2017).

3.2.1. Siembra en agar Rodamina

En esta etapa, se preparó agar LB con la adición de rodamina (25 mL/L + 25 μ L/L, ajustando la concentración final según las necesidades del ensayo). Las colonias aisladas se observaron bajo luz ultravioleta para detectar la fluorescencia asociada a enzimas lipolíticas.

3.2.2. Ensayo en agar Tween 80

Las cepas que mostraron indicios de lipólisis (fluorescencia en agar Rodamina) se inocularon en caldo soya tripticasa (CST) y se incubaron durante 48 horas a 22 ± 1 °C. A continuación, se preparó un medio específico con peptona (10 g), NaCl (5 g), CaCl_2 (0,1 g), Tween 80 (10 mL) y agar bacteriológico (15 g) por litro. En la superficie de este agar, se colocaron discos de papel filtro estériles (de aproximadamente 3 mm de diámetro), sobre los cuales se depositaron 20 μ L del caldo de cultivo. Las placas se incubaron a 22 ± 1 °C durante 5 días y se examinó la formación de halos o zonas claras, indicativos de la degradación del sustrato lipídico. Todas las pruebas se efectuaron por triplicado, incluyendo controles positivos (cepa lipolítica conocida) y negativos (medio sin inóculo o cepa no productora).

3.3. Actividad Proteolítica

La evaluación de la actividad proteolítica se basó en el método descrito por Andreaeni et al. (2016). En primer lugar, se prepararon cultivos puros en caldo soya tripticaseína (CST), incubados durante 48 horas a 22 ± 1 °C. Posteriormente, se elaboraron placas de agar nutritivo suplementado con 2% de leche descremada en polvo. Siguiendo el mismo esquema de siembra que en el caso lipolítico, se colocaron discos de papel filtro estériles en la superficie del medio, y sobre cada uno se depositaron 20 μ L del caldo de cultivo. Las placas se mantuvieron en incubación a 22 ± 1 °C durante 5 días. Se consideró actividad proteolítica positiva cuando aparecían halos o zonas claras alrededor de

los discos, lo que indicaba la degradación de la caseína u otros componentes lácteos. Al igual que en los ensayos anteriores, se realizaron triplicados y se incluyeron controles: un control positivo (cepa proteolítica reconocida) y un control negativo (disco con medio estéril) para verificar que los halos se debieran efectivamente a la actividad enzimática.

4. Análisis molecular

Para la extracción de ADN, se partió de los aislamientos bacterianos cultivados en caldo TSB. A partir de estos cultivos, se obtuvieron los pellets de células que sirvieron de punto de partida para el aislamiento del material genético. Con el fin de asegurar la pureza y la calidad del ADN, se empleó el kit comercial NucliSens miniMAG (bioMérieux), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Una vez extraído, el ADN genómico fue sometido a un primer control de calidad mediante electroforesis en gel de agarosa (al 1%). El objetivo de este control consistía en verificar tanto la integridad como la presencia de ARN residual. En la mayoría de los casos, se apreció claramente una banda genómica robusta (indicada con una flecha roja en el apartado de resultados) y una banda característica correspondiente a ARN (ubicada por debajo de 1 kb), lo que evidenciaba una buena eficiencia en la extracción.

Como paso previo a la identificación por secuenciación, se corroboró la presencia y la integridad del gen del ARNr 16s (región ampliamente utilizada en taxonomía bacteriana). Para ello, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un par de cebadores de uso universal, los 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTGTTCAGACTT-3'). La polimerasa utilizada fue la enzima comercial T-Plus Free ADN Polimerasa (Inbio Highway), y las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador T100 (Bio-Rad), utilizando un programa que incluyó:

Una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °C.

35 ciclos compuestos por:

Desnaturalización corta (15 segundos a 95 °C).

Alineamiento (annealing) de 30 segundos a 45 °C.

Extensión de 1 minuto y 30 segundos a 72 °C.

Finalmente, se realizó una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Para confirmar el correcto desarrollo de la PCR, el producto amplificado (previsto en torno a 1500 pb) fue analizado en un gel de agarosa (1%). Tal como se esperaba para el gen ARNr 16s de bacterias, se detectó una banda de aproximadamente 1500 pb en todas las muestras, lo que aseguró la validez de la amplificación.

Con el propósito de identificar las cepas a nivel de especie, los ADN genómicos purificados se enviaron a la empresa Macrogen Inc. (República de Corea), especializada en secuenciación mediante el método de Sanger. Allí, se llevó a cabo una nueva amplificación de alta fidelidad (usando, por ejemplo, polimerasas tipo pfu) a partir de los extractos de ADN suministrados. Después, se realizaron dos reacciones de extensión independientes, usando cada uno de los cebadores universales 785F (5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3') y 907R (5'-CCGTC AATTCMTTTRAGTTT-3'). Dichos cebadores se localizan en regiones muy conservadas dentro del ARNr 16s, abarcando la región variable V5, lo que permite prácticamente reconstruir la secuencia casi completa del ARNr 16s.

Por último, el laboratorio de secuenciación proporcionó un informe bioinformático en el que, después de comparar las secuencias obtenidas con bases de datos de refe-

rencia, determinó las especies a las que pertenecían cada una de las cepas analizadas. Todas ellas resultaron estar clasificadas dentro del género *Pseudomonas*, con altos porcentajes de identidad (superiores o próximos al 99%) en relación con sus homólogos depositados en las bases de datos consultadas. De esta forma, se consolidó la identificación taxonómica de los aislamientos bacterianos investigados.

Síntesis de resultados y conclusiones

En la Tabla N° 2 se muestran los valores medios (\pm desviación estándar) de proteínas, humedad, y cenizas, junto con los valores de grasa (sin datos de variabilidad) en cuatro tipos de muestras:

- Control (sin miopatías)
- WB (woody breast)
- WS (white striping)
- SM (spaghetti muscle)

Tabla N° 2. Composición centesimal

	Muestras Control (sin presencia de miopatías)	WB	WS	SM
PROTEÍNAS (%)	22,6 \pm 0,35	18,5 \pm 1,52	21,2 \pm 1,02	22,4 \pm 0,80
HUMEDAD (%)	75,8 \pm 0,47	79,4 \pm 0,85	75,6 \pm 0,35	77,4 \pm 0,43
GRASAS (%)	1,14	1,48	2,90	1,52
CENIZAS (%)	1,14 \pm 0,03	1,06 \pm 0,02	1,11 \pm 0,05	1,2 \pm 0,09

Se llevó a cabo un ANOVA de una vía (one-way) para cada parámetro (proteínas, humedad y cenizas), considerando las 4 condiciones (Control, WB, WS, SM) como factor fijo. Para grasa no fue posible aplicar la comparación estadística al no disponer de desviaciones estándar o réplicas.

Proteínas

Muestra	Proteínas (%)
Control	22,6 \pm 0,35 (a)
WB	18,5 \pm 1,52 (b)
WS	21,2 \pm 1,02 (a)
SM	22,4 \pm 0,80 (a)

Letras diferentes (a, b) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

De la prueba post hoc (Tukey), se desprende que WB presenta un contenido proteico significativamente menor al de Control, WS y SM, mientras que estos tres últimos no difieren estadísticamente entre sí.

Muestra	Humedad (%)
Control	75,8 ± 0,47 (b)
WB	79,4 ± 0,85 (a)
WS	75,6 ± 0,35 (b)
SM	77,4 ± 0,43 (ab)

Letras distintas (a, b, ab) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

WB posee un porcentaje de humedad significativamente más alto que Control y WS. SM muestra un valor intermedio, que no difiere estadísticamente de WB ni de Control / WS (dando lugar a la notación “ab”).

Muestra	Cenizas (%)
Control	1,14 ± 0,03 (a)
WB	1,06 ± 0,02 (a)
WS	1,11 ± 0,05 (a)
SM	1,20 ± 0,09 (a)

Las medias, aun con pequeñas diferencias numéricas, no resultan estadísticamente significativas a $p < 0,05$.

Del análisis estadístico de la composición centesimal de las distintas muestras se desprende que la pechuga con WB exhibe un contenido proteico inferior frente a las demás, acompañándose de un porcentaje de humedad más elevado. En cambio, SM presenta valores intermedios de humedad, mientras que Control y WS no difieren entre sí, mostrando niveles de agua menores que WB. Además, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de cenizas entre los cuatro grupos, y no hay datos suficientes para analizar de forma concluyente la materia grasa, si bien preliminarmente WS es la que ofrece un contenido lipídico más alto.

Estas observaciones coinciden con lo reportado por diversos estudios que asocian la miopatía WB (woody breast) con una disminución en el contenido proteico y un aumento de la capacidad de retención de agua en el músculo, derivando en mayor humedad (Mudalal et al., 2015; Petracci et al., 2019). Dichos cambios podrían obedecer a procesos degenerativos y de fibrosis en el tejido pectoral (Sihvo et al., 2014), los cuales alteran la composición y la estructura histológica del músculo. Por su parte, WS (white striping) y SM (spaghetti meat) suelen relacionarse con leves variaciones en la humedad y la proteína, pero no con cambios tan marcados como en WB (Baldi et al., 2019; Kuttappan et al., 2017). De hecho, algunos autores señalan que WS puede presentar un incremento en la deposición lipídica, lo cual concordaría con el mayor contenido graso preliminarmente observado (Mudalal et al., 2015).

En concordancia con los resultados presentes, la proporción de cenizas parece no verse afectada de forma relevante por estas miopatías, lo que sugiere que la mineralización global del tejido no sufre alteraciones considerables (Sihvo et al., 2017). No obstante, los datos disponibles sobre la composición lipídica son insuficientes para una comparación estadística robusta, lo cual coincide con las dificultades metodológicas descritas en la literatura para cuantificar diferencias en el contenido graso cuando no se dispone de réplicas suficientes (Petracci et al., 2019). De esta forma, queda evi-

denciado que la miopatía WB se asocia a cambios más pronunciados en la fracción proteica e hídrica de la pechuga, mientras que WS y SM se vinculan con modificaciones menos intensas de estos parámetros, si bien podrían presentar leves diferencias en la composición lipídica.

RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

En la Tabla N° 3 y 4 se muestran los recuentos de distintos indicadores de calidad (bacterias aerobias mesófilas (BAM), mohos y levaduras (MyL), coliformes totales, *E. coli*, *Pseudomonas spp.* y *Staphylococcus coagulasa positivo*) en dos tiempos de análisis (tiempo cero y día 4) y dos fechas de muestreo respectivamente. Se incluyen cuatro condiciones:

- Control (sin miopatías)
- WB (pechuga de madera)
- WS (estrías blancas)
- SM (spaghetti muscle)

Cada celda presenta un recuento (expresado en UFC/g) o un valor de “<1” para recuentos por debajo del límite de detección. En las figuras N° 6, 7, 8 se observan placas con los medios de cultivo y los indicadores mencionados.

Tabla N° 3. Resultados de la evaluación microbiológica. Fecha muestreo: 28/08/2023

	TIEMPO CERO	4to día	TIEMPO CERO	4to día	TIEMPO CERO	4to día	TIEMPO CERO	4to día	TIEMPO CERO	4to día	TIEMPO CERO	4to día
Patología	BAM*	BAM*	MyL*	MyL*	Colif totales*	Colif totales*	E Coli*	E Coli*	Pseud*	Pseud*	Staph*	Staph*
Sin patología (NORMAL)	1,2x10 ⁶	1,5x10 ⁴	1,4x10 ³	5,2x10 ³	5	6	5	<1	<1	3,7x10 ³	<1	<1
Pechuga de madera (WB)	3,4x10 ⁴	1,9x10 ⁴	4,2x10 ³	2,6x10 ³	<1	11	<1	<1	80	3,2x10 ³	8	70
Estrías blancas (WS)	7,8x10 ⁵	4,8x10 ³	6,3x10 ³	6,5x10 ³	<1	12	<1	<1	2,4x10 ²	4,9x10 ³	56	5,6x10 ²
Spaghetti (SM)	3,4x10 ⁶	4,6x10 ⁴	8,4x10 ³	1,9x10	6	17	6	6	3,3x10 ²	3,6x10 ⁴	<1	<1

Tabla N° 4. Resultados de la evaluación microbiológica. Fecha muestreo: 19/04/2024

	TIEMPO CERO	4to día	TIEMPO CERO	4to día	TIEMPO CERO	4to día	TIEMPO CERO	4to día	TIEMPO CERO	4to día	TIEMPO CERO	4to día
Patología	BAM*	BAM*	MyL*	MyL*	Colif totales*	Colif totales*	E Coli*	E Coli*	Pseud*	Pseud*	Staph*	Staph*
Sin patología (NORMAL)	3400	280	220	2500	18	8	9	<1	44	580	290	200
Pechuga de madera (WB)	3000	5200	120	470	9	4	2	1	45	88	120	300
Estrias blancas (WS)	4200	4100	270	2200	9	<1	1	<1	50	320	48	1200
Spaghetti (SM)	14000	2300	190	53	15	1	4	<1	<1	73	340	230

* UFC/g

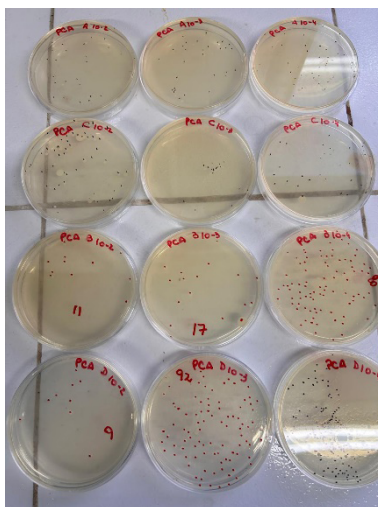


Figura 6. Medio sólido Plate Count Agar



Figura 7. Medio sólido Agar Bilis Rojo Violeta



Figura 8. Medio sólido Agar Baird Parker

Estadística descriptiva de cargas microbianas por tipo de pechuga y tiempo de refrigeración

Los resultados obtenidos se organizaron en tablas de estadística descriptiva (medias, desvíos, valores mínimos, máximos y número de observaciones), así como en tablas de comparaciones estadísticas (t-test y ANOVA). Para poder analizar los recuentos estimados de indicadores, en los cuales los resultados obtenidos fueron inferiores a los LD, se asignó un valor arbitrario (LD/2) (Grima Olmedo et al., 2019). Dada la baja cantidad de réplicas ($n=2$ por combinación), debe considerarse que los valores aportan tendencias más que conclusiones definitivas.

Tabla 5. Estadística descriptiva de cargas microbianas en pechugas de pollo (valores sin decimales).

Parámetro	Patología	Tiempo	Media	Desv	Min	Max	n
BAM	Estrías blancas (WS)	TIEMPO CERO	392100	548574	4200	780000	2
	Estrías blancas (WS)	4to día	22900	25597	4800	41000	2
	Pechuga de madera (WB)	TIEMPO CERO	18500	21920	3000	34000	2
	Pechuga de madera (WB)	4to día	12100	9758	5200	19000	2
	Sin patología (NORMAL)	TIEMPO CERO	601700	846124	3400	1200000	2
	Sin patología (NORMAL)	4to día	7640	10409	280	15000	2
	Spaghetti (SM)	TIEMPO CERO	1707000	2394264	14000	3400000	2
	Spaghetti (SM)	4to día	24150	30901	2300	46000	2
Coliformes totales	Estrías blancas (WS)	TIEMPO CERO	5	6	1	9	2
	Estrías blancas (WS)	4to día	6	8	1	12	2
	Pechuga de madera (WB)	TIEMPO CERO	5	6	1	9	2
	Pechuga de madera (WB)	4to día	8	5	4	11	2
	Sin patología (NORMAL)	TIEMPO CERO	12	9	5	18	2
	Sin patología (NORMAL)	4to día	7	1	6	8	2
	Spaghetti (SM)	TIEMPO CERO	11	6	6	15	2
	Spaghetti (SM)	4to día	9	11	1	17	2
<i>E. coli</i>	Estrías blancas (WS)	TIEMPO CERO	1	0	1	1	2
	Estrías blancas (WS)	4to día	1	0	1	1	2
	Pechuga de madera (WB)	TIEMPO CERO	1	1	1	2	2
	Pechuga de madera (WB)	4to día	1	0	1	1	2
	Sin patología (NORMAL)	TIEMPO CERO	7	3	5	9	2
	Sin patología (NORMAL)	4to día	1	0	1	1	2
	Spaghetti (SM)	TIEMPO CERO	5	1	4	6	2
	Spaghetti (SM)	4to día	3	4	1	6	2
MyL	Estrías blancas (WS)	TIEMPO CERO	3285	4264	270	6300	2
	Estrías blancas (WS)	4to día	4350	3041	2200	6500	2
	Pechuga de madera (WB)	TIEMPO CERO	2160	2885	120	4200	2
	Pechuga de madera (WB)	4to día	1535	1506	470	2600	2
	Sin patología (NORMAL)	TIEMPO CERO	810	834	220	1400	2

Tabla 5, continuación

	Sin patología (NORMAL)	4to día	3850	1909	2500	5200	2
	Spaghetti (SM)	TIEMPO CERO	4295	5805	190	8400	2
	Spaghetti (SM)	4to día	9527	13398	53	19000	2
Pseud	Estrías blancas (WS)	TIEMPO CERO	145	134	50	240	2
	Estrías blancas (WS)	4to día	4050	1202	3200	4900	2
	Pechuga de madera (WB)	TIEMPO CERO	63	25	45	80	2
	Pechuga de madera (WB)	4to día	1644	2201	88	3200	2
	Sin patología (NORMAL)	TIEMPO CERO	22	31	1	44	2
	Sin patología (NORMAL)	4to día	2140	2206	580	3700	2
	Spaghetti (SM)	TIEMPO CERO	165	233	1	330	2
	Spaghetti (SM)	4to día	18037	25404	73	36000	2
Staph	Estrías blancas (WS)	TIEMPO CERO	52	6	48	56	2
	Estrías blancas (WS)	4to día	880	453	560	1200	2
	Pechuga de madera (WB)	TIEMPO CERO	64	79	8	120	2
	Pechuga de madera (WB)	4to día	185	163	70	300	2
	Sin patología (NORMAL)	TIEMPO CERO	145	205	1	290	2
	Sin patología (NORMAL)	4to día	100	141	1	200	2
	Spaghetti (SM)	TIEMPO CERO	170	240	1	340	2
	Spaghetti (SM)	4to día	115	162	1	230	2

(Media = valor medio; Desv = desvío estándar; Min = valor mínimo; Max = valor máximo; n = número de observaciones.)

Tal como se podría apreciar en la tabla 5, algunos recuentos como BAM podrían sugerir valores elevados en pechugas con miopatías específicas (Spaghetti Meat, WS) respecto a las muestras normales; sin embargo, la variabilidad es muy alta y el número de réplicas reducido, por lo que no se observa un patrón concluyente.

Para el estudio de coliformes totales y *E. coli*, las medias también difieren entre pechugas normales y con miopatías, pero sin un comportamiento consistente en el paso de día 0 al día 4. Llama la atención que las muestras normales (día 0) muestran valores de *E. coli* algo más altos, aunque para el día 4 casi todas convergen en recuentos muy bajos (cerca de 1 UFC/g).

En el caso de *Pseudomonas* spp. estas bacterias parecen incrementarse notablemente para el día 4, sobre todo en Spaghetti (SM). Este hecho es coherente con la naturaleza psicrófila de *Pseudomonas* y su capacidad para multiplicarse durante la refrigeración, si bien no alcanzó relevancia estadística marcada ($p > 0.05$ en la mayoría de contrastes).

En cuanto a *Staphylococcus aureus*, el mismo no mostró diferencias claras entre patologías. Los valores en día 0 y día 4 se mantuvieron relativamente bajos en la mayoría de los casos.

Comparaciones estadísticas (t-test) entre pechugas con y sin miopatía

Para simplificar la comparación, se agruparon las miopatías WB, WS y SM como “Miopatía” y se contrastaron frente a “Sin patología (NORMAL)” (tabla N° 6). Se empleó un t-test (Welch) en cada parámetro (BAM, M y L, coliformes totales, *E. coli*, Pseud, Staph) y para cada tiempo (día 0 y día 4). El tamaño muestral de solo 2 réplicas por grupo limita la significancia estadística.

Tabla 6. Comparaciones mediante t-test (Welch) entre “Normal” y “Miopatía” (día 0 y día 4).

Parámetro	Tiempo	Grupo1	Grupo2	Media1	Media2	T-stat	p-value	n1	n2
BAM	TIEMPO CERO	Normal	Miopatía	601700	705867	-0.13	0.91	2	6
BAM	4to día	Normal	Miopatía	7640	19717	-1.12	0.33	2	6
M y L	TIEMPO CERO	Normal	Miopatía	810	3247	-1.54	0.18	2	6
M y L	4to día	Normal	Miopatía	3850	5137	-0.40	0.70	2	6
Colif totales	TIEMPO CERO	Normal	Miopatía	12	7	0.70	0.59	2	6
Colif totales	4to día	Normal	Miopatía	7	8	-0.20	0.85	2	6
<i>E. coli</i>	TIEMPO CERO	Normal	Miopatía	7	2	2.12	0.21	2	6
<i>E. coli</i>	4to día	Normal	Miopatía	1	1	-1.00	0.36	2	6
Pseud	TIEMPO CERO	Normal	Miopatía	22	124	-1.78	0.13	2	6
Pseud	4to día	Normal	Miopatía	2140	7910	-0.98	0.37	2	6
Staph	TIEMPO CERO	Normal	Miopatía	145	95	0.32	0.79	2	6
Staph	4to día	Normal	Miopatía	100	393	-1.42	0.21	2	6

Como se observa en la tabla 6, en la mayoría de los casos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$), lo cual concuerda con la gran variabilidad y el bajo número de réplicas. Ligeramente, en *E. coli* (Tiempo 0), el valor de $p = 0.21$ sugiere una posible tendencia de mayor recuento en pechugas normales respecto a la combinación de miopatías, pero no alcanza significancia estadística. El resto de parámetros y tiempos muestran valores de $p > 0.3$, refrendando la ausencia de diferencias consistentes entre pechugas normales y miopáticas, por lo menos hasta el día 4 de refrigeración.

Para investigar el efecto de cada tipo específico de patología (Normal, WB, WS y SM) y del tiempo de refrigeración (día 0 vs. día 4) sobre los recuentos de *E. coli*, se planteó un modelo: $\text{Recuento} \sim C(\text{Patología}) + C(\text{Tiempo}) + C(\text{Patología}):C(\text{Tiempo})$

Los resultados de la aplicación de ANOVA de dos vías (Patología y Tiempo) se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. ANOVA (dos vías) para recuento de *E. coli*.

Fuente	sum_sq	df	F	PR(>F)
C(Patología)	41.05	3	4.15	0.048
C(Tiempo)	21.39	1	6.49	0.034
C(Patología):C(Tiempo)	24.55	3	2.48	0.135
Residual	26.38	8	-	-

Se observa un $p < 0.05$ para los efectos principales de Patología y de Tiempo, lo que indicaría diferencias significativas en el recuento de *E. coli* según el tipo de pechuga y según el día (0 vs. 4).

A su vez, la interacción (Patología \times Tiempo) no resultó significativa ($p = 0.135$), lo cual sugiere que, si bien hay diferencias globales entre tipos de patología y entre días, el cambio entre día 0 y día 4 no depende sustancialmente del tipo de patología.

No obstante, estos resultados deben interpretarse considerando el bajo número de muestras estudiadas ($n = 2$ por combinación), lo cual implica que estudios adicionales, con mayor tamaño muestral, podrían consolidar o refutar esta tendencia.

Patógenos específicos

Se analizaron *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y Listeria en todas las muestras (Tabla 8). En todos los casos se descartó la presencia de *E. coli* O157:H7 y Listeria, así como la presencia de *Salmonella* tras someter los enriquecimientos positivos a la prueba de tamizaje, a aislamiento y confirmación según metodología de referencia.

Tabla N° 8. Resultados de microorganismos patógenos

Patología	EC O157 H7	<i>Salmonella</i> spp.	Listeria
Sin patología (NORMAL)	Ausencia	Presencia *	Ausencia
Pechuga de madera (WB)	Ausencia	Presencia *	Ausencia
Estrías blancas (WS)	Ausencia	Presencia *	Ausencia
Spaghetti (SM)	Ausencia	Ausencia	Ausencia

* Las muestras con resultados presuntos positivos por métodos inmunocromatográficos (Figura N° 13) para *Salmonella* spp., fueron sometidas a confirmación a través de la metodología de referencia descrita, no pudiendo aislar colonias positivas para *Salmonella* spp. según confirmación bioquímica y serológica (Figura N° 14).



Figura N° 9. Métodos inmunocromatográficos para *Salmonella* spp., *Listeria* y *Escherichia coli* O157 H7

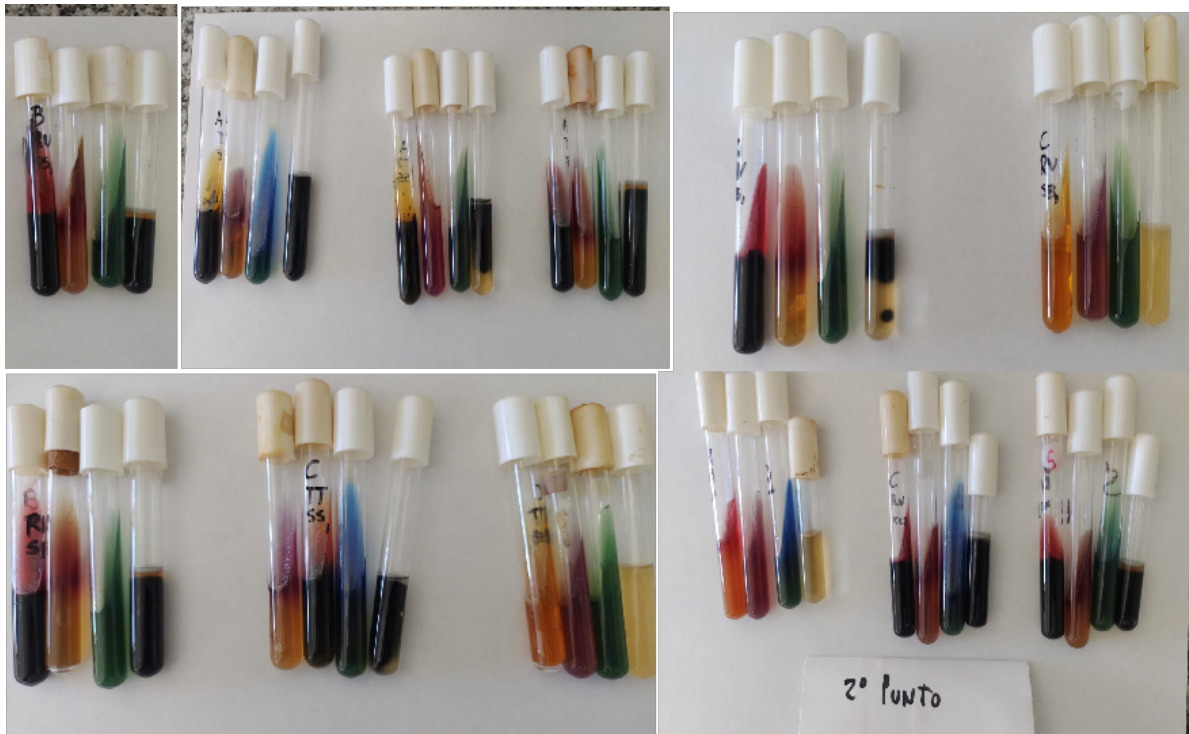


Figura 10. Pruebas bioquímicas realizadas para determinación de *Salmonella* spp.

Los resultados muestran que, bajo las condiciones y tiempos de almacenamiento evaluados, las diferentes miopatías (*woody breast*, *white striping* y *spaghetti meat*) no propiciaron diferencias notables en la proliferación de microorganismos indicadores (bacterias mesófilas totales, mohos, levaduras, coliformes, *E. coli*, *Pseudomonas* spp.) ni en la de patógenos (*Staphylococcus aureus* coagulasa positivo, *Salmonella*, *Listeria* y *Escherichia coli* O157:H7), comparadas con la pechuga normal. Estos hallazgos sugieren que, a nivel microbiológico, la carne con dichas miopatías mantiene características higiénico-sanitarias similares a las de las pechugas sin alteraciones musculares,

al menos en las condiciones de refrigeración y ensayos llevados a cabo (Mudalal et al., 2015; Baldi et al., 2019).

Por un lado, diversos autores señalan que, aunque las miopatías modifican la retención de agua y la textura, esto no siempre conlleva un aumento o descenso significativo de microorganismos (Mudalal et al., 2015; Zhuang, 2019). En efecto, la ausencia de diferencias marcadas en los recuentos de mesófilos, mohos, levaduras, coliformes y patógenos coincide con lo observado en carnes refrigeradas con *woody breast* o *white striping* cuando se mantienen buenas prácticas de manipulación y temperaturas adecuadas (Baldi et al., 2019).

Sin embargo, algunos estudios sí han planteado que las alteraciones estructurales de estas miopatías podrían llegar a influir en la dinámica de retención de fluidos, y con ello, ofrecer un hábitat ligeramente más favorable para microorganismos psicrotrofos (*Pseudomonas* spp.), principalmente en condiciones de almacenamiento prolongado o refrigeración menos estricta (Kuttappan et al., 2017; Bauermeister et al., 2020). En ciertos casos, se han reportado ligeros incrementos en los recuentos totales de mesófilos en pechugas con lesiones severas (WB + WS) tras periodos superiores a 7 días (Bauermeister et al., 2020). No obstante, estos autores también destacan que el efecto no resulta estadísticamente relevante bajo condiciones normales de producción y distribución (Mudalal et al., 2015).

En el presente trabajo, las muestras se evaluaron hasta el cuarto día de refrigeración y con protocolos de conservación adecuados, de modo que no se evidenció un impacto diferencial en la proliferación microbiana atribuible a *woody breast*, *white striping* o *spaghetti meat*. Estos resultados respaldan la teoría de que, en condiciones normales de almacenamiento y sin alargar excesivamente la vida en refrigeración, las miopatías no alteran de manera significativa la calidad microbiológica de la carne de pollo (Zhuang, 2019; Baldi et al., 2019).

En síntesis, los datos aquí presentados sostienen que las miopatías evaluadas no suponen un riesgo microbiológico adicional durante los días de refrigeración analizados, si bien otros trabajos han sugerido que podrían existir situaciones extremas (almacenamiento prolongado, temperatura poco controlada) en las que la retención de humedad propia de estos defectos musculares incrementa la susceptibilidad a la proliferación bacteriana (Kuttappan et al., 2017; Bauermeister et al., 2020). De cara a la industria avícola, estos hallazgos subrayan la importancia de mantener las buenas prácticas de refrigeración, envasado y manejo, a fin de garantizar la inocuidad y calidad higiénico-sanitaria de la carne, independientemente de la presencia de miopatías.

Aislamiento de *Pseudomonas*

A partir de cada muestra sembrada en medio Cetrimide (Figura N°15) se seleccionaron, al menos, 4 colonias presuntivas de *Pseudomonas*. Se realizaron pruebas de confirmación bioquímica, a saber, prueba de citocromo oxidasa, prueba de producción de pigmentos pirocianina y fluoresceína en los medios *Pseudomonas* agar P y *Pseudomonas* agar F, respectivamente y tinción de Gram. Las colonias aisladas fueron repicadas en Agar nutritivo (AN) (24-48 horas a 20 ± 2 °C) para su mantenimiento y luego se dispensaron en caldo glicerol al 10% para poder ser almacenadas congeladas, para sus estudios posteriores.

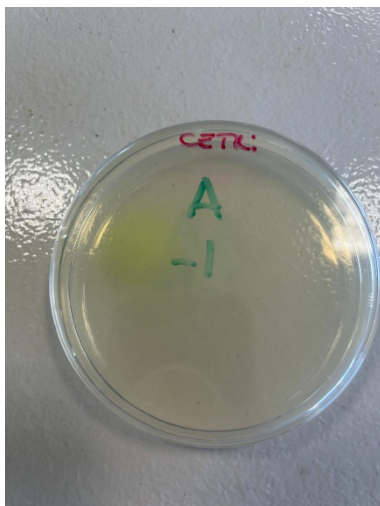


Figura N° 11. Medio sólido Agar Cetrimide.

Análisis molecular

El chequeo del ADN genómico puede apreciarse en la Figura N°16, donde se observa la electroforesis de los extractos en un gel de agarosa. Se aprecia claramente una banda genómica robusta (señalada con una flecha roja) que indica buena calidad del ADN, así como una banda adicional, por debajo de 1 kb, asociada a ARN residual. En conjunto, estas señales evidencian que el proceso de extracción fue satisfactorio, ya que se obtuvieron preparaciones con ADN íntegro y una cantidad mínima de contaminantes.

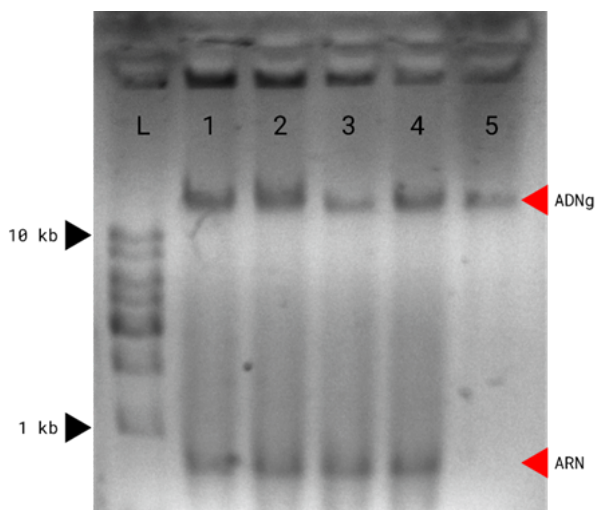


Figura N°12: Chequeo del material genómico (ADNg). L: marcador de peso molecular, 1: I4, 2: Ag2, 3: B1, 4: A13, 5: p53.

Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación del gen ARNr 16s. Tal como se muestra en la Figura 2, el producto de la PCR exhibe un amplicón de aproximadamente 1500 pares de bases, coincidente con el tamaño esperado para el ARNr 16s de origen microbiano. Esta banda confirma la correcta amplificación de la región genética de interés en las muestras analizadas.

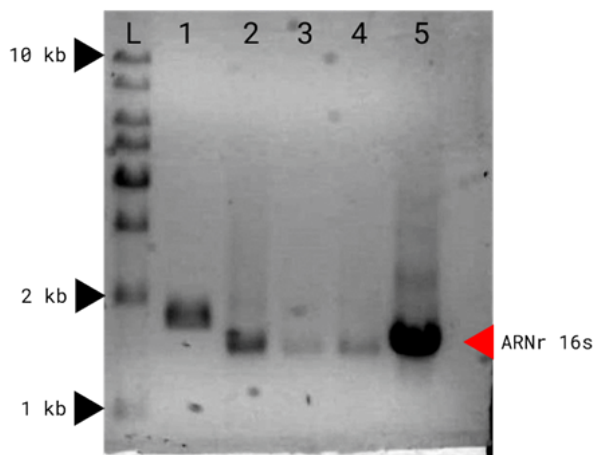


Figura N°13: Chequeo de la amplificación del ARNr 16s. L: marcador de peso molecular, 3: B1, 5: p53

Finalmente, los resultados de identificación proporcionados por la empresa Macrogen, a partir de la secuenciación Sanger de los amplicones, indicaron que todas las cepas pertenecen al género *Pseudomonas*, con porcentajes de identidad en torno o superiores al 99%. De manera específica, los análisis informáticos determinaron que las cepas son identificadas como:

- o A2: 99,93% de identidad con *P. putida*
- o B2: 99,04% de identidad con *P. granadensis*
- o A13: 99,79% de identidad con *P. koreensis*
- o B1: 99,52% de identidad con *P. entomophila*
- o D1: 100% de identidad con *P. japonica*

De este modo, luego de los pasos de extracción y verificación de ADN genómico, amplificación del ARNr 16s y secuenciación Sanger, todas las muestras analizadas correspondieron a diferentes especies de *Pseudomonas* con niveles de identidad variables, cercanos o superiores al 99% en comparación con las secuencias de referencia disponibles.

Actividad proteolítica, lipolítica, biosurfactante de *Pseudomonas*

En este estudio se evaluaron las actividades proteolítica, lipolítica y biosurfactante de cepas de *Pseudomonas* aisladas de carne de pollo, tanto con o sin miopatías. Estas bacterias, reconocidas como importantes microorganismos deteriorantes en productos cárnicos, pueden acelerar la degradación de proteínas y lípidos, afectando la calidad sensorial y la estabilidad del producto. Además, su capacidad biosurfactante favorece la adhesión a superficies, facilitando su persistencia en ambientes de procesamiento.

Para la cuantificación de estas actividades, se midió el tamaño de los halos de degradación en medios específicos. En el caso de la actividad proteolítica, los halos oscilaron entre 28 y 9 mm; para la actividad lipolítica se observaron halos entre 15 y 7 mm en agar con Tween 80 y entre 30 y 10 mm en agar LB suplementado con rodamina. La actividad biosurfactante se evaluó mediante el método de colapso de gota, obteniéndose resultados positivos en las cepas capaces de aplanar la gota de aceite.

Con la finalidad de facilitar la interpretación de estos datos semicuantitativos, se asignó un sistema de puntuación basado en signos:

- Para la actividad proteolítica, halos cercanos a 28 mm se tradujeron en una calificación de “++++”, mientras que halos de aproximadamente 9 mm se calificaron como “+”.
- De manera similar, en la actividad lipolítica en agar con Tween 80, halos de 15 mm correspondieron a “+++” y los de 7 mm a “+”, mientras que en agar LB con rodamina, halos de 30 mm se evaluaron como “++++” y los de 10 mm como “++”.

Según este sistema, las cepas evaluadas se comportaron de la siguiente manera: *Pseudomonas koreensis* y *Pseudomonas putida* mostraron actividad biosurfactante positiva, con actividades proteolíticas altas (++++) y lipolíticas elevadas (+++); en contraste, *Pseudomonas entomophila* resultó negativa para la producción de biosurfactantes y presentó actividades proteolíticas y lipolíticas bajas (+). Por su parte, *Pseudomonas japonica* exhibió actividad biosurfactante positiva, con niveles moderados de actividad proteolítica (+++) y lipolítica (++) y *Pseudomonas granadensis* mostró resultados negativos en biosurfactancia, con actividades proteolíticas y lipolíticas de niveles bajos (respectivamente, ++ y +).

En la tabla N°9 se muestran los resultados de la evaluación de las actividades proteolíticas, lipolíticas y biosurfactante de las cepas aisladas.

Tabla N° 9.

Identificación	Actividad biosurfactante	Actividad proteolítica	Actividad lipolítica
<i>Pseudomonas koreensis</i>	positivo	++++	+++
<i>Pseudomonas putida</i>	positivo	++++	+++
<i>Pseudomonas entomophila</i>	negativo	+	+
<i>Pseudomonas japonica</i>	positivo	+++	++
<i>Pseudomonas granadensis</i>	negativo	++	+

Estos resultados se enmarcan en el contexto del deterioro microbiológico, el cual se define como el conjunto de modificaciones complejas provocadas por bacterias, levaduras y mohos que afectan la calidad de los alimentos en términos de valor nutricional, textura y sabor (Gram et al., 2002; Gram & Huss, 1996). Este deterioro puede ser consecuencia de la descomposición de componentes alimentarios, la producción de moléculas extracelulares (por ejemplo, CO₂, pigmentos o polisacáridos) o el crecimiento directo de los microorganismos (Gram y Huss, 1996). En general, se hace evidente cuando las bacterias alcanzan concentraciones de 10⁷ a 10⁹ UFC/g de alimento, y suele ser el resultado de interacciones entre diversas especies que participan en este proceso (Gram et al., 2002). Factores como el pH, la composición de nutrientes, la actividad de agua (Aw), el potencial óxido-reducción y la presencia de moléculas inhibitoras, junto con la temperatura de almacenamiento, influyen decisivamente en la proliferación bacteriana y, por ende, en la velocidad de deterioro.

En relación a la degradación proteolítica, la misma conduce a la formación de péptidos y aminoácidos libres, que pueden favorecer la aparición de aminas biógenas y compuestos sulfurados, alterando negativamente las propiedades organolépticas del producto (Andreani et al., 2016). Por otro lado, la actividad lipolítica, al degradar los lípidos, produce compuestos volátiles responsables de olores rancios y sabores indeseables, fenómeno descrito por Wang et al. (2017). La producción de biosurfactantes, según lo planteado por Bodour y Miller-Maier (1998) y corroborado por Morales et al. (2016), facilita la emulsificación de grasas y la adhesión bacteriana, lo que puede potenciar la colonización de las superficies cárnicas y acelerar el proceso de deterioro.

Justificación del tamaño muestral

La determinación del tamaño muestral en este estudio estuvo condicionada por la disponibilidad presupuestaria del proyecto. Si bien un mayor número de muestras hubiera permitido alcanzar una mayor robustez estadística, los costos asociados al procesamiento y análisis de cada unidad limitaron la cantidad de muestras evaluadas.

Cada muestra requirió insumos específicos para los análisis microbiológicos y moleculares, incluyendo medios de cultivo, reactivos de PCR, kits de detección de patógenos y pruebas bioquímicas, los cuales representaron un costo elevado, y que, sobre todo, asociados a un contexto inflacionario en un presupuesto de por sí magro, limitaron la ejecución de mayor número de muestreos y análisis de las mismas.

Ante este contexto, se optimizó el diseño experimental priorizando la calidad de los datos sobre la cantidad de muestras. Se seleccionaron estratégicamente los puntos de muestreo y se implementaron técnicas de detección rápidas que permitieron obtener resultados representativos sin comprometer la viabilidad económica del proyecto. En futuras investigaciones, la ampliación del tamaño muestral podrá considerarse en función de la obtención de financiamiento adicional.

Indicadores de Producción

Actividades de extensión realizadas

Julieta Magali Irigoytia, DNI 43632703 participó como EXPOSITORA del trabajo titulado: "Caracterización microbiológica y de conservación de la carne de pollos de engorde asociada a miopatías", con los autores Julieta Irigoytia y Camila Carmona, en la "Jornada de Estudiantes en Acción", Res. CD N°305/23, organizado por las Secretarías de Investigación, Académica y Extensión Universitaria y Cultura de la Facultad de Bromatología de la Universidad Nacional de Entre Ríos; realizada el 19 de octubre de 2023 en Gualeguaychú, Entre Ríos.

PID 9132

Denominación del Proyecto

Caracterización microbiológica y de conservación de la carne de pollos de engorde asociada a miopatías

Unidad de ejecución

Universidad Nacional de Entre Ríos

Dependencia

Facultad de Bromatología

Cátedra, Área o disciplina científica

Microbiología de los alimentos

Instituciones intervinientes públicas o privadas

Frigorífico Bonin S.A. mediante convenio con la Facultad de Bromatología (UNER)

Contacto: silvana.correa@uner.edu.ar

Integrantes del proyecto

Director/a

Correa, Silvana Analía

Codirectora

Piaggio, Mercedes Carolina

Integrantes internos/docentes UNER

Gornatti Churría Carlos Daniel (FB-UNER); Procura Francisco (FB-UNER); Sosa Natalia (FB-UNER); Campostrini Florencia (FB-UNER); López Tamara Anahí (FB-UNER)

Becarias vinculadas al PID: Irigoytia Julieta Magalí

Fecha de iniciación y finalización efectivas

01/03/2023 y 28/02/2025

Aprobación del Informe Final mediante resolución C.S. N°369/25 (07-11-2023)