

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



“IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS QUE AFECTAN LA CALIDAD DE LAS FRUTAS ENLATADAS EN ALMÍBAR, DE MARCAS COMERCIALES, EN LOS SUPERMERCADOS MÁS CONOCIDOS DE LA CIUDAD DE SANTA ANA DURANTE EL AÑO 2013”.

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA.

PRESENTADO POR:

GUERRA DE MAJÍCO, GLENDA LIZETH.

DOCENTE DIRECTOR:

Lic. JUAN ARNOLDO AMAYA NOLASCO.

SEPTIEMBRE, DE 2014.

SANTA ANA

EL SALVADOR

CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



“IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS QUE AFECTAN LA CALIDAD DE LAS FRUTAS ENLATADAS EN ALMÍBAR, DE MARCAS COMERCIALES, EN LOS SUPERMERCADOS MÁS CONOCIDOS DE LA CIUDAD DE SANTA ANA DURANTE EL AÑO 2013”.

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA.

PRESENTADO POR:
GUERRA DE MAJÍCO, GLENDA LIZETH.

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADO:
Lic. OSCAR ARMANDO GUERRA.

SEPTIEMBRE, DE 2014

SANTA ANA

EL SALVADOR

CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



“IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS QUE AFECTAN LA CALIDAD DE LAS FRUTAS ENLATADAS EN ALMÍBAR, DE MARCAS COMERCIALES, EN LOS SUPERMERCADOS MÁS CONOCIDOS DE LA CIUDAD DE SANTA ANA DURANTE EL AÑO 2013”.

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA.

PRESENTADO POR:
GUERRA DE MAJÍCO, GLENDA LIZETH.

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADO DEL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA:

Lic. OSCAR ARMANDO GUERRA_____

DOCENTE DIRECTOR:

Lic. JUAN ARNOLDO AMAYA NOLASCO_____

SEPTIEMBRE, DE 2014

SANTA ANA

EL SALVADOR

CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

INGENIERO MARIO ROBERTO NIETO LOVO

VICE-RECTORA ACADÉMICA

MAESTRA ANA MARÍA GLOWER DE ALVARADO

SECRETARÍA GENERAL

DOCTORA ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FISCAL GENERAL

FRANCISCO CRUZ LETONA

SEPTIEMBRE, DE 2014

SANTA ANA

EL SALVADOR

CENTRO AMÉRICA

FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE

DECANO

LIC. RAUL ERNESTO AZCUNAGA LÓPEZ

VICE-DECANO

ING. WILLIAM VIRGILIO ZAMORA GIRÓN

SECRETARIO

LIC. VICTOR HUGO MERINO QUEZADA

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

LIC. OSCAR ARMANDO GUERRA

SEPTIEMBRE, DE 2014

SANTA ANA

EL SALVADOR

CENTRO AMÉRICA

AGRADECIMIENTOS:

A Dios por haberme guiado durante toda mi carrera, dándome fortaleza para seguir adelante; además, de la sabiduría para saber cómo actuar y responder. A él dedico este logro.

A mis padres: José David Guerra Tejada y Blanca Daysi Lima de Guerra, que me han dado su apoyo incondicional en cada momento de mi vida, estando siempre ahí para sacarme adelante, para cuidarme y fortalecerme; convirtiéndome en la persona que ahora soy; inmensamente gracias. Con mucho amor este logro es para ellos.

A mis hermanos: David Edgardo Guerra Lima y Evelin Patricia Guerra Lima, que me han ayudado en cada momento difícil, apoyándome y dándome ese consejo tan sencillo pero necesario. A ellos por ser los mejores hermanos que Dios me pudo haber regalado.

A mi esposo: Roberto Hugo Majíco Núñez, por ser siempre el mejor novio, esposo y amigo, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por dedicar todo su tiempo para apoyarme y ayudarme en todo lo que fuese posible; además sacarme adelante, aguantarme siempre y por supuesto por amarme tanto. Gracias mi amor, te amo.

A mis suegros y mis cuñadas: Teodolinda Núñez de Majíco, Transito Majíco Castro, Ana Guadalupe Majíco Núñez, Tania Yosabeth Majíco Núñez; por apoyarme en todo momento y estar ahí cuando era necesario, gracias por ese cariño tan grande que me dan y me demuestran día a día.

A mis amigas: Sonia María Rodríguez Martínez, Alba Jeamileth León Lima, Dilma Luz Polanco, Erika Jeamileth Manzanares, Jessica Jeamileth Reyes Artero, María del Carmen Escobar, Mayra Isela España y Luz de María García, con quienes siempre pude contar, brindándome esa amistad incondicional,

apoyándome en cada momento difícil con una simple palabra, la cual significaba mucho.

A mis amigos: Cristian Alexander Mónico Escobar, José Luis Sierra Ortez, Noé Raúl Martínez de Paz, José Elías Rumualdo Chinchilla, Antonio Carlos Vázquez, Rodrigo Alberto Juárez Méndez, Marvin Esteves, José Manuel Rosales Mancía, que siempre tuvieron un lindo gesto conmigo y me demostraron todo su apoyo, respeto y cariño.

A Lic. Juan Arnoldo Amaya Nolasco, por ser un gran asesor y maestro, de quien he aprendido mucho y quien me ha ayudado a salir adelante.

A Lic. Oscar Armando Guerra, quien me dio todo su apoyo como jefe del Departamento de Biología y como amigo, apoyándome en cada fase de mi trabajo, permitiendo que todo saliera adelante.

A Lic. Carlos Mauricio Linares, por tener tiempo para cada consulta que tuviera, por sacarme de cada duda y darme siempre una opinión positiva que fortaleciera mi trabajo.

A Licda. Edith Nohemí Cortez de Zamora, quien siempre me ofreció su apoyo técnico en el laboratorio, ayudándome en todo lo que fuera posible, no solo como profesional sino también como amiga; dando siempre un buen consejo y esforzándose de más para ayudar a que mi trabajo fuera el mejor. Por todo esto y mucho más, le agradezco especialmente.

A Lic. David Rosales, por su paciencia para revisar cada parte de mi trabajo y hacerme observaciones y críticas positivas que me ayudan a mejorar en gran manera.

A mis sobrinas: Tatiana Mercedes Cortez Majíco, Sofía Daniela Cortez Majíco y Helen Estefani Terán Majíco, a quienes quiero mucho por ser tan dulces y regalarme tantos momentos de alegría.

ÍNDICE

Listado de tabla.....	xi
Listado de figura.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	2
2.1 Objetivo general:.....	2
2.2 Objetivos específicos:.....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	3
3.1 antecedentes.....	3
3.1.1 Historia de la microbiología de los alimentos.....	3
3.1.2 Historia de la microbiología del enlatado.....	4
3.2 Descomposición microbiana de alimentos.....	5
3.3 Crecimiento microbiano.....	6
3.3.1 Muerte de un microorganismo.....	7
3.4 Efectos del medio en las bacterias.....	8
3.4.1 Temperatura.....	8
3.4.2 Humedad.....	9
3.4.3 pH.....	9
3.5 Presencia de microorganismos en alimentos.....	10
3.5.1 Bacterias más comunes en alimentos.....	10
3.5.1.1 Bacterias patógenas.....	13
3.6 Características generales de las bacterias patógenas que con mayor frecuencia se aíslan de los alimentos.....	14
3.6.1 Alteración de alimentos enlatados.....	19
3.7 Conservación de alimentos.....	20
3.7.1 Método de conservación de alimentos a bajas temperaturas.....	20
3.7.2 Método de conservación por desecación.....	20
3.7.3 Método de conservación por fermentación.....	21
3.7.4 Método de conservación por curado-salación-ahumado.....	22

3.7.5 Método de conservación por calor.....	23
3.8 Enfermedades de origen alimentario.....	24
3.8.1 Infecciones de origen alimentario.....	25
3.8.2 Intoxicación por alimentos.....	26
3.9 Métodos de detección de contaminación microbiana.....	30
3.9.1 Diluciones de la muestra de alimento para detección de contaminación...30	
3.9.2 Aislamiento de microorganismos.....	30
3.9.3 Recuento en placa.....	31
3.9.4 Método del número más probable (NMP).....	31
3.9.5 Método de detección de mesófilos aerobios.....	32
3.9.6 Método de detección de coliformes fecales.....	33
3.9.7 Método de detección de <i>Escherichia coli</i>	33
3.9.8 Pruebas para investigar la presencia de <i>Clostridium botulinum</i> en los alimentos.....	34
4. DISEÑO METODOLÓGICO.....	35
4.1 Tipo y diseño de la investigación.....	35
4.2 Descripción del área de estudio.....	35
4.3 Universo, población y muestra.....	36
4.4 Instrumentos y técnicas de la investigación.....	36
5. RESULTADOS.....	38
5.1 Determinación de bacterias en frutas enlatadas.....	38
5.2 Recuento de colonias en placa (Dilución de 10^{-6}).....	39
5.3 Pruebas presuntivas.....	41
5.3.1 prueba para coliformes fecales en Agar EMB.....	41
5.3.2 prueba para coliformes fecales en Agar MacCONKEY.....	43
5.3.3 Prueba para <i>Clostridium botulinum</i>	44
5.4 Pruebas confirmatorias.....	47
5.4.1 Método del Número más Probable (MNP).....	47
5.4.2 Prueba con tinción de Gram.....	49
5.4.2.1 colonias cultivadas en Agar EMB.....	49

5.4.2.2 colonias cultivadas en Agar MacCONKEY.	51
5.4.3 Prueba para Clostridium botulinum.....	54
6. DISCUSIÓN.....	56
6.1 Determinación de bacterias.	56
6.2 Recuento de colonias en placa.....	57
6.3 Pruebas presuntivas.	58
6.4 Pruebas confirmatorias.....	62
7. CONCLUSIONES	65
8. RECOMENDACIONES.....	66
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS.....	69

LISTADO DE TABLAS

1. muestra el crecimiento de organismos bacterianos en el medio, de cada una de las diferentes muestras.....38
2. muestra los diferentes crecimientos de colonias bacterianas, en las distintas muestras, luego haber sido diluidas hasta 10^{-6}39
3. muestra el crecimiento positivo de colonias bacterianas en Agar EMB, lo cual demuestra la presencia de coliformes, pero no confirma la presencia de coliformes fecales ni de *Escherichia coli*.....41
4. muestra el crecimiento de colonias bacterianas positivo en algunas de las muestras, lo cual indica la presencia de coliformes en estas, pero no confirma que estas sean coliformes fecales ni presuntos *E. coli*.....43
5. muestra el crecimiento de colonias bacterianas en este medio selectivo, tanto para bacterias anaeróbicas como aeróbicas, lo cual presume la presencia de organismos de este tipo de vida, pero no confirma que las colonias bacterianas presentes sean de *C. botulinum*, ya que podría ser cualquier otra especie anaeróbica.....44
6. muestra el crecimiento negativo de bacterias en caldo BRILA, es decir confirma que las colonias que crecieron en medios presuntivos eran coliformes, pero no coliformes fecales ni *Escherichia coli*, lo cual demuestra que no hay indicios de contaminación fecal en ninguna de las muestras analizadas.....47
7. muestra la presencia de bacilos gram positivos en la mayoría de las muestras, algunos con endosporas y otros sin esta, lo cual confirma la presencia de *Bacillus subtilis* y además *Bacillus megaterium*.....49
8. Muestra la presencia de bacilos gram negativos, en las placas cultivadas, de las muestras en donde hubo crecimiento de colonias bacterianas. Por la coloración,

forma y apariencia de las colonias de donde se hizo las preparaciones, se puede confirmar la presencia de *Klebsiella* en las muestras.....51

9. muestra el crecimiento de bacterias en los distintos medios en los que se hicieron las pruebas.....55

LISTADO DE FIGURAS

1. colonia sospechosa.....	41
2. <i>Bacillus cereus</i>	41
3. muestra agua del servicio.....	49
4. muestra coctel de fruta.....	49
5. <i>Bacillus cereus</i> (Endoespora elíptica).....	54
6. <i>Clostridium botulinum</i> (Endoespora terminal).....	54

1. INTRODUCCIÓN

Diariamente consumimos alimentos, ya sean naturales, empacados, procesados, elaborados o enlatados, los cuales por su naturaleza biológica presentan bacterias y otros microorganismos sean patógenos o nocivos lo que es común ya que en cualquier medio hay presencia de ellos. Según Caballero (2008), por lo general se les da más importancia a las bacterias patógenas o tóxicas, puesto que son las causantes de distintas enfermedades, adquiridas por la ingesta de alimentos contaminados por la presencia de este grupo de bacterias.

El hecho que alimentos enlatados sean tratados para eliminar estas bacterias, no implica que estén totalmente descontaminadas puesto que se conoce que las mismas pueden llegar a resistir estos métodos de tratamiento y proliferar en el alimento si no se almacena adecuadamente, o bien pueden ser contaminados luego del tratamiento por mala manipulación del producto. Por lo anterior es necesario tomar medidas de precaución a la hora de ingerirlos y así evitar una intoxicación, que puede llegar a afectar nuestra salud.

Es por ello, que el presente trabajo de investigación comprende lo antes mencionado; realizar un estudio sobre las diferentes bacterias presentes en frutas enlatadas, su identificación, clasificación y análisis que determinaran el grado de contaminación que presenta el producto. Por medio de estos análisis bacteriológicos se podrá determinar la calidad del producto y el posible daño que causan los organismos identificados a la salud del consumidor; además establecer recomendaciones para la ingesta del producto y así evitar una intoxicación de tipo alimentario.

2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Objetivo general:

Identificar bacterias que afectan la calidad sanitaria de las frutas enlatadas.

2.2 Objetivos específicos:

- Identificar las probables bacterias presentes en las frutas enlatadas en almíbar.
- Reconocer las diferentes especies de bacterias nocivas, patógenas y tóxicas presentes en las frutas enlatadas en almíbar.
- Enlistar las consecuencias en la salud humana o en la calidad del producto, que se pueden generar a partir del tipo de bacteria encontrada.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 antecedentes.

3.1.1 Historia de la microbiología de los alimentos.

Según Caballero (2008), El interés por evitar las enfermedades transmitidas por los alimentos surge con la práctica misma de ingestión de los alimentos; esta preocupación se manifiesta históricamente de muy diversas maneras. La necesidad de preservar los alimentos contra el deterioro constituyo un medio que de forma indirecta ha contribuido a proteger su inocuidad. Aunque es difícil señalar con precisión los primeros conocimientos acerca de la presencia y el papel de los microorganismos en los alimentos, se tiene evidencia de que su conocimiento antecede a la consideración de la microbiología como ciencia.

A partir del descubrimiento de los microorganismos y de su participación como causa de enfermedad desde finales del siglo XIX, se establecieron las bases para la generación de los principios científicos que permitirían prevenir la contaminación, impedir la proliferación, inactivar de manera segura los agentes patógenos microbianos en los alimentos y desarrollar técnicas que faciliten su detección (Caballero, 2008).

En 1683 Antony van Leeuwenhoek fue el primero en observar y describir los microbios, llamados entonces animáculos. En 1765 Lázaro Spallanzani comprobó que el tratamiento térmico repetido permitía evitar el crecimiento de microorganismos en infusiones, lo cual supone un primer desarrollo de métodos de esterilización de líquidos; realizo experimentos para refutar la doctrina de la generación espontanea, aunque no consiguió convencer a los seguidores de esta doctrina. Theodore Schwann (1837) realizo los primeros experimentos relacionados con la fermentación y putrefacción, originada por microorganismos y otros experimentos relacionados con la conservación de alimentos tratados con

calor; pero ninguno de estos 2 hombres consiguieron ventaja alguna de estos experimentos en cuanto a su aplicación práctica (Caballero, 2008).

Así mismo hay que destacar, a François Appert en 1809, quien desarrollo el método de conservación de carnes en frascos de vidrio, que mantenían en agua hirviendo durante periodos variables. Este método conocido “appertización”, constituyo la base del envasado de alimentos de la forma en que hoy día se hace, a pesar de que Appert no era un científico y probablemente ignoraba el alcance del descubrimiento en el que había trabajado.

De igual manera, Louis Pasteur un genial investigador francés, químico y microbiólogo, fue el primero que dio importancia y considero el alcance y el papel de los microorganismos en los alimentos: realiza experimentos que demuestran el origen microbiano de procesos de fermentación alcohólica (1860), láctica y butírica (1861), así como demostró la existencia de microorganismos anaerobios. Hacia 1860 utilizo por primera vez el calor para destruir los microorganismos nocivos del vino y de la cerveza (pasteurización). Louis Pasteur y John Tyndall demostraron definitivamente, que al igual que los organismos macroscópicos, los microbios solo son producidos por otros microbios (Caballero, 2008).

3.1.2 Historia de la microbiología del enlatado.

Nicolás Appert, un confitero francés coloco alimentos en botellas o tarros de vidrio, los sello con tapones de corcho y los calentó en agua hirviendo. Los alimentos así tratados no se deterioraron y el anuncio este descubrimiento en 1810. La microbiología era desconocida en esa época y el no pudo explicar porque su método tuvo éxito. El creyó que la combinación de calor y exclusión de aire “impedía la tendencia a la descomposición”.

Cincuenta años más tarde Louis Pasteur demostró que ciertos microorganismos eran responsables por la fermentación y la descomposición. El

fundo la ciencia de la microbiología y el termino “pasteurización” lleva su nombre. Aunque los hallazgos de Pasteur pudieron haber explicado porque el método de Appert tuvo éxito, no se explicaron inmediatamente al campo del enlatado de alimentos. Como resultado, los primeros enlatadores sufrieron muchas perdidas por deterioro para las cuales se desconocía la causa. Muchos enlatadores creían que sin un vacio los alimentos enlatados no se preservarían. Finalmente, las investigaciones en Microbiología de Alimentos comenzadas en el Instituto de Tecnología de Massachusetts en 1985, demostraron que el aparente misterio del deterioro de los alimentos enlatados se debía a una falla de aplicación de suficiente calor para destruir los microorganismos siempre presentes en los alimentos (Microbiología del enlatado, s.f.).

3.2 Descomposición microbiana de alimentos.

De acuerdo con Carpenter (1969) la descomposición es cualquier cambio en sabor, olor, consistencia o aspecto de un alimento que lo hace inconveniente o desagradable para su empleo. Los términos *desagradable* o *inconveniente* no pueden definirse objetivamente; depende de las costumbres y experiencias de los individuos que los consumen. En general, no obstante cada grupo de población tiene ciertos estándares o normas de “gusto”, esto es, apreciación gustativa de los alimentos, y un alimento que no se ajuste a estos estándares se le considera como descompuesto.

La descomposición microbiana de alimentos es un problema ecológico. Muchos alimentos son producidos o elaborados en condiciones que aseguran la contaminación con varios microorganismos, pero la supervivencia y multiplicación de estos microorganismos depende de la descomposición del alimento y las condiciones de almacenamiento. Los microorganismos que crecen llevan a cabo cambios característicos de sus esquemas metabólicos y alteran sabor, olor, contextura y aspectos del producto en cierta forma.

Los alimentos para el hombre y animales pueden clasificarse según su origen en: 1) productos vegetales; 2) productos animales; 3) productos elaborados (Carpenter, 1969, p. 303).

3.3 Crecimiento microbiano.

Según Andino y Castillo (2010) entendemos por *crecimiento microbiano* el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. Por tanto, no nos referimos al crecimiento de un único microorganismo que denominaremos *ciclo celular*, sino al demográfico de una población.

El fenómeno del crecimiento puede ser estudiado en microcultivos no teñidos, pero la medición del tamaño de la célula es más fácil en preparaciones teñidas. No obstante, la desecación y la fijación reducen el tamaño de la célula en un frotis, y las medidas obtenidas solo son relativas (Carpenter, 1969, p. 204).

- **Crecimiento microbiano en medios líquidos.**

Si la bacteria crece en un medio líquido, en la mayoría de los casos las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente formándose una *suspensión* de células libres. En un cultivo discontinuo de bacterias en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano:

1.- **Fase de adaptación:** durante la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo) para iniciar la fase de crecimiento exponencial.

2.- **Fase exponencial o logarítmica:** en ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio.

3.- **Fase estacionaria:** en ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo).

4.- **Fase de muerte:** se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo (Andino & Castillo, 2010, p.16-17).

- **Crecimiento microbiano en medio sólido.**

Las fases, parámetros y cinética de crecimiento discutidas para el caso de los cultivos líquidos se presentan también en cultivos sólidos. La cinética de crecimiento, en este caso, se puede estudiar siguiendo la evolución del número de células viables por unidad de superficie o por unidad de masa. Cuando una célula aislada e inmóvil comienza a crecer sobre un substrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una *colonia* (Andino & Castillo, 2010, p. 17).

3.3.1 Muerte de un microorganismo.

Desde el punto de vista microbiológico, un microorganismo muere cuando pierde de forma irreversible la capacidad de dividirse. Como consecuencia de esta pérdida, no se produce aumento en el número de microorganismos y, por tanto, no hay crecimiento. Sin embargo, un microorganismo puede estar muerto desde el punto de vista microbiológico y continuar desarrollando una actividad metabólica que se traduzca, por ejemplo, en liberación de toxinas.

Por otra parte, hay que considerar que la capacidad de multiplicación (crecimiento) de un microorganismo puede verse transitoriamente afectada por lesiones o por las condiciones físicas o químicas del entorno. En estos casos, podríamos considerar como muertos microorganismos que pueden reanudar su crecimiento si las condiciones son de nuevo favorables (Andino & Castillo, 2010).

3.4 Efectos del medio en las bacterias.

Según Carpenter (1969) el conocimiento de los requerimientos para el crecimiento de cada grupo de bacterias provee los medios para su control o eliminación.

La temperatura, el pH y otras características del medio modifican intensamente crecimiento y muerte de microorganismos. Estos factores alteran los índices o velocidades de reacciones bioquímicas intracelulares (Carpenter, 1969).

Para cada especie hay una temperatura óptima en que el microorganismo se multiplica con mayor rapidez y temperaturas máxima y mínima de crecimiento, por arriba y por debajo de las que no hay crecimiento. Las temperaturas progresivamente mayores que la temperatura máxima de crecimiento son cada vez mas mortales, pero las bacterias y otros microorganismos sobreviven periodos duraderos a temperaturas muy bajas (Carpenter, 1969).

Cada microorganismo también presenta pH mínimo, optimo y máximo para crecimiento. Las radiaciones ultravioletas y de otro tipo de varias longitudes de onda, matan a los microorganismos. Pueden también ser muertos lentamente por vibraciones sonoras. Muchos microorganismos sobreviven en soluciones hipotónicas e hipertónicas, pero su crecimiento suele retrasarse en medios hipertónicos (Carpenter, 1969, p. 229).

3.4.1 Temperatura.

Los microorganismos crecen dentro de una amplia escala de temperaturas. A presión atmosférica puede haber crecimiento microbiano dentro de un intervalo de temperatura comprendido aproximadamente desde – 8 hasta 100 °C. La exigencia más importante es que el agua se encuentre en estado líquido y por tanto disponible para mantener el crecimiento. Ningún organismo ha sido capaz de crecer en todas las temperaturas de este intervalo; las bacterias normalmente se

limitan a crecer en una escala de temperaturas entorno a los 35 °C, mientras que los mohos lo hacen con temperaturas algo inferiores a los 30 °C (Caballero, 2008).

3.4.2 Humedad.

Para Carpenter (1969) el agua es el medio por el que los microorganismos halofíticos (bacterias, levaduras y mohos) obtienen alimento y eliminan productos de desecho. Muchas bacterias y levaduras prefieren medios de alta concentración hídrica. Los mohos necesitan mucho menos agua; muchos crecen en sustancias que contienen de 50 a 60 por 100 de azúcar, e incluso en artículos de cuero y libros encuadernados, en ambientes húmedos.

La humedad relativa y la actividad acuosa están relacionadas entre sí, de modo que la humedad relativa es esencialmente una medida de la actividad de agua en la fase gaseosa. Cuando se almacena un alimento que tiene actividad acuosa baja en una atmosfera de humedad relativa elevada, el agua pasara desde la fase gaseosa al alimento (Caballero, 2008, p. 52).

3.4.3 pH.

El crecimiento y la actividad microbiana son afectados notablemente por el pH del medio, pero hay diferencias amplias entre las necesidades de pH de especies. Estas diferencias reflejan las costumbres normales y hábitats de los microorganismos. Cada especie crece solamente en ciertos límites de pH, y el crecimiento más rápido o abundante aparece en una zona limitada de pH óptimo (Carpenter, 1969)

3.5 Presencia de microorganismos en alimentos.

Todos los alimentos crudos normalmente contienen microorganismos los cuales eventualmente causan deterioro a menos que sean controlados o destruidos (Desrosier, 1984).

Lo anterior surge, debido a que la preservación de alimentos requiere que los microorganismos sean controlados, es importante saber que son y cómo se comportan. Los organismos de importancia para el enlatador son los hongos, las levaduras y las bacterias. Estos microorganismos pueden dividirse en grupos basados en sus características microscópicas o su apariencia visual en crecimientos masivos llamados colonias. Los factores de mayor importancia en la clasificación son: (1) el material que ellos pueden utilizar como alimento; (2) los productos que resultan de la descomposición de estos alimentos; y (3) su tolerancia al oxígeno, temperaturas de crecimiento y agentes destructivos, tales como el calor y sustancias químicas (Microbiología del enlatado, s.f.).

3.5.1 Bacterias más comunes en alimentos.

Las bacterias son los patógenos más habituales en los alimentos, aunque no son los únicos. Virus, mohos y levaduras también suelen frecuentar los alimentos. Las bacterias pueden causar al consumidor infección e intoxicación, que son dos consecuencias diferentes. La infección se produce por la ingesta de alimentos contaminados con bacterias vivas que entran en el huésped y provocan la enfermedad. La intoxicación, en cambio, aparece cuando se ingieren alimentos que antes se han contaminado con bacterias que producen toxinas, y estas últimas son las que causan la enfermedad. Sin embargo, el denominador común de todas ellas son los síntomas gastrointestinales que producen: dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarreas, calambres, fiebre, etc. (Caballero, 2008).

Dentro de todo el grupo de bacterias antes mencionadas, las especies más comunes de acuerdo con Gimferrer (2013) son:

***Salmonella*, alimentos implicados:** Los huevos crudos en primer lugar y todos los derivados en cuya elaboración se utiliza huevo crudo, como mayonesa, clara batida o leche con huevo; aves crudas o poco cocinadas; alimentos ya elaborados que se dejan a temperatura ambiente durante varias horas.

Recomendaciones:

- No lavar los huevos, la cáscara es muy porosa y la humedad facilita la penetración de bacterias en el interior. La salmonella se encuentra en la cáscara.
- No utilizar huevos rotos, con restos de plumas o heces.
- Conservarlos en el frigorífico para aumentar su vida útil, aunque pueden almacenarse a temperatura ambiente.
- Lavar el plato y utensilios donde se ha batido o manipulado huevo crudo para que no entre en contacto con los alimentos elaborados.
- Cocinar la carne en general, pero sobre todo las aves, la temperatura en el interior debe alcanzar los 65°C.

***Escherichia coli*, alimentos implicados:** carne de res cruda o poco cocinada, productos frescos crudos, leche cruda, jugos de fruta sin pasteurizar, agua contaminada o sin un adecuado tratamiento de potabilización.

Recomendaciones:

- Cocinar de forma adecuada la carne de res, sobre todo las hamburguesas.
- Control de los alimentos frescos en el origen, de forma especial la *leche y la carne*.
- Evitar consumo de leche no pasteurizada o agua no potabilizada.

- Desinfectar los vegetales que vayan a consumirse crudos o bien lavarlos con abundante agua.

***Campylobacter jejuni*, alimentos implicados:** carne de pollo cruda o poco cocinada, leche sin pasteurizar, agua sin un adecuado tratamiento de potabilización o contaminada, pescado crudo o poco cocinado.

Recomendaciones:

- Cocinar de forma adecuada la carne de pollo.
- Evitar contaminación cruzada, es decir, no mezclar carne cruda con alimentos ya cocinados. Este es el mayor riesgo de esta bacteria, por tanto, es importante la correcta higiene de las tablas de cortar, utensilios, platos, etc.

***Staphylococcus aureus*, alimentos implicados:** alimentos cocinados ricos en proteínas: jamón cocido, carne de ave, productos de pastelería (sobre todo los rellenos de crema), productos lácteos, ensaladas.

Recomendaciones:

- Imprescindible una buena praxis higiénica, es una bacteria resistente a las condiciones ambientales y en la mayoría de los casos convierte a los manipuladores de alimentos en su principal vía de propagación.
- Mantener los alimentos bajo temperaturas de refrigeración ya que el frío impide que se forme la toxina que desencadena la infección en humanos.

***Shigella*, alimentos implicados:** productos lácteos, carne de res y de pollo, ensaladas, frutas y verduras crudas, ostras crudas, agua no potabilizada o contaminada.

Recomendaciones:

- Evitar consumir alimentos crudos o poco cocinados.
- Mantener los productos crudos en refrigeración.
- Adecuada higiene personal.
- Evitar la contaminación cruzada, lavar utensilios de cocina después de su uso para no mezclar alimentos crudos con cocinados.

***Yersinia enterocolitica*, alimentos implicados:** carne de res, pescado, marisco crudo, productos lácteos, productos frescos, agua no potabilizada o contaminada.

3.5.1.1 Bacterias patógenas.

De acuerdo con Caballero (2008) los trastornos gastrointestinales debido a la ingestión de alimentos pueden obedecer a diferentes causas, por ejemplo: la ingestión de excesiva cantidad de alimentos, alergias, carencia nutritiva, verdaderos envenenamientos químicos, por plantas o animales tóxicos, toxinas bacterianas e infecciones por microorganismos. Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) de origen bacteriano son las que con mayor frecuencia se reportan a nivel mundial.

El perfil de las causas microbianas de las ETA muestra en la actualidad matices muy singulares. Las listas de patógenos se han incrementado notablemente. En algunos casos se trata de microorganismos recientemente descubiertos, en otros, son microorganismos que perdieron vigencia de acuerdo con los reportes epidemiológicos, pero han resurgido y se informan cada vez con mayor frecuencia, denominados organismos emergentes y reemergentes. Estos patógenos incluyen, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*,

Cryptosporidium parvum, *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli* (Caballero, 2008).

Algunos factores tienen una participación muy evidente en ese incremento, por ejemplo, cambios genéticos que se traducen en el incremento de la virulencia, nuevos patrones en los hábitos y costumbres alimentarias de la población, cambios en los sistemas y tecnologías aplicadas en la producción y distribución de los alimentos, entre otras (Caballero, 2008).

3.6 Características generales de las bacterias patógenas que con mayor frecuencia se aíslan de los alimentos.

De acuerdo con Caballero (2008), las bacterias que con mayor frecuencia se aíslan de los alimentos, son las siguientes:

***Salmonella*:** es una bacteria patógena para el hombre y muchos animales, produce una enfermedad de origen alimentario conocida como salmonelosis, que se presenta en formas esporádicas y brotes. Es la causa más común de ETA en diversos países, en Cuba es el primer agente causal de brotes de origen alimentario.

Salmonella es uno de los géneros más estudiados entre los patógenos que pueden ser aislados de los alimentos. El primer brote de salmonelosis se describió en Alemania en 1888, entre 50 personas que habían ingerido carne cruda molida proveniente de una vaca moribunda. Los integrantes de este género son bacilos gramnegativos no esporulados oxidasa negativa, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. La mayoría no fermentan la lactosa son móviles, son aerobios o anaerobios facultativos, contienen endotoxinas, generalmente son termolábiles, resisten la congelación y algunos agentes químicos, contienen una rica composición antigénica que se emplea como base para la identificación de sus miembros en serotipos, recientemente designados como serovares.

Se conocen tres formas clínicas de salmonelosis en el humano: gastroenteritis (causada por *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, etc), fiebre entérica (causada por *S. typhi* y *S. paratyphi*) y una enfermedad invasiva sistémica (ocasionada por *S. colerasuis*).

Shigella: es una de las bacterias patógenas que con mayor frecuencia causa infecciones intestinales en los niños, son comunes los brotes en condiciones de hacinamiento y en casos de deficiencia de la higiene personal, se distingue por poseer una dosis infectiva baja con respecto a otros patógenos.

La especie *Shigella dysenteriae* produce casi siempre la enfermedad más grave, que es la típica disentería bacilar. Estas bacterias pertenecen a la familia de las *Enterobacteriaceae*, el género comprende 4 especies patógenas al hombre: Grupo A, *Shigella dysenteriae*; Grupo B, *Shigella flexneri*; Grupo C, *Shigella boydii*; Grupo D, *Shigella sonnei*.

Escherichia coli (E. coli), patógena: forma parte importante de la microbiota intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, sin embargo, algunas cepas han desarrollado capacidad para provocar enfermedad en el hombre, como son las infecciones gastrointestinales. Estas cepas patógenas representan la principal causa de diarrea infantil en el mundo.

La capacidad de *E.coli* patógena para producir enfermedad está determinada por factores de virulencia que le permiten infectar a sus huéspedes y sobreponerse a los mecanismos de defensa, como la producción de adhesinas, enterotoxinas, citotoxinas y otras proteínas que le permiten sobrevivir en condiciones ambientales adversas.

Yersinia enterocolitica: es una bacteria invasiva, agente causal de una enfermedad transmitida por alimentos conocida como yersiniosis. Presenta características que son comunes a los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*; es un microorganismo en forma de bastón que presenta pleomorfismo

significativo, gramnegativo, no esporulado, móvil a 25 °C y las temperaturas inferiores a 29 °C favorecen su crecimiento. La expresión de algunas características de esta especie depende de la temperatura a la cual se desarrolla; como crece a temperaturas de refrigeración este procedimiento no es eficaz para frenar su crecimiento. Es destruida por el proceso de pasteurización.

Vibrio cholerae (V. cholerae): esta bacteria es un patógeno exclusivamente del hombre y ocupa un lugar destacado en la microbiología médica y sanitaria, por la devastadora forma en que muchos países fueron afectados en los siglos XIX y XX, y el excepcional potencial para provocar pandemias de gran magnitud. La palabra cólera, enfermedad que ocasiona este patógeno, trae a la mente la idea de catástrofe y muerte. A partir de 1800 se han presentado 7 pandemias.

El género *Vibrio* consta al menos de 12 especies patógenas al hombre, de estas: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. hollisae* y probablemente *V. furnissii* se distinguen como agentes causales de ETA. Pertenece a la familia *Vibrionaceae* y consiste en bacilos gramnegativos, rectos y curvos, móviles, no esporulados, termolábiles, aerobios y anaerobios facultativos, con un mecanismo oxidativo y fermentativo.

Staphylococcus aureus: fue descubierto en 1882 por Rosenbach. Su potencial patógeno para el hombre y los animales se manifiesta de diversas formas. En la microbiología sanitaria tienen especial interés tanto por las enterotoxinas que produce, como por el significado que se deriva de su presencia y cantidad en un alimento.

St. Aureus es una bacteria que pertenece a la familia *Micrococcaceae*, consiste en células esféricas (cocos) grampositivas, termolábiles, coagulasa positiva, aerobio facultativo, inmóvil, no esporulado, que resisten concentraciones relativamente altas de sal, producen hemólisis y fermentan el manitol, entre otras propiedades.

Bacillus cereus: como otras especies del genero *Bacillus*, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, es un bacilo grampositivo, corto con extremos cuadrados o redondeados, que forma cadenas cortas o hasta de 10 células, aerobio, esporulado con esporas elipsoides, centrales o subterminales que no distienden el esporangio, es móvil, capaz de hidrolizar el almidón, la caseína y la gelatina. Las esporas de *B. cereus* no muestran resistencia especial al calor, pero presentan resistencia insólita a la radiación y a los desinfectantes en comparación con la mayoría de bacterias mesófilas esporuladas. Produce una “intoxicación” que en algunos casos se caracteriza por náuseas y vómito de comienzo repentino (emética), es menos frecuente la aparición de diarrea y dolores abdominales, rara vez es mortal y el cuadro es muy parecido al de la intoxicación estafilocócica.

Clostridium botulinum: Van Ermengem en 1897 demostró por primera vez que el botulismo podía resultar del consumo de alimentos en los que *Cl. botulinum* había desarrollado y formado una toxina. Gran parte de la investigación acerca de esta bacteria patógena se hizo en relación con la rápida expansión de la industria del enlatado, y por la preocupación de los peligros inertes al consumo de productos tratados de forma insuficiente.

El género *Clostridium* comprende bacilos grampositivos, la mayoría móviles, anaerobios obligados, formadores de endosporas. *Cl. botulinum* no es un grupo muy homogéneo, la característica que comparten y que mantiene a la diversidad de microorganismos que conforman la especie es su potencial neurotoxigénico. Las diferencias entre las numerosas cepas de *Cl. botulinum* dan lugar a distintos esquemas de clasificación, los criterios más usados son la serología de toxinas y las propiedades metabólicas expresadas en cultivos.

Cl. botulinum es un bacilo muy robusto que llega a exhibir filamentos largos, nunca ramificados, es termorresistente, la espora que forma es subterminal y oval y deforma el cuerpo bacteriano; se reconocen tipos de *Cl. botulinum* según la

especificidad antigénica. Los tipos C y D se asocian con el botulismo en animales. Los casos humanos pertenecen a los tipos A, B y E, del tipo F solo se han reportado 6 casos, incluso el botulismo infantil. La toxina botulínica es muy potente pero tiene como característica importante que es termolábil, se destruye a 100 °C (durante 10 a 15 min). Algunas cepas se comportan como psicótrofas, las esporas sobreviven indefinidamente en los alimentos congelados y las del tipo E puede sobrevivir la desecación. Hay cepas que son proteolíticas.

La inhibición de *Cl. botulinum* se obtiene por la incorporación en los alimentos enlatados de conservadores químicos de tipo sorbato, especialmente en combinación con nitritos o polifosfatos.

El botulismo es una auténtica intoxicación alimentaria. El mecanismo de patogenicidad del *Cl. botulinum* viene dado porque al producirse la toxina botulínica termolábil, esta actúa provocando la parálisis muscular flácida y muerte por asfixia. La toxina actúa sobre la unión neuromuscular, bloqueando la liberación de acetilcolina, trasmisor esencial para la contracción muscular.

Clostridium perfringens: es un bacilo recto grampositivo, corto, esporulado, grueso con extremos terminales redondeados, está rodeado por una capsula y es inmóvil; forma una espora terminal oval que casi nunca es visible en los medios ordinarios. Es anaerobio aunque algunos investigadores lo acomodan mejor en el grupo de los microaerófilicos, por su capacidad para iniciar el crecimiento sin condiciones rigurosas de anaerobiosis.

Exhibe especial sensibilidad a las bajas temperaturas, incluso cuando esporula. La resistencia al calor de las esporas es variable, según la cepa; desde un inicio se planteó que las cepas termorresistentes correspondían a las asociadas con brotes de gastroenteritis alimentaria, en tanto, más bien las termosensibles eran productoras de gangrena gaseosa; actualmente no se acepta la validez de estas generalizaciones.

3.6.1 Alteración de alimentos enlatados.

Resulta difícil presentar un cuadro claro de la alteración microbiana de los alimentos enlatados, ya que depende de muchos factores interrelacionados. Entre estos factores citaremos, la carga específica correspondiente a los gérmenes resistentes al tratamiento térmico; la temperatura a la que crecerían los microorganismos supervivientes y, por tanto, la temperatura a la que se almacena el producto envasado; las características del alimento envasado para permitir la proliferación de los citados microorganismos; el pH del alimento y el comportamiento frente a él de los microorganismos supervivientes; la tensión de oxígeno y las propias necesidades de oxígeno de los gérmenes termorresistentes; la presencia de aditivos, como los nitratos, que pueden facilitar el crecimiento de los aerobios en ausencia de oxígeno libre y otros factores (Nickerson & Sinskey, 1972).

Las bacteria productoras de alteraciones en los alimentos enlatados pueden ser aeróbicas, anaeróbicas o facultativas, en cuanto a sus necesidades de oxígeno. Generalmente son mesófilas que crecen en 20 y 45 °C (68 y 113 °F) o termófilos. Se considera que los termófilos obligados requieren temperaturas entre 37,8 y 82,8 °C (100 y 180 °F) para su crecimiento; los termófilos facultativos se han definido como gérmenes que crecen bien a 55 °C (131 °F) pero que también lo hacen por debajo de 37,8 °C (100 °F). Realmente no se puede establecer una buena clasificación de los microorganismos con respecto a su temperatura de crecimiento, porque el rango de temperatura a que pueden proliferar las diversas especies es muy amplio (Nickerson & Sinskey, 1972).

3.7 Conservación de alimentos.

Según Caballero, (2008) Los alimentos pueden conservarse mediante diferentes vías o métodos, estos son: empleo de bajas temperatura, desecación, fermentación, curado-salado-ahumado, liofilización e irradiación.

3.7.1 Método de conservación de alimentos a bajas temperaturas.

Aunque el hombre en la prehistoria almacenaba la carne en cuevas de hielo, la industria de congelados tiene un origen más reciente que la de envasado. El proceso de congelación fue utilizado comercialmente por primera vez en 1842, pero la conservación de alimentos a gran escala por congelación comenzó a finales del siglo XIX con la aparición de la congelación mecánica¹.

La congelación conserva los alimentos impidiendo la multiplicación de los microorganismos. Dado que el proceso no destruye a todos los tipos de bacterias, aquellos que sobreviven se reaniman en la comida al descongelarse y a menudo se multiplican mucho más rápido que antes de la congelación.

Muchos de los métodos empleados para preservar los alimentos se basan, no en la destrucción o eliminación de los microorganismos, sino en retrasar su germinación o impedir su crecimiento. En estos casos la conservación es temporal, debido a que solo se inhibe la actividad de los microorganismos.

3.7.2 Método de conservación por desecación.

Este método se fundamenta en la reducción del contenido de agua de constitución de los alimentos a niveles que se hace imposible o extremadamente

¹ Véase: http://www.bedri.es/Comer_y_beber/Conservas_caseras/Metodos_de_conservacion.htm.

difícil es desarrollo y multiplicación de la flora microbiana. Es uno de los métodos más antiguos.

Existen dos métodos de desecación:

-Desecación natural al sol. Consiste en colocar las frutas y otros vegetales en bandejas que ofrecen gran superficie de evaporación.

-Desecación artificial. Se emplean secadores mecánicos de varios tipos que dependen de la naturaleza del producto que va a ser deshidratado, la economía y las condiciones de operación (Caballero, 2008).

3.7.3 Método de conservación por fermentación.

De acuerdo con Caballero (2008), sirve para uno o ambos objetivos siguientes: producir sabores y características físicas nuevas y deseables, así como ayudar a la conservación del alimento.

La conservación por fermentación depende de la conversión de azúcares a ácidos mediante la acción de los microorganismos y de la imposibilidad de las bacterias de crecer en un medio ácido. Aquí es necesario inhibir el desarrollo de los microorganismos capaces de provocar la putrefacción. El cloruro de sodio (sal común) es muy útil, limita el crecimiento de gérmenes putrefactos e inhibe el crecimiento de gérmenes indeseables en el proceso de la fermentación. No obstante, existen algunas bacterias que soportan y crecen en grandes concentraciones de sal.

El almacenamiento en frío de los productos fermentados y encurtidos le proporciona mejor estabilidad por varios meses y para los largos periodos de almacenamiento, se demanda una protección más completa y se utiliza el proceso de enlatado.

3.7.4 Método de conservación por curado-salación-ahumado.

Tiene su mayor aplicación para conservación de productos cárnicos. Tiene como ventajas:

-Da un color y sabor agradable al alimento.

-Posee apreciable valor preservativo.

En la actualidad la mayoría de carnes curadas generan un producto alterable que debe conservarse en refrigeración, ejemplo: jamones, por lo que la mayoría de las carnes se ahúman después de curadas, para ayudar a su conservación.

Agentes autorizados para el curado de carnes: cloruro de sodio, azúcar, nitrato de sodio, nitrito de sodio, vinagre.

Ahumados. Se utilizan a menudo para la conservación del pescado, el jamón y las salchichas. El humo se obtiene por la combustión de madera, con un aporte limitado de aire. En este caso, parte de la acción preservadora se debe a agentes bactericidas presentes en el humo, como el metanal y la creosota, así como por la deshidratación que se produce durante el proceso. El ahumado suele tener como finalidad dar sabor al producto, además de conservarlo.

Salazón. Se pueden usar otros métodos o combinaciones de métodos para conservar los alimentos. La salazón del pescado y el cerdo es una práctica muy antigua. La sal penetra en los tejidos y, a todos los efectos, fija el agua, inhibiendo así el desarrollo de las bacterias que deterioran los alimentos.

Se emplea como medio de preservación de pescados, carnes y vegetales con el objetivo de:

-Destruir muchos microorganismos.

-inhibir la acción catalítica de las enzimas que produzcan descomposición lenta.

-Le confiere al producto actitud comercial por largo tiempo (Caballero, 2008).

3.7.5 Método de conservación por calor.

Caballero (2008) nos dice, que su finalidad es la destrucción total de gérmenes patógenos y sus esporas. Las técnicas utilizadas para ello son: pasteurización y esterilización.

Esterilización: Consiste en colocar el alimento en recipiente cerrado y someterlo a elevada temperatura durante bastante tiempo, para asegurar la destrucción de todos los gérmenes y enzimas. Mientras más elevada sea la temperatura de esterilización menor será el tiempo. A 140 °C el proceso dura solo unos segundos.

Proceso que destruye en los alimentos todas las formas de vida de microorganismos patógenos o no patógenos, a temperaturas adecuadas, aplicadas de una sola vez o por tindalización (115- 130 °C durante 15-30 min). Si se mantiene envasado el producto la conservación es duradera. El calor destruye las bacterias y crea un vacío parcial que facilita cierre hermético, impidiendo la recontaminación.

En un principio consistía en el calentamiento a baño María o en autoclave de alimentos después de haberlos puesto en recipientes de cristal, como frascos o botellas.

Pasteurización: Es una operación que consiste en la destrucción térmica de los microorganismos presentes en determinados alimentos, con la finalidad de permitir su conservación durante un tiempo limitado.

La pasterización se realiza por lo general a temperaturas inferiores a los 100 C. cabe distinguir la pasterización en frío a temperatura entre 63 y 65 C durante 30 min, y la pasteurización en caliente, a temperaturas de 72-75 C durante 15 min.

Cuanto más corteo es el proceso, mas garantías existen de que se mantengan las propiedades organolépticas de los alimentos así tratados.

Después del tratamiento térmico, el producto se enfría con rapidez hasta alcanzar 4-6 C y, a continuación, se procede a su envasado. Los productos que habitualmente se someten a pasteurización son la leche, la nata, la cerveza y los zumos de frutas.

La pasteurización de la leche y la crema pretendía, inicialmente, ampliar la vida comercial de estos productos a las temperaturas de refrigeración y no la destrucción de bacteria patógenas que pudieran contener. Sin embargo, esta última finalidad se ha convertido actualmente en uno de los principales objetivos (Nickerson & Sinskey, 1972).

3.8 Enfermedades de origen alimentario.

Las enfermedades por microbios propagadas por alimentos incluyen infecciones alimentarias o intoxicaciones por alimentos. Una infección alimentaria es la causada por la invasión del huésped por microorganismos patógenos del alimento; la intoxicación alimentaria es producida por una toxina que se encuentra en el alimento en el momento de consumirlo (Carpenter, 1969).

Las intoxicaciones alimentarias son enfermedades en las que las bacterias proliferan en el alimento, produciendo una sustancia toxica para el hombre y animales de sangre caliente. En este caso las bacterias se multiplican en el alimento y, en circunstancias normales, no proliferan en el huésped, produciéndose las sustancias venenosas o toxinas en el alimento, una vez que ha tenido lugar la multiplicación de las bacterias. En este caso los productos tóxicos se encuentran ya en los alimentos cuando estos se ingieren (Nickerson & Sinskey, 1972).

3.8.1 Infecciones de origen alimentario.

Son de dos tipos: 1) aquellas en las que el patógeno no se multiplica de ordinario en el alimento sino que es transmitido por él, por ejemplo, fiebre tifoidea y paratifoidea, disentería, brucelosis, cólera, tuberculosis y difteria; 2) enfermedades en que el patógeno se multiplica en el alimento por lo regular en grandes cantidades antes de ingerirlo, p. ej. gastroenteritis causada por muchas especies de *Salmonella*, como ejemplo principal (Carpenter, 1969).

La salmonelosis: está producida por la ingestión de bacterias del grupo *Salmonella*. Estas bacterias invaden los tejidos, se multiplican y dan lugar en el huésped a los síntomas típicos.

Los síntomas generales de la salmonelosis son: dolor abdominal, diarrea, escalofríos, vómitos frecuentes y postración. No obstante, en los casos graves pueden presentarse síntomas más importantes. Entre ellos: septicemia con leucopenia (reducción del recuento de leucocitos), endocarditis o pericarditis, meningitis y otras afecciones, como puede ser incluso la osteomielitis (Nickerson & Sinskey, 1972).

Fiebre tifoidea: La infección alimentaria del primer tipo se ilustra por la fiebre tifoidea. *Salmonella typhosa*, el microorganismo patógeno, llega a los alimentos de las manos de los portadores o de los pacientes ambulantes. Un portador es un individuo que no tiene la infección activa pero en su organismo tiene el microbio y lo excreta. Las bacterias excretadas con frecuencia contaminan las manos de pacientes y portadores. *S. typhosa* sobrevive adecuadamente en alimentos no ácidos, y para iniciar la infección en individuos susceptibles basta número pequeño del mismo. Las epidemias importantes de fiebre tifoidea en el pasado por lo regular se transmitían por agua o por leche, o en los 50 años últimos, la gran preferencia que se ha dado a la sanidad y las medidas de higiene ha disminuido la importancia de estas formas de transmisión en muchos países civilizados. Los

pequeños brotes que se observan se atribuyen en gran parte a los portadores y a la infección de origen alimentario (Carpenter, 1969).

Casi siempre la fiebre tifoidea es una enfermedad más grave que la salmonelosis, dando lugar en determinados casos a fiebre muy alta y úlceras en el intestino delgado (placas de Peyer). Puede terminar con la muerte, bien a causa de la fiebre o por perforación intestinal con la consiguiente peritonitis (Nickerson & Sinskey, 1972).

Shigelosis: En las estadísticas de salud pública de Estados Unidos, figuran casi tantos casos anuales de shigelosis humana o disentería bacilar, como de salmonelosis. Por otra parte, el índice de mortalidad es más alto para la shigelosis que para la salmonelosis.

Los alimentos preparados con alto contenido de humedad, la leche y los productos lácteos son sospechosos de estar implicados en la transmisión de la enfermedad. También se ha constatado que los alimentos de esta clase, que transmiten la enfermedad por ingestión, han sido contaminados con excretas humanas. Siendo así se podría pensar que cualquier alimento transmitiría la enfermedad, habiendo sido señalados en los últimos años diversos alimentos como transmisores (Nickerson & Sinskey, 1972).

3.8.2 Intoxicación por alimentos.

Las exotoxinas elaboradas por ciertas especies de *Staphylococcus aureus* o por *Clostridium botulinum* tienen importancia principal en las intoxicaciones por alimentos. Algunas de estas intoxicaciones alimentarias pueden llegar a ser mortales, dependiendo del tipo de toxina que se haya ingerido o de la variedad de la especie toxica, como es el caso del *Clostridium* que presenta variedades nocivas y variedades toxicas letales aun cuando se encuentra en baja concentración en el alimento o producto, generalmente enlatado.

Intoxicación alimentaria por estafilococos: El periodo medio de incubación después de la ingestión de alimentos que contengan enterotoxina de estafilococos es más o menos de dos horas. Los síntomas incluyen cefalea, náuseas, vómito violento y debilidad o postración intensas. El restablecimiento es rápido y por lo regular ocurre en término de 24 horas. Pocas veces mueren los pacientes.

Los estafilococos están distribuidos ampliamente en piel y membranas mucosas del ser humano, en individuos sanos y en individuos con enfermedades de la zona alta del aparato respiratorio, furúnculos y otras infecciones. Algunos de estos microorganismos pueden producir la enterotoxina.

Los alimentos que por lo regular causan este tipo de intoxicación incluyen ensaladas, productos de panificación que contengan crema o relleno de otro tipo, y patatas preparadas en forma de crema; también pueden causar la enfermedad carnes de cuadrúpedos o de peces enlatados o cocidos, pasteles de carne, carne de res prensada, jamón, y lengua cocidos. La enterotoxina estafilocócica tiene caracteres insólitos, dado que es termoestable, esto es, resiste la ebullición durante 30 minutos o más, y en consecuencia la cocción no la destruye (Carpenter, 1969).

Intoxicación alimentaria por Botulismo: Esta enfermedad es causada al ingerir la enterotoxina de *Clostridium botulinum*, una de las toxinas más potentes que se conocen. La toxina es producida en los alimentos antes que se consuman y es absorbida por las membranas mucosas gástricas y de la parte alta del intestino. Los experimentos en animales indican que dosis de 0.01 de miligramo o cifra menor puede ser mortal para un adulto, cantidad que incluye una simple judía infectada.

El periodo de incubación suele ser menor de 24 horas. Los síntomas incluyen vómito, constipación, diplopía, sed, parálisis de la faringe y secreción de saliva viscosa y espesa. No hay pérdida de la conciencia hasta que el paciente entra en agonía; la temperatura por lo regular es subnormal. El paciente muere en término

de 24 horas después del inicio de los síntomas o su muerte puede retrasarse incluso una semana. El restablecimiento completo puede necesitar de seis a ocho meses. De 60 a 70 por 100 de los casos son mortales.

Casi todos los casos de botulismo se han atribuido a alimentos ahumados, curtidos o enlatados, a los que se ha dejado reposar durante un tiempo y después de ello se han consumido sin cocerlos o después de cocción insuficiente. Muchos brotes en Estados Unidos de Norte América se atribuyen a verduras enlatadas, p. ej; aceitunas, maíz, judías verdes, espinacas y guisantes. Los brotes en Europa suelen asociarse con la ingestión de salchichas, jamón, carnes conservadas de cuadrúpedos, aves o peces. Con frecuencia hay descomposición patente de los alimentos, cosa que no acontece siempre. Afortunadamente la toxina de *Cl. botulinum* se destruye en pocos minutos a 75 °C y con mayor rapidez a la temperatura de ebullición (Carpenter, 1969).

Intoxicación por *Clostridium perfringens*: Este tipo de intoxicación ha recibido en los últimos años, la mayor atención dentro del campo de las enfermedades transmitidas por los alimentos. Se cree que esta enfermedad es una infección transmitida por los alimentos, debido al crecimiento de *Clostridium perfringens*. Esta afección se ha considerado como una infección alimentaria por el hecho de que filtrados estériles de elementos nutritivos, en los que había crecido *Clostridium perfringens* no causaban la enfermedad, mientras que esta se desencadenaba en voluntarios humanos que habían ingerido el cultivo de los microorganismos aislados con anterioridad de brotes de la enfermedad. Aunque solo desde hace unos cuantos años se reconoce que *Clostridium perfringens*, si se encuentra en los alimentos en suficiente cantidad, puede ser causa de infecciones transmitidas por los alimentos; actualmente se sabe que en Inglaterra más de 10 % de las enfermedades transmitidas por los alimentos pueden ser de este origen y que, en los Estados Unidos, el número de casos conocidos aumento de 25 en 1953 a 95 en 1957, siendo señalados, en 1969, 18,527 d toxiinfección por *Cl. perfringens*. Este microorganismo se encuentra normalmente en el intestino

grueso del hombre, aunque en el caso de que existan en los alimentos cepas adecuadas y el número preciso, pueden proliferar en el intestino delgado y dar lugar a trastornos gástricos.

Los síntomas de la enfermedad están presentados por dolores abdominales agudos, diarrea y náuseas, siendo raros los vómitos. El comienzo de los síntomas tiene lugar de 8 a 22 horas después de la ingestión de los alimentos (Nickerson & Sinskey, 1972).

Intoxicación alimentaria por Cólera: Su periodo de incubación es de 1-3 días, aunque a veces llega a 5 días. La enfermedad se caracteriza por diarrea con heces muy acuosas, vómitos y debilidad. Las deposiciones son mucosas pero, si hay sangre, esta es muy escasa y nunca aparece material purulento. En general, el paciente sufre deshidratación, ya que es incapaz de retener el agua ingerida por vía oral, el pulso se debilita y, a veces, aparecen contracturas musculares. Aunque pueden presentarse infecciones secundarias, este hecho no es frecuente. Durante las epidemias de la enfermedad hay casos cuyos únicos síntomas son malestar y diarrea.

El microorganismo productor de la enfermedad pertenece al grupo de bacterias denominado *Vibrio*, concretamente ha recibido el nombre de *Vibrio comma*. Es un organismo baciláceo, corto y curvado con un solo flagelo en posición terminal. Es aerobio, móvil, crece en medios bacteriológicos ordinarios y es gramnegativo. Presenta antígenos flagelares y somáticos, por lo que puede ser identificado mediante pruebas de aglutinación efectuadas frente a los anticuerpos de estos antígenos (Nickerson & Sinskey, 1972).

3.9 Métodos de detección de contaminación microbiana.

La elección de los métodos de laboratorio a utilizar para la detección de contaminación microbiana debe privilegiar a aquellos métodos estandarizados y de alta sensibilidad que hayan sido validados por organismos internacionales o nacionales de referencia. Primeramente, para implementar cualquier método de detección, se requiere preparar las muestras del alimento, lo que generalmente consiste en la elaboración de diluciones que permitan disminuir la concentración del microorganismo en la muestra y poder observar mejor.

3.9.1 Diluciones de la muestra de alimento para detección de contaminación.

Según Andino y Castillo (2010) por lo general en el alimento o producto a analizar, la bacteria que se quiere identificar está presente en cantidades mucho mayores que otras con las que se encuentra mezclada. De tal manera que, se procede a elaborar una solución madre que consiste en colocar el material cubierto con el microorganismo en un recipiente que contiene 10 ml de agua destilada estéril con 0.01 % de Tween 80, cuya suspensión resultante se debe agitar por 1 minuto, para obtener la suspensión concentrada del inóculo más otras partículas y es a esta suspensión a la que llamamos solución madre. Esta operación se repite varias veces hasta lograr obtener una serie de diluciones (10-1 hasta 10-6).

3.9.2 Aislamiento de microorganismos.

El aislamiento es una etapa importante en el estudio de microorganismos y comprende a la separación de aquél organismo de interés con respecto a otros que pueden estar presentes en la misma muestra de alimento. Para esto, se realizan una serie de pasos donde se aplican técnicas microbiológicas

convencionales y comprende: muestreo, tratamiento de la muestra, enriquecimiento aislamiento, manutención y preservación de los microorganismos.

3.9.3 Recuento en placa.

Es el método más utilizado para la determinación del número de células viables o unidades formadoras de colonias (U.F.C.) en un alimento. Los recuentos de microorganismos viables se basan en el número de colonias que se desarrollan en placas previamente inoculadas con una cantidad conocida de alimento (dilución) e incubadas en unas condiciones ambientales determinadas. Las placas se incuban en condiciones de aerobiosis, a 35 °C durante 24 a 48 horas. Luego se aplican las reglas para el recuento, establecidas para este método (Andino & Castillo, 2010).

Generalmente, el número de bacterias de los alimentos es tan elevado que, para obtener colonias aisladas en placas, es necesario realizar diluciones del alimento. Los productos sólidos, en cualquier caso, deben ser diluidos, ya que no es posible hacer directamente recuentos en placa a partir de alimentos sólidos y, por otra parte, la siembra de diluciones baja (1:10) dificulta la diferenciación de las colonias de las partículas alimenticias (Nickerson & Sinskey, 1972).

3.9.4 Método del número más probable (NMP).

El método NMP o el de tubos múltiples se basa en la determinación de la presencia o ausencia de un determinado tipo de m.o. (en función de que crezcan o de que produzcan determinada reacción en el medio), en cantidades decrecientes de muestra. Según Andino y Castillo (2010) el número de microorganismos de la muestra original se conoce por las tablas estándar de NMP. Este método es de naturaleza estadística y el NMP conseguido es más alto que en el método anterior.

Por ejemplo, se utilizan un total de nueve tubos con medio de cultivo, en tres de los cuales se siembra 0,1 g. de muestra, en tres 0,01 g y en los otros tres restantes 0,001 g. Luego de la incubación, se observan y se cuentan el número de tubos positivos. Se puede considerar como positivos aquellos tubos en los que: 1) Hubo crecimiento que se detecta como aparición de turbidez (siempre que la muestra sembrada no enturbie el medio); 2) Detección de productos del metabolismo del microorganismo. a) Producción de gas que se observa en una campanita invertida (Durham) en el tubo; b) Viraje de indicador (de pH, de potencial redox, etc.); c) Producción de pigmento; d) Otros (reducción de NO_3^- , producción de indol, hidrólisis de una proteína, etc.).

Ocasionalmente, es necesario subcultivar cada uno de los tubos positivos, o presuntamente positivos a placa, o a otro tubo (con el mismo u otro medio) a efectos de confirmarlo (Andino & Castillo, 2010).

3.9.5 Método de detección de mesófilos aerobios.

En este grupo se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 30° C en las condiciones establecidas. Según Andino y Castillo, (2010) en este recuento se estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos. Esta determinación indica el grado de contaminación de una muestra y las condiciones que han favorecido o reducido la carga microbiana. Desde luego, no se aplica a alimentos fermentados, y puede dar escasa información sobre el manejo del alimento cuando éste es poco favorable para el desarrollo microbiano por su pH (grado de acides o alcalinidad) o aw (concentración de agua), por ejemplo, no obstante, altos recuentos microbianos se consideran poco aconsejables para la mayor parte de los alimentos y suelen ser signo de inmediata alteración del producto. Tasas superiores entre 10^5 y 10^7 gérmenes por gramo suelen ser ya inicios de descomposición. Este grupo es un

indicador importante en alimentos frescos, refrigerados y congelados, en lácteos y en alimentos listos para consumir (RTE por sus siglas en inglés: ready to eat).

3.9.6 Método de detección de coliformes fecales.

Los coniformes fecales tienen significado sanitario y se les considera como presuntos *Escherichia coli*. (*E. coli*). Se utilizan dos tipos de procedimientos para hacer la prueba de los coliformes. Son el procedimiento del número más probable (MPN), y el de filtración a través de una membrana (MF).

En general niveles altos de coniformes indican manipulación y elaboración deficientes de los alimentos. La determinación se hace a partir de la segunda etapa (confirmativa) del método de NMP, cultivando en caldo lactosado con incubación a 44.5 °C (Andino & Castillo, 2010).

3.9.7 Método de detección de *Escherichia coli*.

Por su especificidad la *E. coli* está considerada como un buen índice de contaminación fecal. Tiene el inconveniente de vivir poco tiempo en el ambiente, extraentérico, por lo que su presencia en los alimentos indica contaminación reciente en productos como agua embotellada, leche y jugos, alimentos infantiles, y alimentos procesados, en general. Se caracteriza por ser coliforme termotolerante (fermenta lactosa a 44.5°C) que produce indol a partir de triptófano y produce glucuronidasa, características que se usan para su identificación en laboratorio, generalmente en la etapa final del NMP o de alguno de los otros métodos, incluyendo *Petrifilm* que al igual que en el caso explicado anteriormente, es un método rápido (24 – 48 horas) de detección de este microorganismo (Andino & Castillo, 2010).

3.9.8 Pruebas para investigar la presencia de *Clostridium botulinum* en los alimentos.

Aunque las pruebas bacteriológicas para la identificación de los distintos tipos de *Clostridium botulinum* no son muy satisfactorias, se pueden emplear cultivos de enriquecimiento con el fin de detectar la presencia de toxina, así como para aislar el microorganismo en medios bacteriológicos.

Nickerson y Sinskey (1972) nos dicen: como los clostridios son bacteria esporuladas, es aconsejable someter el cultivo o la muestra, antes de su incubación, a un fuerte calentamiento. Este tratamiento térmico es capaz no solo de eliminar el aire del medio sino también de eliminar las formas vegetativas, que podrían crecer más abundantemente que los propios microorganismos botulínicos. Para los tipos A y B de *Clostridium botulinum* son adecuados los calentamientos a 80 o 100 °C (176 o 212 °F), siendo las esporas del tipo E mas termosensibles. En este último caso son preferibles los tratamientos a 60 C (140 °F) durante 15 minutos. Los medios líquidos, después del choque térmico, se deben cubrir con una capa de petróleo semisólido para evitar la redisolución del oxígeno. Se incubaran varias series de tubos a cada una de las siguientes temperaturas: 35,30 y 25 °C (95,86 y 77 °F). El periodo de incubación tiene una duración de 5 a 7 días.

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo y diseño de la investigación.

El tipo de investigación será descriptivo, ya que en estos estudios se busca especificar las propiedades o características importantes de personas, grupos, comunidades o cualquier otro fenómeno, tal es el caso de las colonias de bacterias (Hernández, Fernández-Collado, & Baptista, 2006).

El diseño será no experimental, ya que solo se limitara a observar los resultados sin interferir en ellos (Hernández et al., 2006).

El método será cuantitativo mixto, puesto que se utilizaran análisis estadísticos y formulas para obtener la información requerida; además se tomaran en cuenta las características de las especies encontradas (Hernández et al., 2006).

4.2 Descripción del área de estudio.

Los laboratorios de Biología de la Facultad Multidisciplinaria de Occidente se encuentran ubicados en la zona sur de la facultad, cerca de la entrada de peatones. Cada uno de los laboratorios cuenta con cinco mesas de trabajo cada una para 10 personas, estos cuentan también con una bodega que está ubicada en medio de los dos laboratorios, en donde se encuentran todos los instrumentos y reactivos necesarios para las prácticas de laboratorio de las distintas materias que sirve el Departamento de Biología.

La Facultad Multidisciplinaria de Occidente se ubica a unos 672 msnm (metros sobre el nivel del mar) en la zona Sur del Municipio de Santa Ana.

4.3 Universo, población y muestra.

El universo son todas las frutas enlatadas en almíbar del Departamento de Santa Ana.

La población son las frutas enlatadas en almíbar de los supermercados más reconocidos de la Ciudad de Santa Ana.

La muestra serán las frutas enlatadas en almíbar, utilizadas para realizarles los análisis microbiológicos, de la Despensa de Don Juan El Palmar, Super Selectos Colón y Despensa Familiar Colón.

4.4 Instrumentos y técnicas de la investigación.

Instrumentos.

Los instrumentos que se utilizaran son: medios de cultivo comunes para detección de bacterias comunes presentes en alimentos (TSA, MacConkey, EMB, Tioglicolato, caldo verde brillante bilis de buey), placas de petri, tubos con tapón de rosca, tubitos durham, canastillas para tubos, asas bacteriológicas, autoclave u hoya de presión para esterilizar, incubadora, hoyas, agitadores, pipetas, balanza analítica, beakers, agua destilada, mechero bunsen, rejilla para mechero, maya de asbesto, libreta de laboratorio, tirro, plumón, cámara digital, computadora, gabacha de laboratorio, fenol para desinfectar la mesa de trabajo (ver anexo 5).

Técnicas de investigación.

Debido a que en la investigación se tratara de identificar bacterias presentes en frutas enlatadas en almíbar, ya sean patógenas, tóxicas o nocivas, se realizaran análisis bacteriológicos comunes lo que implican técnicas de laboratorio

comunes para este tipo de trabajo. Las muestras se tomaran directamente de la lata por medio de una aza bacteriológica para luego ser sembrado en los diferentes medios de cultivo preparados para la detección de bacterias, y luego serán incubados a las temperaturas propicias para su crecimiento (ver anexos 2 y 3).

Los análisis se harán por semana para cada variedad de fruta y con variación de días dependiendo de la temperatura de incubación que necesite la bacteria que se desee detectar para aprovechar el tiempo y el hecho de que solo se cuente con una incubadora.

Se tomaran tres marcas: Del Monte, Dany, Sabemas (antes Suly), que son las marcas más conocidas, los análisis se harán por marca tomada de cada uno de los supermercados, se sacara una muestra por cada variedad de fruta de la marca de distinto supermercado y se le aplicaran los respectivos análisis; luego a la semana siguiente se hará lo mismo con la siguiente marca y sus variedades hasta completar las tres marcas establecidas. Este procedimiento o técnica se repetirá tres veces para asegurar el éxito de su realización.

5. RESULTADOS

En las siguientes tablas, se muestran los análisis microbiológicos realizados a cada una de las diferentes muestras de frutas enlatadas en almíbar.

5.1 Determinación de bacterias en frutas enlatadas.

Tabla 1: muestra el crecimiento de organismos bacterianos en el medio, de cada una de las diferentes muestras.

MUESTRA	MARCA	VARIEDAD	FECHA DE VENCIMIENTO	PRUEBA	RESULTADOS (microorganismos)
Despensa de Don Juan El Palmar	Del Monte	Coctel de Frutas	15-08-2014	Placa vertida	Crecimiento de colonias blancas, redondas.
Despensa de Don Juan El Palmar	Del Monte	Melocotones en rodajas	11-08-2015	Placa vertida	Crecimiento de colonias de tipos diferentes.
Despensa de Don Juan El Palmar	Sabemas	Coctel de Frutas	31-08-2015	Placa vertida	Crecimiento de colonias grandes, blancas en forma de huevo estrellado
Despensa de Don Juan El Palmar	Sabemas	Melocotones en mitades	31-08-2015	Placa vertida	Crecimiento proliferado de colonias pequeñas de color blanco
Super Selectos Colón	Del Monte	Coctel de Frutas	26-08-2015	Placa vertida	Crecimiento exagerado de colonias, las cuales cubren toda la superficie del medio
Super Selectos Colón	Del Monte	Melocotones en cuartos	20-07-2015	Placa vertida	Crecimiento de colonias pequeñas, blancas y redondas, que cubren todo el medio
Super Selectos Colón	Dany	Coctel de Frutas	20-03-2017	Placa vertida	Crecimiento de unas cuantas colonias grandes, blancas, en forma de huevo estrellado.
Super Selectos Colón	Dany	Melocotones en mitades	20-03-2017	Placa vertida	Crecimiento de muy pocas colonias; un par de colonias color amarillo y redondas;

					y otras de color blanco
Despensa Familiar Colón	Sabemas	Coctel de Frutas	31-08-2015	Placa vertida	Crecimiento de colonias grandes, ramificadas, en forma de copos de nieve
Despensa Familiar Colón	Sabemas	Melocotones en mitades	31-08-2015	Placa vertida	Crecimiento de colonias redondas de color blanco, abultadas y apariencia cerosa
Despensa Familiar Colón	Del Monte	Coctel de frutas	26-08-2015	Placa vertida	Crecimiento exagerado de algunas colonias, las cuales cubren una gran parte del medio. Además unas cuantas colonias pequeñas, blancas y redondas
Despensa Familiar Colón	Del Monte	Melocotones en cuartos	20-07-2015	Placa vertida	Crecimiento de una gran cantidad de colonias pequeñas, redondas, blancas, opacas

5.2 Recuento de colonias en placa (Dilución de 10^{-6}).

Tabla 2: muestra los diferentes crecimientos de colonias bacterianas, en las distintas muestras, luego haber sido diluidas hasta 10^{-6} .

MUESTRA	MARCA	VARIEDAD	FECHA DE VENCIMIENTO	PRUEBA	RESULTADOS (microorganismos)
Despensa de Don Juan El Palmar	Del Monte	Coctel de Frutas	15-08-2014	Placa vertida	Se contaron 38 colonias en esta muestra
Despensa de Don Juan El Palmar	Del Monte	Melocotones en rodajas	11-08-2015	Placa vertida	Se contaron 153 colonias es esta muestra
Despensa de Don Juan El Palmar	Sabemas	Coctel de Frutas	31-08-2015	Placa vertida	Se contaron 59 colonias en esta muestra

Despensa de Don Juan El Palmar	Sabemas	Melocotones en mitades	31-08-2015	Placa vertida	Se contaron 323 colonias en esta muestra
Super Selectos Colón	Del Monte	Coctel de Frutas	26-08-2015	Placa vertida	Se contaron 83 colonias en esta muestra
Super Selectos Colón	Del Monte	Melocotones en cuartos	20-07-2015	Placa vertida	Se contaron 457 colonias en esta muestra
Super Selectos Colón	Dany	Coctel de Frutas	20-03-2017	Placa vertida	Se contaron 98 colonias en esta muestra
Super Selectos Colón	Dany	Melocotones en mitades	20-03-2017	Placa vertida	Se contaron 45 colonias en esta muestra
Despensa Familiar Colón	Sabemas	Coctel de Frutas	31-08-2015	Placa vertida	Se contaron 41 colonias en esta muestra
Despensa Familiar Colón	Sabemas	Melocotones en mitades	31-08-2015	Placa vertida	Se contaron 339 colonias en esta muestra
Despensa Familiar Colón	Del Monte	Coctel de frutas	26-08-2015	Placa vertida	Se contaron 41 colonias en esta muestra
Despensa Familiar Colón	Del Monte	Melocotones en cuartos	20-07-2015	Placa vertida	Se contaron 53 colonias en esta muestra

Resultados de concentración bacteriana.

Se tomo el cultivo con menor número de colonias: Coctel de Frutas Del Monte, Despensa de Don Juan (24-09-2013), el cual tuvo un crecimiento de 38 colonias ramificadas y de color blanco, esto con dilución de 10^{-6} .

- N° de colonias X dilución = concentración bacteriana

$$38 \text{ colonias} \times 10^{-6} \text{ dilución} = 3.8 \times 10^{-5} \approx 0.000038 \text{ mo.}$$

Para esta misma muestra, por sospecha de presencia de *Bacillus cereus*, se realizo tinción de frotis con safranina y tinción de Gram completa para asegurar resultados (ver anexo 4). Lo cual dio resultados positivos comprobándose y clasificándose la muestra como *Bacillus cereus*, por coincidir con las características típicas como: pequeños bastones gram positivos con endoespora.

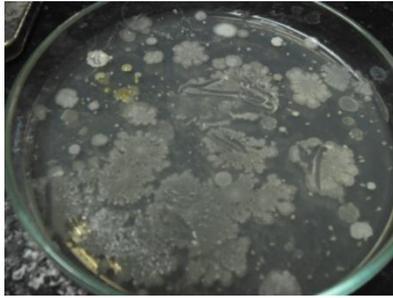


Figura 1: colonia sospechosa.

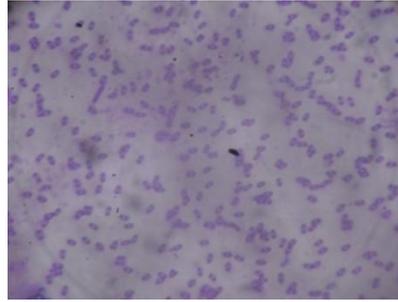


Figura 2: *Bacillus cereus*.

5.3 Pruebas presuntivas.

5.3.1 prueba para coliformes fecales en Agar EMB.

Tabla 3: muestra el crecimiento positivo de colonias bacterianas en Agar EMB, lo cual demuestra la presencia de coliformes, pero no confirma la presencia de coliformes fecales ni de *Escherichia coli*.

MUESTRA	MARCA	VARIEDAD	FECHA DE VENCIMIENTO	PRUEBA	RESULTADOS (microorganismos)
Despensa de Don Juan El Palmar	Del Monte	Coctel de Frutas	15-08-2014	Placa vertida	Crecimiento de colonias de color moradoso oscuro, no se nota el color verde metálico típico en este medio
Despensa de Don Juan El Palmar	Del Monte	Melocotones en rodajas	11-08-2015	Placa vertida	Crecimiento de colonias aisladas de color moradoso con un centro más oscuro, casi negro, sin presencia de color verde metálico
Despensa de Don Juan El Palmar	Sabemas	Coctel de Frutas	31-08-2015	Placa vertida	Crecimiento de una sola colonia en forma de red, de color moradoso; no hay presencia de color verde metálico
Despensa de Don Juan El Palmar	Sabemas	Melocotones en mitades	31-08-2015	Placa vertida	Crecimiento de 10 colonias en forma de huevo estrellado, con un centro grande y notable, de color rosa opaco; no

					hay coloración verde metálica
Super Selectos Colón	Del Monte	Coctel de Frutas	26-08-2015	Placa vertida	Crecimiento de varias colonias pequeñas de color rosado oscuro, no hay presencia de color verde metálico.
Super Selectos Colón	Del Monte	Melocotones en cuartos	20-07-2015	Placa vertida	Crecimiento de unas cuantas colonias pequeñas y aisladas de color oscuro casi negro; sin color verde metálico.
Super Selectos Colón	Dany	Coctel de Frutas	20-03-2017	Placa vertida	No hubo crecimiento bacteriano en esta muestra
Super Selectos Colón	Dany	Melocotones en mitades	20-03-2017	Placa vertida	No hubo crecimiento bacteriano en esta muestra.
Despensa Familiar Colón	Sabemas	Coctel de Frutas	31-08-2015	Placa vertida	Crecimiento de colonias grandes con un centro muy notorio (forma de huevo estrellado) de color moradoso oscuro; otras colonias pequeñas de color rosado oscuro; sin presencia de color verde metálico
Despensa Familiar Colón	Sabemas	Melocotones en mitades	31-08-2015	Placa vertida	Crecimiento de un gran número de colonias pequeñas aisladas, algunas de color oscuro casi negro y otras de color morado oscuro; no hay coloración verde metálico.
Despensa Familiar Colón	Del Monte	Coctel de frutas	26-08-2015	Placa vertida	Crecimiento de colonias de color moradoso oscuro, un tanto aisladas, forma redonda, sin coloración verde metálico.
Despensa Familiar Colón	Del Monte	Melocotones en cuartos	20-07-2015	Placa vertida	Crecimiento de colonias un tanto aisladas de color moradoso, sin notarse la coloración verde metálico.

5.3.2 prueba para coliformes fecales en Agar MacCONKEY.

Tabla 4: muestra el crecimiento de colonias bacterianas positivo en algunas de las muestras, lo cual indica la presencia de coliformes en estas, pero no confirma que estas sean coliformes fecales ni presuntos *E. coli*.

MUESTRA	MARCA	VARIEDAD	FECHA DE VENCIMIENTO	PRUEBA	RESULTADOS (microorganismos)
Despensa de Don Juan El Palmar	Del Monte	Coctel de Frutas	15-08-2014	Placa vertida	Crecimiento de una sola colonia pequeñita, de color rosado fuerte (fucsia); muy parecidas a colonias típicas de enterococos o estafilococos.
Despensa de Don Juan El Palmar	Del Monte	Melocotones en rodajas	11-08-2015	Placa vertida	Crecimiento de colonias de color fucsia fuerte y colonias de color rosado pálido, un tanto grandes y con apariencia mucosa.
Despensa de Don Juan El Palmar	Sabemas	Coctel de Frutas	31-08-2015	Placa vertida	No se observo crecimiento bacteriano de ningún tipo en esta muestra.
Despensa de Don Juan El Palmar	Sabemas	Melocotones en mitades	31-08-2015	Placa vertida	No se observo crecimiento bacteriano de ningún tipo en esta muestra.
Super Selectos Colón	Del Monte	Coctel de Frutas	26-08-2015	Placa vertida	No se observo crecimiento bacteriano de ningún tipo en esta muestra.
Super Selectos Colón	Del Monte	Melocotones en cuartos	20-07-2015	Placa vertida	No se observo crecimiento bacteriano de ningún tipo en esta muestra.
Super Selectos Colón	Dany	Coctel de Frutas	20-03-2017	Placa vertida	No se observo crecimiento bacteriano de ningún tipo en esta muestra.
Super Selectos Colón	Dany	Melocotones en mitades	20-03-2017	Placa vertida	No se observo crecimiento bacteriano de ningún tipo en esta muestra.
Despensa Familiar Colón	Sabemas	Coctel de Frutas	31-08-2015	Placa vertida	Crecimiento de colonias considerablemente grandes de color rosado, abultadas y de

					aparición cerosa o mucosa, además de una gran cantidad de colonias pequeñas de color fucsia.
Despensa Familiar Colón	Sabemas	Melocotones en mitades	31-08-2015	Placa vertida	No se observó crecimiento bacteriano de ningún tipo en esta muestra.
Despensa Familiar Colón	Del Monte	Coctel de frutas	26-08-2015	Placa vertida	No se observó crecimiento bacteriano de ningún tipo en esta muestra.
Despensa Familiar Colón	Del Monte	Melocotones en cuartos	20-07-2015	Placa vertida	No se observó crecimiento bacteriano de ningún tipo en esta muestra.

5.3.3 Prueba para *Clostridium botulinum*.

Prueba en medio Tioglicolato (para crecimiento de bacterias anaeróbicas estrictas y facultativas).

Tabla 5: muestra el crecimiento de colonias bacterianas en este medio selectivo tanto para bacterias anaeróbicas como aeróbicas, lo cual presume la presencia de organismos de este tipo de vida, pero no confirma que las colonias bacterianas presentes sean de *C. botulinum*, ya que podría ser cualquier otra especie anaeróbica.

MUESTRA	MARCA	VARIEDAD	FECHA DE VENCIMIENTO	PRUEBA	RESULTADOS (microorganismos)
Despensa de Don Juan El Palmar	Del Monte	Coctel de Frutas	15-08-2014	Placa vertida (endoagar)	Crecimiento de 4 colonias redondas, de color blanco, brillantes, abultadas y con el centro hundido.
Despensa de Don Juan El Palmar	Del Monte	Melocotones en rodajas	11-08-2015	Placa vertida (endoagar)	Crecimiento de algunas colonias de color blanco brillante, abultadas, con un centro poco notable,

					redondas y en algunas se observa el crecimiento de otra colonia pequeña que ha crecido pegada a la grande.
Despensa de Don Juan El Palmar	Sabemas	Coctel de Frutas	31-08-2015	Placa vertida (endoagar)	Crecimiento exagerado de colonias en todo el medio, como una especie de halo turbio blanquecino y opaco, con apariencia algodonosa.
Despensa de Don Juan El Palmar	Sabemas	Melocotones en mitades	31-08-2015	Placa vertida (endoagar)	Crecimiento excesivo de pequeñas colonias amontonadas, que dan la apariencia de ser una sola, redondas de color blanquecino y apariencia grasosa.
Super Selectos Colón	Del Monte	Coctel de Frutas	26-08-2015	Placa vertida (endoagar)	Crecimiento de pocas colonias grandes de color blanco, abultadas y de apariencia cerosa, además de unas pocas colonias pequeñas en forma de arañitas como colonias típicas de <i>Bacillus cereus</i> .
Super Selectos Colón	Del Monte	Melocotones en cuartos	20-07-2015	Placa vertida (endoagar)	Se observa un gran crecimiento de colonias pequeñas blanquecinas con un centro grande más oscuro.
Super Selectos Colón	Dany	Coctel de Frutas	20-03-2017	Placa vertida (endoagar)	Se observa un exagerado crecimiento de colonias bacterianas que cubren todo el medio, de color blanco y redondas.
Super Selectos Colón	Dany	Melocotones en mitades	20-03-2017	Placa vertida (endoagar)	Crecimiento de colonias de tamaño mediano, de color blanco, poco

					abultadas y apariencia aceitosa, además de colonias pequeñas de color blanco y pegadas al medio
Despensa Familiar Colón	Sabemas	Coctel de Frutas	31-08-2015	Placa vertida (endoagar)	Crecimiento de pocas colonias grandes de color blanco, abultadas y de apariencia cerosa, además de unas pocas colonias pequeñas en forma de arañitas.
Despensa Familiar Colón	Sabemas	Melocotones en mitades	31-08-2015	Placa vertida (endoagar)	Crecimiento de pequeñas colonias redondas de color blanco, abultadas y apariencia cerosa; además del crecimiento de colonias pequeñísimas, blancas, como pequitas en el medio.
Despensa Familiar Colón	Del Monte	Coctel de frutas	26-08-2015	Placa vertida (endoagar)	Crecimiento de 4 colonias grandes, abultadas y con apariencia cerosa; además se notan unas pequeñas colonias de color blanco por debajo del medio.
Despensa Familiar Colón	Del Monte	Melocotones en cuartos	20-07-2015	Placa vertida (endoagar)	Crecimiento proliferado de colonias pequeñas, redondas, de color blanco, abultadas y apariencia grasosa.

5.4 Pruebas confirmatorias.

5.4.1 Método del Número más Probable (MNP).

Prueba en caldo BRILA con campanita de Durham para enterobacterias.

Tabla 6: muestra el crecimiento negativo de bacterias en caldo BRILA, es decir confirma que las colonias que crecieron en medios presuntivos eran coliformes, pero no coliformes fecales ni *Escherichia coli*, lo cual demuestra que no hay indicios de contaminación fecal en ninguna de las muestras analizadas.

MUESTRA	MARCA	VARIEDAD	FECHA DE VENCIMIENTO	PRUEBA	RESULTADOS (microorganismos)
Despensa de Don Juan El Palmar	Del Monte	Coctel de Frutas	15-08-2014	MNP	No se observa formación de gas ni turbidez en ninguno de los tres tubos; es decir no hubo ningún tubo positivo.
Despensa de Don Juan El Palmar	Del Monte	Melocotones en rodajas	11-08-2015	MNP	No se observa formación de gas ni turbidez en ninguno de los tres tubos; es decir no hubo ningún tubo positivo.
Despensa de Don Juan El Palmar	Sabemas	Coctel de Frutas	31-08-2015	MNP	No se observa formación de gas ni turbidez en ninguno de los tres tubos; es decir no hubo ningún tubo positivo.
Despensa de Don Juan El Palmar	Sabemas	Melocotones en mitades	31-08-2015	MNP	No se observa formación de gas ni turbidez en ninguno de los tres tubos; es decir no hubo ningún tubo positivo.
Super Selectos Colón	Del Monte	Coctel de Frutas	26-08-2015	MNP	No se observa formación de gas ni turbidez en ninguno de los tres tubos; es decir no hubo ningún tubo positivo.
Super Selectos Colón	Del Monte	Melocotones en cuartos	20-07-2015	MNP	No se observa formación de gas ni turbidez en ninguno de los tres tubos; es

					decir no hubo ningún tubo positivo.
Super Selectos Colón	Dany	Coctel de Frutas	20-03-2017	MNP	No se observa formación de gas ni turbidez en ninguno de los tres tubos; es decir no hubo ningún tubo positivo.
Super Selectos Colón	Dany	Melocotones en mitades	20-03-2017	MNP	No se observa formación de gas ni turbidez en ninguno de los tres tubos; es decir no hubo ningún tubo positivo.
Despensa Familiar Colón	Sabemas	Coctel de Frutas	31-08-2015	MNP	No se observa formación de gas ni turbidez en ninguno de los tres tubos; es decir no hubo ningún tubo positivo.
Despensa Familiar Colón	Sabemas	Melocotones en mitades	31-08-2015	MNP	No se observa formación de gas ni turbidez en ninguno de los tres tubos; es decir no hubo ningún tubo positivo.
Despensa Familiar Colón	Del Monte	Coctel de frutas	26-08-2015	MNP	No se observa formación de gas ni turbidez en ninguno de los tres tubos; es decir no hubo ningún tubo positivo.
Despensa Familiar Colón	Del Monte	Melocotones en cuartos	20-07-2015	MNP	No se observa formación de gas ni turbidez en ninguno de los tres tubos; es decir no hubo ningún tubo positivo.

Debido que en la prueba del Método del Número más Probable no se dieron resultados positivos, los cuales confirmaran la presencia de *Escherichia coli* y así mismo contaminación fecal en los productos; se hizo una prueba comparativa para asegurar mejor los resultados.

Muestra: agua del servicio.

Colecta: baños de la Facultad Multidisciplinaria de Occidente.

Prueba: MNP (caldo BRILA).

Luego de 24 horas de incubación se observa una gran formación de gas en la campana Durham y mucha turbidez en el todo medio de cultivo.



Figura 3: muestra agua del servicio.



Figura 4: muestra coctel de fruta.

5.4.2 Prueba con tinción de Gram.

5.4.2.1 colonias cultivadas en Agar EMB.

Tabla 7: muestra la presencia de bacilos gram positivos en la mayoría de las muestras, algunos con endosporas y otros sin esta, lo cual confirma la presencia de *Bacillus subtilis* y además *Bacillus megaterium*.

MUESTRA	MARCA	VARIEDAD	FECHA DE VENCIMIENTO	PRUEBA	RESULTADOS (microorganismos)
Despensa de Don Juan El Palmar	Del Monte	Coctel de Frutas	15-08-2014	Tinción de Gram	Bacilos, algunos separados y otros en cadenas cortas, gram positivos; típicos de <i>Bacillus cereus</i> .
Despensa de Don Juan El Palmar	Del Monte	Melocotones en rodajas	11-08-2015	Tinción de Gram	Bacilos de color rosado a morado, gram positivos; además se observan

					unas células alargadas un tanto más redondeadas y de color gris.
Despensa de Don Juan El Palmar	Sabemas	Coctel de Frutas	31-08-2015	Tinción de Gram	Bacilos gram positivos
Despensa de Don Juan El Palmar	Sabemas	Melocotones en mitades	31-08-2015	Tinción de Gram	Bacilos de color rosado (gram negativo) con una agrupación muy singular, formando círculos
Super Selectos Colón	Del Monte	Coctel de Frutas	26-08-2015	Tinción de Gram	Bacilos gram positivos, muy parecido a <i>Bacillus subtilis</i> , pero se trata de otra especie conocida como <i>Bacillus megaterium</i> .
Super Selectos Colón	Del Monte	Melocotones en cuartos	20-07-2015	Tinción de Gram	Bacilos gram positivos, típicos de <i>Bacillus cereus</i> .
Super Selectos Colón	Dany	Coctel de Frutas	20-03-2017	Tinción de Gram	Bastones cortos gram positivos, presentan endosporas muy notorias, típico de <i>Bacillus cereus</i> .
Super Selectos Colón	Dany	Melocotones en mitades	20-03-2017	Tinción de Gram	Bastones alargados gram positivos con endosporas, típico de <i>Bacillus cereus</i>
Despensa Familiar Colón	Sabemas	Coctel de Frutas	31-08-2015	Tinción de Gram	Bastones cortos gram positivos, con endosporas muy notorias.
Despensa Familiar Colón	Sabemas	Melocotones en mitades	31-08-2015	Tinción de Gram	Bacilos de color rosa (gram negativo), además de círculos como aparentes cocos de color morado intenso (gram positivo) que realmente son bacilos muy amontonados.
Despensa Familiar Colón	Del Monte	Coctel de frutas	26-08-2015	Tinción de Gram	Bacilos gram positivos, observados de una preparación hecha

					de una colonia típica de <i>Bacillus cereus</i> .
Despensa Familiar Colón	Del Monte	Melocotones en cuartos	20-07-2015	Tinción de Gram	Bacilos gram positivos, algunos presentan endosporas.

Bacillus cereus: es un bacilo de tamaño grande que forma esporas, es un microorganismo ampliamente distribuido en la naturaleza y en los alimentos (Vázquez, 2009).

Es un microorganismo gram positivo en los cultivos jóvenes y a medida que envejece puede verse como gram variable o gram negativo. Es un bacilo formador de esporas responsable de intoxicaciones alimentarias, siendo su hábitat natural el suelo. *B. cereus* puede producir dos enterotoxinas: la toxina diarreica y la toxina emética².

Bacillus megaterium: es una bacteria principalmente aeróbica, formadora de esporas, Gram-positiva, que se encuentra en muy diversos hábitats. Las células a menudo se presentan en pares y cadenas, donde las células se unen entre sí por los polisacáridos de las paredes celulares³.

Además de ser una bacteria del suelo comunes y un endófitos, que se puede encontrar en varios alimentos.

5.4.2.2 colonias cultivadas en Agar MacCONKEY.

Cuadro 8: Muestra la presencia de bacilos gram negativos, en las placas cultivadas, de las muestras en donde hubo crecimiento de colonias bacterianas. Por la coloración, forma y apariencia de las colonias de donde se hizo las preparaciones, se puede confirmar la presencia de *Klebsiella* en las muestras.

² Véase: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/cereus.pdf>.

³ Véase: <http://lasaludfamiliar.com/caja-de-cerebro/conocimiento-1405.html>.

MUESTRA	MARCA	VARIEDAD	FECHA DE VENCIMIENTO	PRUEBA	RESULTADOS (microorganismos)
Despensa de Don Juan El Palmar	Del Monte	Coctel de Frutas	15-08-2014	Tinción de Gram	Bacilos gram negativos. Se asemejan mucho a organismos del genero Klebsiella, los cuales crecen fácilmente en Agar MacCONKEY.
Despensa de Don Juan El Palmar	Del Monte	Melocotones en rodajas	11-08-2015	Tinción de Gram	Bacilos no muy alargados, gram negativos, sin espora, parecidos a <i>Klebsiella</i> .
Despensa de Don Juan El Palmar	Sabemas	Coctel de Frutas	31-08-2015	Tinción de Gram	No se observo ningún tipo de crecimiento bacteriano en todo el medio, por lo que no se hicieron preparaciones
Despensa de Don Juan El Palmar	Sabemas	Melocotones en mitades	31-08-2015	Tinción de Gram	No se observo ningún tipo de crecimiento bacteriano en todo el medio, por lo que no se hicieron preparaciones
Super Selectos Colón	Del Monte	Coctel de Frutas	26-08-2015	Tinción de Gram	No se observo ningún tipo de crecimiento bacteriano en todo el medio, por lo que no se hicieron preparaciones
Super Selectos Colón	Del Monte	Melocotones en cuartos	20-07-2015	Tinción de Gram	No se observo ningún tipo de crecimiento bacteriano en todo el medio, por lo que no se hicieron preparaciones
Super Selectos Colón	Dany	Coctel de Frutas	20-03-2017	Tinción de Gram	No se observo ningún tipo de crecimiento bacteriano en todo el medio, por lo que no se hicieron preparaciones
Super Selectos	Dany	Melocotones en mitades	20-03-2017	Tinción de Gram	No se observo ningún tipo de

Colón					crecimiento bacteriano en todo el medio, por lo que no se hicieron preparaciones
Despensa Familiar Colón	Sabemas	Coctel de Frutas	31-08-2015	Tinción de Gram	Bacilos gram negativos, observados en preparación hecha de una colonia rosada mucosa, típica para <i>Klebsiella</i> en este medio.
Despensa Familiar Colón	Sabemas	Melocotones en mitades	31-08-2015	Tinción de Gram	No se observo ningún tipo de crecimiento bacteriano en todo el medio, por lo que no se hicieron preparaciones
Despensa Familiar Colón	Del Monte	Coctel de frutas	26-08-2015	Tinción de Gram	No se observo ningún tipo de crecimiento bacteriano en todo el medio, por lo que no se hicieron preparaciones
Despensa Familiar Colón	Del Monte	Melocotones en cuartos	20-07-2015	Tinción de Gram	No se observo ningún tipo de crecimiento bacteriano en todo el medio, por lo que no se hicieron preparaciones

Los microorganismos del género *Klebsiella* son bacilos gram negativos inmóviles que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*.

Klebsiella spp. Está presente de forma natural en muchos ambientes acuáticos y pueden multiplicarse y alcanzar concentraciones elevadas en aguas ricas en nutrientes.

Klebsiella es un microorganismo coliformes y puede ser detectado por los análisis tradicionales de coliformes totales⁴.

5.4.3 Prueba para *Clostridium botulinum*.

Para esta prueba se realizaron preparaciones permanentes con coloración de gram, para identificar que tipos de bacterias crecieron en el medio, ya que este es un medio para anaerobios estrictos y facultativos (ver anexo 4).

Al realizar las preparaciones solo se observaron bacilos con endosporas típicos de *Bacillus cereus*, por lo que se concluyo que las colonias que crecieron pudieron ser anaerobios facultativos y no estrictos, demostrándose así la ausencia de *Clostridium botulinum*.



Figura 5: *Bacillus cereus*

(Endoespora elíptica)



figura 6: *Clostridium botulinum*

(Endoespora terminal)

⁴ Véase: http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Klebsiella.pdf.

Tabla 9: muestra el crecimiento de bacterias en los distintos medios en los que se hicieron las pruebas.

Microorganismo	EMB	MacConkey	Caldo BRILA	Tioglicolato	Tinción de Gram
<i>Bacillus cereus</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	Gram -
<i>Bacillus megaterium</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	Gram -
<i>Klebsiella</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	Gram -
<i>Clostridium botulinum</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	—
<i>Escherichia coli</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	—

En esta tabla pueden notarse los resultados obtenidos en la investigación, es decir, las especies bacterianas encontradas en las muestras tomadas de frutas enlatadas en almíbar, de las cuales fue *Bacillus cereus* la especie más común presente en la mayoría de las muestras.

6. DISCUSIÓN

6.1 Determinación de bacterias.

Según el estudio para determinar la presencia de bacterias en frutas enlatadas en almíbar, se logro observar que, si existen algunos tipos de bacterias en este producto alimenticio, a pesar de los diversos tratamientos y controles sanitarios que puedan realizárseles.

De acuerdo con Microbiología general (2007-2008), En los alimentos existe una gran diversidad de microorganismos. En general, el número y tipo de microorganismos presentes en un producto alimenticio terminado están influenciados por:

- El medio ambiente general del cual fue obtenido el alimento.
- La calidad microbiológica del alimento en su estado fresco o antes de ser tratado.
- Las condiciones higiénicas bajo las cuales el alimento fue manipulado y tratado.
- La adecuación de las posteriores condiciones de envasado, manipulación y almacenamiento para mantener la microbiota a un bajo nivel.

Las distintas especies de bacteria pueden estar presentes o no, en un determinado tipo de alimento, debido a la naturaleza de este. En este caso los tipos de bacterias más comunes encontradas fueron bacilos como: *Bacillus cereus*, esto se debe, a que según Vásquez (2009), es un microorganismo ampliamente distribuido en la naturaleza y en los alimentos; y *Bacillus megaterium*, que fue encontrado en una sola muestra.

Al parecer, las frutas enlatadas en almíbar son un ambiente propicio para la proliferación de *Bacillus cereus*, por ser un alimento en agua, además de ser un alimento potencialmente peligroso para generar una intoxicación alimentaria. Se

afirma⁵ que la resistencia térmica de esporas de *B. cereus* en un medio con elevado contenido de agua vuelve a este microorganismo un potencial peligro para el desarrollo de una intoxicación, si las medidas higiénico sanitarias y de elaboración no son las adecuadas.

Existen otros factores que pueden permitir que este producto sea un potencial peligro para la salud humana, ya que se ha comprobado que en condiciones apropiadas *B. cereus* puede llegar a adoptar características toxigenicas muy similares a las de *Bacillus anthracis*, que es una bacteria letal, esto debido a que su plasmidio se puede replicar y transmitir sus características a otras bacteria tales como la antes mencionada que es susceptible a sufrir esta mutación (Houston Methodist, 2011).

Todos estos son factores que claramente afectan en gran manera la calidad sanitaria de las frutas enlatadas en almíbar como: cocteles de fruta y melocotones.

6.2 Recuento de colonias en placa.

De acuerdo con este estudio, se ha logrado encontrar una concentración bacteriana que se encuentra presente en los productos; aunque inofensiva para la salud humana, debido a que aparentemente no afecta en gran manera a la calidad de este, ya que se requieren de altos números de bacterias (10^5 bact gr⁻¹) para ser considerado no apto para el consumo humano (microbiología general 2007-2008).

Al mismo tiempo se considera que no cumple con los estándares de higiene sanitaria establecida para alimentos enlatados ya que no debe haber presencia de

⁵ Véase: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/cereus.pdf>.

ningún tipo de bacilo, puesto que estos son considerados productores de toxinas (NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-130-SSA1, 1995).

Según la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-130-SSA1 (1995), de alimentos envasados, entre los que se describen las frutas enlatadas en almíbar, en los criterios para microorganismos no patógenos la tolerancia que se acepta es: si el valor de referencia es 10^S no se aceptan más de 2 muestras de 10 que tengan entre 10^S y 10^{S+1} y ninguna que supere el nivel de 10^{S+2} . Lo cual no se logra cumplir para esta bacteria encontrada por considerarse potencialmente peligrosa debido a su género.

6.3 Pruebas presuntivas.

Para esta fase de la investigación se realizaron pruebas en dos diferentes medios de cultivo: Agar Eosina azul de metileno (EMB) y Agar MacConkey, para tener un área de crecimiento más amplia y más segura, ya que aun que ambos medios son selectivos para el crecimiento de enterobacterias, estas crecen en tonalidades diferentes en cada medio y así se asegura mejor la presencia de algún microorganismo presente en los productos alimenticios, según Universidad Nacional del Nordeste (s.f.), EMB es un medio diferencial ya que nos permite saber por la coloración de las colonias si los microorganismos que crecen fermentan lactosa o sacarosa. Si las bacterias fermentan lactosa o sacarosa, acidifican el medio y la eosina vira dando lugar a la aparición de colonias oscuras, de color rosado a verde brillante y las bacterias que no fermentan ni lactosa ni sacarosa originan colonias claras o transparentes.

Por otra parte, de acuerdo con los componentes de MacConkey, Merck (1982), afirma que las colonias lactosa-negativas son incoloras y las lactosa-positivas son rojas con un halo turbio debido al descenso de pH provocado por los ácidos biliares.

Así mismo, se obtuvieron los siguientes datos **EMB**. De acuerdo con las preparaciones que se hicieron para observar las colonias bacterianas; se encontró que *Bacillus cereus* es la bacteria más frecuente en frutas enlatadas en almíbar, especialmente en la variedad: coctel de frutas, esto se debe a que según Vásquez (2009), es un microorganismo ampliamente distribuido en la naturaleza y en los alimentos. Este es un bacilo formador de endosporas que puede ser factor de intoxicación alimentaria; *B. cereus* puede producir dos enterotoxinas: la toxina diarreica y la toxina emética. Los síntomas de la toxiinfección tienen dos formas de presentación con presencia de diarrea, dolores abdominales y vómitos. Su período de incubación varía de 4 a 16 horas luego de la ingesta del alimento contaminado⁶.

A pesar que esta bacteria no fue encontrada en concentraciones excesiva (6×10^{-5}), esta debe considerarse como bacteria que afecta la calidad del producto ya que según algunas normas de envasado no debería haber presencia de ningún microorganismo más de lo establecido para ese producto:

- **Especificaciones para productos esterilizados comercialmente**

Mesofilicos anaerobios (negativo)

Mesofilicos aerobios (negativo)

Mohos y levaduras variables (negativo)

- **Especificaciones de aditivos para frutas en almíbar, con algunas restricciones.**

Acido cítrico

Acido tartárico

Carbonato de potasio

Citrato de sodio

Lactato de calcio

⁶ Véase: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/cereus.pdf>.

Lactato de sodio
Tartrato (L+) de potasio
Tartrato (L+) de sodio
Tartrato (L+) de potasio y sodio
Acido ascórbico y sus sales de sodio y calcio
Monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos
Aroma o sabor a canela
Aroma o sabor a menta
Aromas o saboradores naturales, aromas o saboradores idénticos a los naturales
Extracto de vainilla y vainillina
Benzoato de sodio
Dióxido de azufre
Metil parabeno
(NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-130-SSA1, 1995).

Es por ello, que no debería de existir la presencia de ningún microorganismo patógeno ó no patógeno, toxigenico ó no toxigenico e incluso nocivo para la salud humana.

MacConkey. Para los cultivos hechos en este medio solo se vio resultados en tres de las doce muestras estudiadas; de estas tres muestra que resultaron con crecimiento bacteriano positivo se tuvo que, de la observación de colonias y clasificación por coloración y tipo de colonia, la bacteria que se identifico fue únicamente *Klebsiella spp.* (en las tres cajas de petri con crecimiento de colonias), la cual es un indicador de contaminación por malas prácticas de higiene en el envasado, por tratarse de una enterobacteria; además que el producto aparentemente genera las condiciones propicias para su proliferación o supervivencia, ya que los microorganismos del género *Klebsiella* son bacilos gramnegativos inmóviles que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, están

presentes de forma natural en muchos ambientes acuáticos y pueden multiplicarse y alcanzar concentraciones elevadas en aguas ricas en nutrientes⁷.

De acuerdo con la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-130-SSA1 (1995), el agua que se utilice para la elaboración, preparación o el envasado en sí, debe de ser de buena calidad para que al mismo tiempo el producto sea considerado de buena calidad y sin microorganismos que puedan afectar a la misma; por lo que la presencia de esta bacteria en las muestras indica lo contrario puesto que estos microorganismos pueden proliferar en sistemas de distribución de agua, y se sabe que colonizan las arandelas de los grifos. También son excretados en las heces de muchas personas y animales sanos, y se detectan con facilidad en aguas contaminadas por aguas residuales.

A pesar de su presencia en las frutas enlatadas en almíbar como factor de mala calidad del producto, esta especie de bacteria no genera un riesgo mayor para salud humana ya que no se considera que la ingestión de agua de consumo sea una fuente de enfermedades del aparato digestivo por *Klebsiella* spp.

Tioglicolato. La familia *Bacillaceae* contiene una diversidad de bacterias formadoras de esporas incluyendo desde aerobios estrictos hasta anaerobios obligados, cocos y bacilos, tanto psicrófilos como termófilos. Es en este grupo es donde se ubica a *Bacillus cereus*, bacteria que creció en el medio y fue identificada en la observación de colonias al microscopio⁸.

Bacillus cereus presenta endoesporas, cualidad que lo identifica y que al mismo tiempo puede confundirlo con *Clostridium botulinum*, ya que según Andino y Castillo (2010), es una bacteria anaeróbica gram positiva, formadora de espora y que produce una potente neurotoxina. La diferencia notable es la forma de esa

⁷ Véase: http://www.bvsde.paho.org/cdgdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Klebsiella.pdf.

⁸ Véase: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/cereus.pdf>.

endospora en los dos, en *B. cereus* la espora es elipsoide central o subterminal, por otro lado, de acuerdo con Caballero (2008) *Cl. botulinum* es un bacilo muy robusto que llega a exhibir filamentos largos, nunca ramificados, es termorresistente, la espora que forma es subterminal y oval y deforma el cuerpo bacteriano.

La inhibición de *Cl. botulinum* se obtiene por la incorporación en los alimentos enlatados de conservadores químicos de tipo sorbato, especialmente en combinación con nitritos o polifosfatos. Aditivos químicos que según las normas de enlatado están presentes en las frutas en almíbar (Caballero, 2008).

6.4 Pruebas confirmatorias.

Método del Número más Probable (MNP), en caldo BRILA. *Escherichia coli*, son bacilos cortos, gram negativas. Pertenece a las Enterobacteráceas, lactosa-positivas, se encuentra en el tracto intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, produce gas a una temperatura de 44 a 44,5°C ± 0,2. (Andino & Castillo, 2010).

Dentro de las pruebas para coliformes totales, algún indicio de crecimiento bacteriano se toma como presuntos *E. coli*. El MNP, es un método de detección y numeración de una bacteria específica, es por ello que esta prueba fue realizada para asegurar o descartar la presencia o ausencia de *E. coli* en las muestras, ya que según Merck (1982) en este medio la fermentación de la lactosa con formación de gas, es un indicativo de la presencia de *E.coli*, se demuestra por tubitos de DURHAM; los restantes coliformes crecen también, pero sin producir gas, por regla general en este medio.

Por otro lado la presencia de *E. coli* demuestra la contaminación por heces fecales, lo que claramente le da una muy baja calidad al producto y se demuestra la mala práctica saludable de fabricación; de acuerdo con Andino y Castillo (2010),

los criterios microbiológicos que incluyen *E. coli* son de utilidad en casos en que se desea determinar contaminación fecal, ya que la contaminación de un alimento con esta bacteria implica el riesgo de que puedan encontrarse en el mismo, patógenos entéricos que constituyan un riesgo para la salud.

Para esta prueba por no obtenerse resultados de formación de gas en los tubos con las muestras sembradas, se realizó una prueba comparativa con agua del servicio, para demostrar cómo reacciona el medio en presencia de este microorganismo, el cual es causante de enfermedades por intoxicación alimentaria.

E. coli forma parte importante de la microbiota intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, sin embargo, algunas cepas han desarrollado capacidad para provocar enfermedad en el hombre, como son las infecciones gastrointestinales. Estas cepas patógenas representan la principal causa de diarrea infantil en el mundo (Caballero, 2010).

La capacidad de *E.coli* patógena para producir enfermedad está determinada por factores de virulencia que le permiten infectar a sus huéspedes y sobreponerse a los mecanismos de defensa, como la producción de adhesinas, enterotoxinas, citotoxinas y otras proteínas que le permiten sobrevivir en condiciones ambientales adversas (Caballero, 2010).

Tinción de Gram. para esta prueba confirmatoria se hicieron muestras permanentes de cada una de las colonias diferentes que crecieron en los medios cultivados con las muestras; de todas las coloraciones se observaron bacilos dentro de la forma bacteriana y entre estos solo se observaron con coloraciones típicas para gram negativo; solo fueron una pocas colonias bacterianas que se notaron con coloración para gram positivas, pero esto se debió a que *B. cereus* es un microorganismo gram positivo en los cultivos jóvenes y a medida que envejece puede verse como gram variable o gram negativo. *B. cereus* fue la bacteria más observada en todas las muestras puesto que esta es una bacteria muy común en

el ambiente y por tanto en alimentos⁹. Las demás bacterias encontradas como son *Bacillus megaterium* y *Klebsiella spp*, son también bacterias un tanto comunes que pueden estar presentes en alimentos y que si bien es cierto no causan daños cuervos a la salud humana, si son un factor de intoxicación alimentaria y de degradación de buena calidad del producto.

⁹ Véase: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/cereus.pdf>.

7. CONCLUSIONES

- *Bacillus cereus* fue la especie bacteriana más común encontrada en las diferentes muestras tomadas, especialmente en cocteles de fruta.
- *Klebsiella spp* fue la especie bacteriana encontrada y que demostró la presencia de *enterobacterias* en las muestras.
- *Bacillus megaterium* fue una especie bacteriana encontrada en unas pocas muestras, tanto de cocteles de frutas como de melocotones.
- Dentro de las diferentes formas bacterianas, la única encontrada en todas las muestras, fueron los bacilos.
- Las familias bacterianas presentes en las muestras fueron Bacillaceae y Enterobactereacea.
- De acuerdo con las normas de envasada hermético, la presencia de estas especies bacterianas, demuestra la deficiencia en la calidad del producto.
- La presencia de especies bacterianas en las muestras tomadas de frutas enlatadas en almíbar, implican un potencial riesgo de intoxicaciones de tipo alimenticias y un factor perjudicial para la salud humana.
- Los diferentes métodos de eliminación de microorganismos patógenos y los diferentes controles de calidad, pueden ser insuficientes para la eliminación total de estos, debido en parte a la naturaleza del alimento.
- La capacidad bacteriana de supervivencia a diferentes métodos de eliminación, pueden no eliminar totalmente algunas especies bacterianas que pueden ser un potencial factor de contaminación e intoxicación alimenticia.
- La capacidad de *Bacillus cereus* para adoptar características tóxicas de *Bacillus antracis*, se convierte en un potencial problema de intoxicación alimentaria y de peligro para la salud humana.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios más especializados para la especie bacteriana *Bacillus cereus* y la forma en que puede modificar las características del alimento.
- Mejorar las normas de calidad sanitaria de los alimentos enlatados.
- Realizar pruebas específicas para la especie bacteriana *Bacillus megaterium* y su relación con alimentos enlatados.
- No consumir el jarabe azucarado o almíbar en el que vienen preparadas las frutas enlatadas, para evitar algún tipo de intoxicación, ya que este es el medio propicio para el crecimiento de bacilos.
- Realizar estudios específicos para la relación que existe entre las familias bacterianas y el tipo de alimento en el que se encuentran.
- Poner más atención a los controles sanitarios de los productos alimenticios, envasados herméticamente, que se consumen con frecuencia.
- Evitar consumir productos enlatados después de su fecha de vencimiento o de un largo tiempo de haber sido abierto.
- Asegurarse que las condiciones de almacenamiento del producto sean las adecuadas, para tener una mejor idea de la calidad de lo que consume.
- No ingerir el jarabe azucarado o almíbar en el que vienen preparadas las frutas enlatadas, para evitar algún tipo de contaminación.
- Realizar pruebas especializadas para detectar las mutaciones genéticas que puede llegar a presentar *Bacillus cereus* y las condiciones en que puede convertirse en una especie bacteriana letal como *Bacillus anthracis*.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andino, F. & Castillo, Y. (2010). *Curso Microbiología de los alimentos: Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria*. Estelí, Chile: Universidad Nacional de Ingeniería UNI – Norte.

Caballero, A. (2008). *Temas de Higiene de los Alimentos*. La Habana: Ciencias Médicas.

Carpenter, P. (1969). *Microbiología*. México D.F.: Interamericana.

Desrosier, N. (1984). *Principios básicos de la conservación de los alimentos*. México: CECSA.

Hernández, R., Fernández, C., Baptista, P. (2006). *Metodología de la Investigación*. México D.F.: McGraw Hill.

Merck, E. (1982). *Manual de Medios de Cultivo MERCK*. Alemania: Darmstadt.

Nickerson, J. & Sinskey, A. (1972). *Microbiología de los alimentos y sus procesos de elaboración*. Zaragoza, España: Acriba.

Revistas y artículos virtuales.

Gimferrer, N. (Febrero, 2013). Seguridad alimentaria. *Sociedad y consumo*. Recuperado de <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2013/02/04/215614.php>.

Houston Methodist. (Agosto, 2011). *Cuando Ántrax no es Ántrax*. Recuperado de <http://www.newswise.com/articles/when-anthrax-isn-t-anthrax>.

Microbiología del enlatado. (s.f.). Recuperado de <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/4274/Capitulo1.pdf>.

Microbiología General. (2007-2008). *Microbiología de alimentos*. Recuperado de http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema_08_%20micro_alimentos.pdf.

NORMA Oficial Mexicana NOM-130-SSA1. (1995). Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometido a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Recuperado de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/130ssa15.html>.

Universidad Nacional del Nordeste. (s.f.). *Microbiología e Inmunología, Diagnóstico bacteriológico*. Recuperado de <http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/Clase%202%20%20Seminario.pdf>.

Vásquez, I. (marzo, 2009). *Contaminación alimentaria*. Recuperado de <http://contaminacionalimentaria.blogspot.com>.

Sitios web.

<http://lasaludfamiliar.com/caja-de-cerebro/conocimiento-1405.html>. *Bacillus megaterium*. 20.04.14, 11:00 pm.

www.bedri.es/Comer_y_beber/Conservas_caseras/Metodos_de_conservacion.htm. Métodos de conservación. 04.04.13, 10:30 am.

www.bvsops.org.uy/pdf/cereus.pdf. *Bacillus cereus*. 01.04.14, 9:00 pm.

www.bvsde.paho.org/cdgdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Klebsiella.pdf. *Klebsiella* spp. 01.05.14, 8:35 am.

ANEXOS

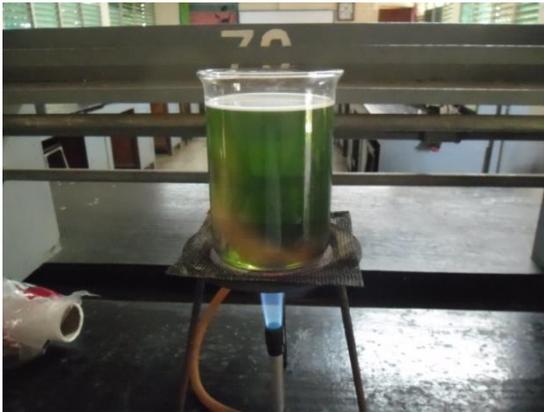
Anexo 1: preparación de los medios.



A. Pesado del medio.



B. Dilución del medio en agua.



C. Hervido para disolución.



D. esterilizado en autoclave.

Anexo 2: toma de las muestras.



A. Limpiado de la tapa con fenol.



B. Abertura de la lata.

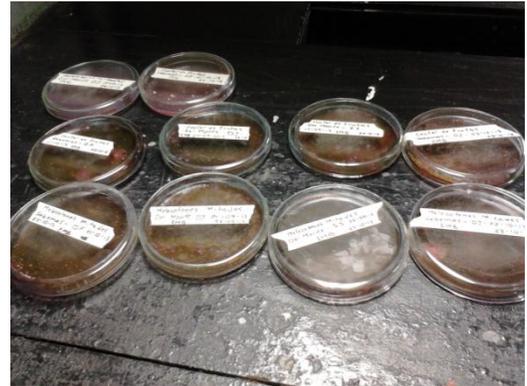


C. abertura de latas.

Anexo 3: crecimiento de muestras sembradas.



A. Siembra en tioglicolato.



B. Siembra en EMB y MacConkey.



C. Siembra en Caldo BRILA.

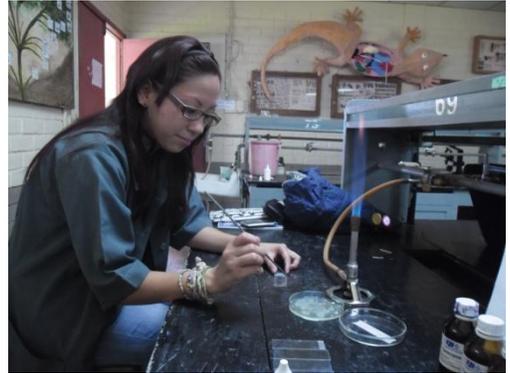


D. incubación de muestra sembrada.

Anexo 4: observación de las colonias.



A. Esterilizado de asa bacteriológica.



B. Toma de colonia para frotis.



C. Creación de frotis para tinción.



D. Observación de las muestras
En microscopio compuesto.

Anexo 5: materiales y equipo.



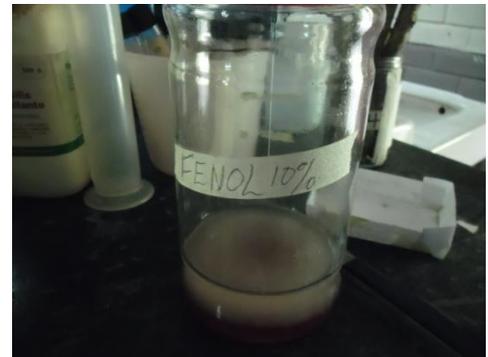
A. Autoclave.



B. Incubadora.



C. Reactivos para tinción de Gram.



D. Fenol para desinfección.



E. Cristalería estéril.



F. Balanza analítica.