

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Química.

**DETERMINACION DEL GRADO DE
CONTAMINACION DE HORTALIZAS DE
MAYOR CONSUMO EN LA CIUDAD DE
QUERÉTARO, CAUSADA POR
MICROORGANISMOS DE ORIGEN
FECAL.**

TESIS

Que para obtener el título de:

QUIMICO BIOLOGO.

Presenta:

MARTHA PATRICIA MALAGON CASTRO.

Querétaro, Qro.

Mayo 1988

J50392

163
36d



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Química.

**DETERMINACION DEL GRADO DE
CONTAMINACION DE HORTALIZAS DE
MAYOR CONSUMO EN LA CIUDAD DE
QUERÉTARO, CAUSADA POR
MICROORGANISMOS DE ORIGEN
FECAL.**

FACULTAD DE
QUÍMICA



TESIS

Que para obtener el título

BIBLOTECA

QUÍMICO BIÓLOGO.

Presenta:

MA. MARTHA PATRICIA MALAGON CASTRO.

PROPIEDAD DE LA FACULTAD
DE QUÍMICA DE LA U. A. Q.

Querétaro, Qro.

Mayo 1988

101 QFB

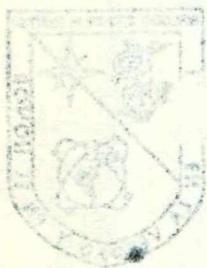
No. Adq. J50392

No. Titulo TS

Clas. 576.163

M236d

FACULTAD DE
QUÍMICA



BIBLIOTECA

PROPIEDAD DE LA FACULTAD
DE QUÍMICA DE LA U. N. T.

DETERMINACION DEL GRADO DE CONTAMINACION
DE HORTALIZAS DE MAYOR CONSUMO EN LA --
CIUDAD DE QUERETARO, CAUSADA POR MICRO--
ORGANISMOS DE ORIGEN FECAL.

RAUL:

Gracias por tu apoyo y confianza

A MIS HIJOS:

RAUL

ENRIQUE

A MIS PADRES:

Por su esfuerzo y apoyo durante mi
carrera, Gracias.

A MIS HERMANOS:

JESUS

JORGE

LUIS

LETICIA

ROCIO

MARIA DE LA LUZ

RAUL

ALBERTO

Al MC. Marco A. Pedro Vela Fuerte y
a la Maestra Ma. Concepción García
de Perez: por la ayuda desinteresada
que me brindaron para la realización
de este trabajo.

AL MAESTRO Q.F.B. CARLOS SIERRA
SALCEDO, POR LA AYUDA BRINDADA DURANTE -
MIS ESTUDIOS,

INDICE

	Página
<u>INTRODUCCION</u>	1
<u>REVISION DE LITERATURA</u>	3
1. Frutas y Verduras	3
2. Importancia de Varios Organismos de Origen Fecal en Alimentos y Agua Potable	7
2.1 Bacterias que indican contaminación	9
2.2 Demostración de los organismos de origen fecal	11
2.3 Patógenos intestinales y dispersión por el agua	12
2.4 Características requeridas para que un or- ganismo sea considerado como índice de con- taminación fecal	14
3. Organismos Entéricos Indicadores	17
3.1 Bacterias coliformes como indicadoras de la calidad higiénica de los alimentos	23
3.2 Crecimiento de coliformes	27
3.3 Distribución de coliformes	28
3.4 Estandards de coliformes para alimentos	29
4.0 Los Enterococos como Indicadores de las Condiciones Higiénicas de los Alimentos	30
4.1 Características y crecimiento de los en- terococos	33

	Página
4.2 Distribución de los enterococos en la naturaleza	36
4.3 Relación entre enterococos y calidad sanitaria de los alimentos	37
4.4 Estreptococos Faecalis	40
5. Preservación e Higiene de los Alimentos	42
5.1 Enfermedades causadas por Escherichia coli y Enterococos	43
<u>METODOLOGIA Y MATERIALES</u>	45
1. Localización del experimento	45
2. Diseño experimental	45
2.1 Muestreo	45
2.2 Análisis Microbiológico	46
3. Material y Equipo	46
3.1 Reactivos y medios de cultivo	47
3.2 Muestras	48
4. Metodología	48
4.1 Preparación y dilución de la muestra	48
4.2 Prueba Presuntiva	49
4.3 Prueba Confirmatoria	50
<u>RESULTADOS</u>	52
1. Resultados	52
<u>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</u>	57
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	60

INDICE DE CUADROS

	<u>Página</u>
TABLA No. 1 Relación de los grupos taxonómicos de Enterobacteriaceas según su presentación y detección en los alimentos	22
TABLA No. 2 Estreptococos del grupo D: Caracteres fisiológicos diferenciales seleccionados	34
TABLA No. 3 Comparación de enterococos y coliformes como indicadores de la calidad sanitaria	38

RESUMEN

Para la realización del presente trabajo se emplearon muestras de hortalizas de mayor consumo en la ciudad de Querétaro, como son: lechugas, zanahorias, calabacitas, rábanos y acelgas; obtenidas en diferentes mercados y tiendas de autoservicio de la ciudad.

Una vez adquirido el producto se procedió a realizar los análisis correspondientes y determinar así el grado de contaminación de origen fecal, existente en las diferentes muestras obtenidas al azar de los lugares de expendio.

Las muestras se analizaron por separado mediante métodos microbiológicos. Primeramente se procedió a pesar cierta cantidad de muestra tal y como se obtuvo, es decir, sin lavar y se hicieron las diluciones correspondientes. El análisis consistió en hacer dos pruebas, la Prueba Presuntiva cuyo objetivo es enriquecer cada tubo inoculado, y la Prueba Confirmatoria para comprobar la identidad de los microorganismos.

INTRODUCCION

Los productos vegetales están sometidos a contaminación microbiana de la tierra en que se cultivan, del aire, de insectos y de la manipulación humana. Los tejidos internos de los productos vegetales frescos por lo regular no contienen microorganismos. Las superficies vegetales son bastante impermeables y los microorganismos no penetran fácilmente los tejidos subyacentes, en donde se pueden multiplicar con rapidez, salvo que se rompa la superficie o los microorganismos sean "inoculados" por picadura de insectos.

Los tubérculos o raíces, por ejemplo, patatas, betabels y zanahorias están revestidos de microorganismos del suelo en que se cosechan, pero estas verduras tienen una cutícula prácticamente impenetrable. Las verduras cuyas hojas crecen a ras del suelo, por ejemplo, lechugas, espinacas y calabaza presentan posibilidad de contaminación intensa. Estos productos tienen una superficie más suave y son invadidos con más facilidad por los microorganismos. Las verduras y frutas que crecen a cierta distancia de la tierra son contaminadas por insectos o por microorganismos del aire, que son principalmente microorganismos de la tierra. Los insectos tienden a alimentarse del mismo tipo de planta y, en consecuencia, distribuyen microorganismos de una a otra y por ello tienen una flora uniforme.

Los microorganismos que se encuentran en los productos vegetales incluyen mohos, levaduras, bacilos esporógenos y no esporógenos y varios cocos. (5).

Los gérmenes causantes de enfermedades bien caracterizadas en las plantas son realmente patógenos, ya que son capaces de invadir tejidos perfectamente sanos para desarrollarse a sus expensas. Según envejecen los tejidos y se va perdiendo progresivamente la integridad de las membranas celulares, resulta más sencillo para los gérmenes introducirse y establecerse en los tejidos de los que extraen nutrientes que necesitan hasta que, al morir los citados tejidos, desaparece totalmente la resistencia a la invasión. La actividad de los gérmenes durante estas últimas etapas es saprofitica más que parasitaria y, aunque las diferencias de estructura y composición de los vegetales limitan la variedad de gérmenes que pueden desarrollarse sobre ellos, sin embargo pueden incluir los microorganismos que provocan la putrefacción, algunos de los cuales son menos específicos con arreglo al sustrato sobre el que actúan. (4)

REVISION DE LITERATURA

1. FRUTAS Y VERDURAS

Todos los alimentos vegetales frescos envejecen y pierden su aceptabilidad después que han sido separados de las plantas originarias. La causa inmediata más importante de alteración en frutas y verduras consiste en la actuación de los microorganismos. El ataque de los gérmenes puede realizarse en cualquier etapa, desde que la planta comienza a crecer en el campo o huerta hasta el período final de almacenamiento en los hogares. Cada cosecha puede experimentar durante su crecimiento la influencia nociva de gérmenes productores de enfermedades que suelen ser altamente específicas con respecto a las especies o variedades de plantas. Estas enfermedades, suelen alterar intensamente los productos vegetales antes de la época de la recolección.

Sin embargo, en algunas ocasiones la infección inicial puede tener lugar durante el crecimiento de los vegetales, permaneciendo los gérmenes inactivos en un principio y solamente se aprecian síntomas de enfermedad en etapas más avanzadas de madurez.

Las frutas y verduras están expuestas constantemente, durante todo su ciclo vital, a la acción de estos agentes microscópicos de la putrefacción. Solamente pueden establecerse conjetu-

ras sobre la magnitud total de las alteraciones que provocan, aunque sin lugar a dudas son enormes, y se crea el problema doble de mantener la infección en un mínimo y de reducir la actividad de -- los gérmenes potenciales de la putrefacción que alcanzan grandes proporciones durante el período de almacenamiento que sigue a la recolección.

El pH constituye un factor importante que determina los tipos de gérmenes que pueden desarrollarse sobre los tejidos de las frutas y verduras. El PH. de las verduras es alto, a excepción de algunas hortalizas como los tomates que poseen un pH bajo, los tejidos de las verduras más frecuentes poseen un pH cuyos valores oscilan entre 5.0 y 7.0.

El medio ambiente agrícola es sumamente rico en microorganismos. El suelo contiene una amplia gama de gérmenes, y la vegetación y las plantas muertas o en descomposición poseen una gama mucho más amplia. Las superficies externas de las plantas se contaminan fácilmente con una microflora rica y variada; los órganos -- subterráneos y los que descansan normalmente próximos o sobre la superficie del suelo presentan abundantes especies microbianas que tienen su asiento en el suelo, mientras que las frutas de los árboles se contaminan más fácilmente con esporas, procedentes de las infecciones que padecen las plantas que los rodean. Supuestas --

unas condiciones apropiadas para que estos gérmenes superficiales continúen desarrollándose pueden ser capaces o no de atravesar -- las capas superficiales que protegen a los órganos. La vía más -- corriente para que se introduzcan en el interior de las estructu- ras sanas es a través de orificios naturales como los estomas y -- las lenticelas, aunque algunas especies parecen ser capaces de -- atravesar directamente la cutícula, especialmente cuando esta -- última continúa siendo delgada por encontrarse en sus primeras -- etapas de desarrollo.

La exposición directa de los tejidos profundos, puestos al -- descubierto por cortes practicados durante la recolección o por -- lesiones mecánicas, facilita enormemente la entrada de los micro- organismos, incluso lesiones diminutas y difíciles de detectar -- producidas por arenillas constituyen una excelente vía para la in- troducción de los gérmenes. Las bacterias causantes de la putre- facción de las verduras (principalmente las especies de los géne- ros *Erwinia* y *Pseudomonas*) parecen introducirse frecuentemente a través de cortes y de heridas, aunque se han aislado algunas for- mas similares en tejidos internos de órganos intactos. No es ra- ro que en los tejidos vegetales sanos aparezcan bacterias móviles, en forma de baston, que pertenecen a las familias de las *Pseudomo- nodaceae* y *Enterobacteriaceae*. La presencia de estos gérmenes, cu- yo origen parece encontrarse en la microflora del suelo, no suele

ir asociada con la putrefacción, y parece estar claro que no todos los gérmenes capaces de introducirse en los tejidos de las frutas y verduras provocan necesariamente alteraciones, al menos mientras los tejidos que los hospedan permanecen en buenas condiciones fisiológicas.

A los géneros bacterianos *Erwinia* y *Pseudomonas*, pertenecen la mayoría de las bacterias que ocasionan putrefacciones en las verduras. La mayoría de las verduras son propensas a sufrir el ataque de estos gérmenes, aunque las mayores pérdidas parece ser que tienen lugar entre los miembros de la familia de las Umbelíferas, por ejemplo la zanahoria y el apio, que experimentan una putrefacción que suele achacarse a la acción de un germen llamado *Erwinia carotovora*.

A pesar de todas las precauciones que se tomen las superficies de las frutas y verduras contienen normalmente una abundante microflora, aunque los gérmenes que suelen aparecer consisten normalmente en bacterias, gérmenes lácticos y coliformes, micrococos y Acromobacteriáceas. Estos gérmenes son incapaces, por sí mismos, de iniciar la alteración de los tejidos sanos y por consiguiente no tiene una gran importancia su presencia en los productos frescos. Sin embargo pueden tener una transcendencia mucho mayor según sean los métodos de conservación. (4)

2. IMPORTANCIA DE VARIOS ORGANISMOS DE ORIGEN FECAL EN ALIMENTOS Y AGUA POTABLE.

Hace algún tiempo, la identificación de especies patógenas de las Enterobacteriaceae, especialmente Salmonella y Shigella, era muy laboriosa y compleja, por lo que se adopta en forma general el empleo de los llamados organismos indicadores siendo en sus -- inicios el único procedimiento posible para el análisis desde el punto de vista de higiene del agua potable y alimentos,

El organismo escogido primitivamente como índice en 1892 por Schardinger fué el Escherichia coli, ya que este microorganismo -- se encuentra generalmente en el tracto intestinal del hombre y de los animales. Se ha efectuado una gran cantidad de investigacio-- nes desde esa época, a fin de desarrollar métodos para la identi-- ficación de este microorganismo en alimentos y agua.

Antiguamente se daba mayor importancia a los microorganismos presentes en las heces humanas; hoy en día se sabe que las bacterias presentes en el tracto intestinal de los animales pueden ser cualitativa y cuantitativamente diferentes a las que se encuentran en el hombre, por ejemplo: E. coli se encuentra frecuentemente en el intestino del hombre pero rara vez en el del caballo de igual forma los estreptococos del grupo D no se presentan con igual abundancia en los intestinos de diferentes animales. Desde el punto --

de vista de higiene, cualquier contaminación fecal es igualmente peligrosa ya sea que provenga de animales domésticos, salvajes o del hombre. Los cerdos y los pájaros son portadores más frecuentes de Salmonella que el ser humano. (21)

De lo anterior se podría considerar, como microorganismo - indicador de contaminación fecal de alimentos y agua potable a cualquier microorganismo que se encontrara presente en cantidades considerables en el intestino del hombre o de los animales; sin embargo la aplicación de esta idea, que aparentemente es - válida, tiene las siguientes limitaciones:

1. No ha sido hasta muy recientemente que se ha prestado cuidadosa atención a la microbiología del contenido intestinal - de los animales no habiéndose obtenido datos respecto a la influencia de la raza, edad, dieta y otros factores ambientales, pero sí varían de un rebaño a otro, o de animal a -- animal. Parece que lo mismo sucede con el hombre.
2. Investigaciones recientes, indican que las bacterias con mayor incidencia en el intestino de hombres y animales, pertenecen a los géneros;

Bacteroides

Bifidibacterium

Lactobacillus

Debido a que los dos primeros géneros compenden microorganismos con baja resistencia a las condiciones extraentéricas y los miembros del último género son ubicuos. Todos ellos son de poco uso en la práctica. (21)

2.1. BACTERIAS QUE INDICAN CONTAMINACION

Los primeros investigadores, como Koch y otros, intentaron contar el número de bacterias en el agua para precisar la inocuidad. Sin embargo, se descubrió que la presencia de bacterias potencialmente patógenas era mucho más importante que el número de bacterias.

El examen de las evacuaciones intestinales humanas descubrió que había varias clases de bacterias con frecuencia, tres de estas, en la actualidad conocidas como *Escherichia coli*, -- *Streptococcus Faecales* y especies de *Clostridium*, se presentaban de manera invariable en las heces.

Por ejemplo: el sujeto promedio excreta al día 200 000 millones a 400 000 millones de células de *Escherichia coli*. En consecuencia observar estas bacterias en el suministro de agua comprueba contaminación con materias fecales, pues su hábitat normal es el intestino.

Por ello, *Escherichia coli* y formas muy afines, llamadas coliformes, se han elegido como índices adecuados de contaminación por aguas negras. Aunque persisten cierto tiempo en el agua, parecen no ser capaces de desarrollarse en la misma y por último mueren. Son más resistentes que los patógenos intestinales, en consecuencia, cuando ya no hay coliformes, cabe suponer que también hayan desaparecido los patógenos intestinales. (11).

El método ideal de analizar el agua respecto a la seguridad o sanidad bacteriológica incluye la búsqueda de patógenos transmitidos por el agua. El agua que contenga pocos patógenos por litro puede estar lo suficientemente contaminada para causar algunos casos de enfermedad.

Las especies patógenas en el agua contaminada con aguas negras muchas veces son ocultas por gran cantidad de bacterias intestinales normales inocuas y crecen fácilmente en los medios de cultivo corrientes de examen. El conocimiento de los microorganismos patógenos del agua o aguas negras, en consecuencia es prácticamente imposible. Pocas veces se ha logrado.

Se han empleado varios grupos de bacterias que aparecen normalmente en el intestino del hombre o los animales para indicar la contaminación del agua potable por aguas negras: los denominados estreptococos fecales, algunos anaerobios esporógenos y las bacte-

rias coliformes. Las bacterias coliformes son los indicadores de la contaminación más empleados, especialmente en Estados Unidos. (5)

2.2. DEMOSTRACION DE LOS ORGANISMOS DE ORIGEN FECAL

El agua se examina para investigar la presencia de bacterias de origen intestinal conocido. Ciertas bacterias, como *Escherichia coli*, *Streptococcus Faecalis* y *Clostridium Welchii* están presentes normalmente en el intestino humano y con frecuencia en el de otros animales, siendo, pues, unos indicadores útiles de contaminaciones actuales o recientes con organismos fecales. En Gran Bretaña se utiliza *E. coli* (*Bacterium coli* tipo fecal I) como cepa indicadora en las pruebas oficiales.

El grupo de bacterias coli-aerogenes se encuentra principalmente en la vegetación y en el suelo, pero la cepa indicadora de *E. coli* constituye una excepción, ya que, por cuanto hasta el presente se sabe, no se encuentra naturalmente en las aguas y su presencia es una prueba casi cierta de contaminación reciente. La demostración de este organismo, incluso en pequeño número, en el agua, es suficiente para proscribirla para el consumo humano, aunque no se halle en ella ningún germen patógeno (12)

Streptococcus Faecalis también se ha utilizado como índice de

contaminación con aguas negras, pero es menos adecuado que *Escherichia coli*.

La objeción para utilizar especies de *Clostridium* como indicadores estriba en que forman esporas, y estas sobreviven fácilmente al tratamiento del agua, de la índole de cloración. En consecuencia, observarlas no sería índice satisfactorio de contaminación fecal reciente. (11)

Los coliformes no identificados como *E. coli* pueden muy bien no indicar contaminación fecal y, por lo tanto, no implicar la posible presencia de gérmenes patógenos entéricos. Los coliformes más resistentes, tales como *Enterobacter*, pueden persistir por más tiempo en condiciones desfavorables que algunos patógenos entéricos (16).

2.3. PATOGENOS INTESTINALES Y DISPERSION POR EL AGUA.

Los organismos que causan infecciones intestinales son a menudo excretadas en gran número en la materia fecal y puede contaminar el alimento o el agua. Esta contaminación puede producirse por medio de moscas u otros insectos, a través de las manos, o por contaminación accidental de los suministros de agua o alimentos. Aunque los patógenos intestinales raramente se multiplican en el agua, a menudo

permanecen viables en ella durante largos períodos de tiempo. Uno de los factores más significativos en la reducción virtual de los patógenos transmitidos por vía acuática ha sido el desarrollo de métodos efectivos de purificación de los suministros de agua.

Debido a la casi universal presencia de *E. coli* en el tracto intestinal humano y a la facilidad con que puede identificarse y contarse este organismo en una muestra de agua, habitualmente se usa como un índice de la contaminación fecal del agua. La presencia de *E. coli* se determina por métodos normalizados basados en su capacidad para fermentar lactosa con producción de ácido y gas.

Cuando el agua percola a través del suelo, su población microbiana desciende gradualmente; por tanto la enumeración microbiana del agua de pozos profundos es considerablemente menor que la de agua superficiales. (2)

2.4 CARACTERISTICAS REQUERIDAS PARA QUE UN ORGANISMO SEA
CONSIDERADO COMO INDICE DE CONTAMINACION FECAL.

- a) Especificidad.- En forma ideal, la bacteria deberá estar presente únicamente en el intestino.
- b) Deberán estar presentes en la heces humanas en número considerable de tal forma, que aún en soluciones muy diluidas se localicen.
- c) Resistencia elevada al medio ambiente extraentérico, ya que es allí donde buscará su presencia.
- d) Identificables en forma fácil y precisa, aún cuando estén presentes en pequeñas cantidades.

Entre las bacterias que reúnen estas características, se encuentran las bacterias del grupo coli-aerógenas y específicamente E.coli, los Estreptococos fecales y Clostridia.

- a) Especificidad, Sensibilidad y Resistencia de:

E. coli

Estreptococos fecalis

Clostridia.

E. Coli: su especificidad es indudable, otros microorganismos del grupo coli-aerógenas, no son tan específicos. Por ejemplo; las especies de enterobacter se presentan rara vez en el intestino del hombre.

Estreptococos Grupo "D": estos microorganismos se encuentran - casi siempre en las heces humanas de los hombres y animales por lo que es imposible dejar de admitir su origen fecal, no obstante lo -- anterior, también se encuentran en otros lugares.

b) Presencia de grandes cantidades.- Los principales grupos que se - encuentran en las heces en escala descendente de frecuencia, se - pueden registrar en forma general de la siguiente manera:

Bifidibacterium
Ristella
Lactobacillus
Enterobacteriaceae
Estreptococos "D"
Clostridia

c) Respuesta al medio ambiente extraentérico.- Se considera éste el factor decisivo para considerar un microorganismo como índice de contaminación fecal.

La resistencia extraentérica dependerá de las condiciones que prevalecen en los alimentos y en el agua. La siguiente lista de microorganismos está dada de acuerdo con la forma en que aumenta su -- resistencia.

Ristella
Bifidibacterium
Lactobacillus

E. coli.

Enterobacter.

Klebsiella.

Estreptococos del Grupo D.

Clostridia.

Estos microorganismos se ven influenciados en alimentos por el tipo de sustancias minerales, orgánicas y nutrimentos en proporción de oligoelementos nutritivos; el pH, y la naturaleza de los ácidos orgánicos presentes, presión osmótica, potencial de oxidación-reducción y la capacidad de sostenerse en suspensión; presencia de factores antimicrobianos, temperatura de proceso y almacenamiento.

De lo anterior se debe concluir que E. coli, el microorganismo universalmente utilizado, no es tan resistente como los microorganismos patógenos de la familia Enterobacteriaceae y es mucho menos resistente que los virus.

A este respecto, los estreptococos del grupo D tienen un valor mayor como organismos indicadores.

d) Sencillez y precisión de la determinación, recuento e identificación.- Este cuarto factor puede decirse que pierde importancia conforme transcurren los años, debido a que continuamente se están desarrollando técnicas que no sólo reúnan las condiciones de sencillez y precisión, sino que sean económicas para la persona que las aplica rutinariamente. (21).

Es el llamado corrientemente "coli fecal" cuyo habitat natural es el tracto digestivo del hombre y de otros animales de sangre caliente. La presencia de este microorganismo en un alimento se interpreta generalmente como contaminación directa o indirecta de origen fecal. Por ello, E. coli es el indicador clásico de la presencia simultánea de bacterias patógenas entéricas, entre ellas Salmonella Typhi, otras Salmonellas, Shigelas, vibrios, entamoebas y virus entéricos. Es difícil y costoso determinar la presencia en los alimentos de la mayoría de estos agentes y por ello se hace preciso confiar en los organismo indicadores. Sin embargo, debe recalarse -- que la presencia de E. coli en un alimento no indica que existan también necesariamente gérmenes patógenos, sino simplemente advierte el riesgo de que pudieran estar presente.

Es común la determinación de gérmenes coliformes, -- que incluyen E. coli, en pruebas preliminares. Si de estas pruebas iniciales se deduce la posibilidad de contaminación fecal, los coliformes se someten a otros ensayos para determinar si entre ellos está presente E. coli.

En la tabla No. 1 se señalan los grupos taxonómicos de enterobacterias en relación con su presencia y detección en los alimentos. Los coliformes distintos a - - - -

E. coli persisten en el suelo o sobre las superficies (por ejemplo, de frutas, hortalizas, granos y otros productos del campo) mucho más tiempo que el propio E.coli. Algunas especies de Erwina, gérmenes muy semejantes a los coliformes fecales, producen enfermedades en los vegetales y no indican contaminación fecal.

Los gérmenes coliformes no indican necesariamente contaminación de origen fecal en el sentido de implicar un contacto inmediato con heces: o con una superficie contaminada con heces. Es más, los resultados de la determinación cuantitativa de gérmenes coliformes (incluido E. coli) en un alimento puede no guardar ninguna relación con la cuantía de la contaminación original. Esto ocurre cuando el alimento ha sido conservado o almacenado a temperaturas no adecuadas o durante un tiempo excesivo. No sucede lo mismo con las determinaciones cuantitativas en el agua, ya que en este caso el número de coliformes puede estar directamente relacionado con el grado de contaminación. La contaminación original casi siempre procederá de heces o aguas residuales. (16)

Comúnmente se encuentran tres tipos de microorganismos en el agua: bacilos, cocos y sarcinas. Estos también se encuentran en el suelo, en el intestino de los hervíboros, y en las aguas servidas. (20)

En los alimentos, E. coli es por lo general el indica
dor preferido para significar una contaminación de origen fecal
relativamente reciente o a partir de un substrato en el cual ha
tenido lugar la proliferación de E. coli (y de los gérmenes pató
genos con el asociados, si estaban presentes). Por lo que se re
fiere a la garantía del alimento, es decir al riesgo de que pue
dañ producir una enfermedad en el consumidor, la presencia de
E. coli es mucho más indicativa que la de otros coliformes.

En el intento de encontrar métodos seguros y rápidos
para poner de manifiesto la presencia en los alimentos de E.
coli o de variantes muy próximas, sin la necesidad de purifi
car los cultivos o de aplicar las pruebas IMVIC, relativamente
costosas, ha surgido un nuevo concepto; el de "coliformes fe-
cales".

Con esta denominación se designa a un grupo de orga-
nismos seleccionados por incubación del inóculo procedente de
un caldo de enriquecimiento de coliformes a temperaturas mayo-
res a las normales (44 a 45°C). Tales cultivos contienen por
lo general un alto porcentaje de E. coli tipos I y II y son,--
por ello, muy indicativos de una probable contaminación del ali-
mento de origen fecal.

Las conclusiones menos sujetas a controversia son --
las siguientes:

- a) E. coli es un buen indicador de contaminación fe-

cal en la mayoría de los alimentos.

- b) Los otros coliformes son buenos indicadores de una limpieza y desinfección no adecuadas o de una industrialización o tratamiento de los alimentos no correctos.

La presencia de niveles altos de coliformes en un alimento tratado o industrializado indica que pudieran haberse dado circunstancias favorecedoras de la multiplicación de microorganismos, y por tanto, también de salmonellas, shigelas, estafilococos y de otros agentes introducidos probablemente a consecuencia de la deficiente limpieza y desinfección.

- c) Los coliformes fecales tienen una probabilidad mayor de contener organismos de origen fecal y por ello son indicadores más seguros de contaminación fecal que los coliformes totales. (16)

TABLA No. 1 Relación de los grupos taxonómicos de Enterobacteriaceas según su presentación y detección en los alimentos.

Grupo	1	Tipos enteropatógenos: Salmonella Arizona Shigella Ciertos serotipos de Escherichia coli Ciertos serotipos de Providencia
Grupo	2	Posibles indicadores de contaminación fecal: Escherichia coli Proteus (de formas más restringidas biotipos ureasa positivos de Klebsiella y Enterobacter aerogenes)
Grupo	3	Bacterias del grupo Coli-aerogenes (que fermentan rápidamente la lactosa con formación de gas): Escherichia coli Citrobacter Enterobacter aerogenes. Klebsiella
Grupo	4	Bacterias no patógenas no detectadas por lo general en las pruebas para el grupo coli-aerogenes: Citrobacter Hafnia Ciertos biotipos de Escherichia Proteus

3.1 BACTERIAS COLIFORMES COMO INDICADORAS DE LA CALIDAD HIGIENICA DE LOS ALIMENTOS.

Schardinger fué el primero que en 1892 utilizó el *Escherichia coli* como indicador de organismos patógenos transmitidos por el agua. Un año después, Teobaldo Smith (1893) hace constar que, pues to que este organismo se encuentra presente de forma constante en el tracto intestinal, su presencia fuera del intestino puede considerarse debida a que ha existido contaminación con materia fecal del hombre o de los animales. El empleo de los coliformes como indicadores de organismos patógenos en el agua, es una práctica vigente en la actualidad.

E. Coli tiene su localización primaria en el tracto intestinal del hombre y de los animales, y de ahí su nombre coli, que deriva de colon. *E. coli* se encuentra normalmente en el tracto gastrointestinal de los animales, donde no suele causar enfermedad. Hanel (1961), a partir de sus estudios de la flora intestinal del hombre, ha determinado que el porcentaje de coliformes es inferior a 1. Este investigador encontró que es frecuente en las heces de individuos adultos cifras de organismos de 10^8-10^9 /gr. Aunque *A. aerogenes* puede encontrarse a veces en el tracto intestinal del hombre, este organismo se asocia en general con los vegetales. Griffin y Stuart (1940), en un estudio sobre 6.577 cepas de coliformes de diversas procedencias, afirman que la presencia de *E. coli* fuera del intestino y de *A. aerogenes* y coliformes intermedios en materiales no fecales, es accidental. Su empleo como indicadores de la calidad higiénica de los alimentos proviene de su satisfactoria

utilización en el agua. El hallazgo de gran número de estos organismos en los alimentos y en el agua indica polución o contaminación fecal. Ya que las enfermedades transmitidas por el agua generalmente son de carácter intestinal, la presencia de polución indica la posibilidad de que existan agentes etiológicos productores de estas enfermedades.

La presencia de materia fecal en los alimentos o en el agua no es admisible, tanto en el caso de que se encuentren presentes o no los patógenos intestinales. Mc Coy (1961) considera que la ausencia de organismos intestinales en el exámen de los alimentos indicará buenas condiciones de limpieza pero no de inocuidad; afirma que la inocuidad de los alimentos sólo puede ser garantizada por la investigación de los organismos patógenos.

Se consideran indicadores fecales, además de los coliformes, los siguientes grupos de bacterias: *Bifidobacterium* spp., *Ristella* spp., lactobacilos, Enterobacteriaceae, clostridios y estresptococos del grupo D. Las bifidobacterias se consideran específicas del tracto intestinal y, en general, se encuentran en elevado número. Para Haenel (1961), *Ristella* o *Bacteroides* spp., constituyen el segundo grupo de organismos en cuanto a su presencia en el tracto intestinal de personas adultas. Según este investigador, los lactobacilos anaeróbicos comprenden más del 50 por 100 de la flora intestinal humana -generalmente 10^9 - 10^{10} /g. de materia fecal-. La familia Enterobacteriaceae comprende, además de *Escherichia* y *Aerobacter* spp., los géneros *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Paracolobactrum* y otros comunes en el tracto intestinal. Buttiaux (1959) ha llamado la atención so -

bre los cambios de E. coli en el medio intestinal, ocasionados por el empleo de antibióticos. Ha encontrado que en el tracto intestinal humano, Klebsiella pasó de un 5.2% en 1947 a un - - 48.4% en 1956-57. Aunque la mayoría de las Enterobacteriaceae se encuentran en el tubo intestinal, ninguno de los demás géneros o grupos parecen ofrecer ventajas sobre E. coli como organismos indicadores. Aunque los estreptococos del grupo D también se encuentran fuera del tracto intestinal, han sido señalados por muchos investigadores como indicadores de más garantía que los coliformes para ciertos alimentos.

El índice de coliformes se propuso originalmente como prueba higiénica del agua, y más tarde se extendió su uso a la industria lechera. Peabody (1963) formuló las siguientes preguntas respecto al hecho de la extensión de este índice a otros alimentos:

- a) ¿Está justificado el paso de esta prueba, que ha sido de utilidad para el agua y productos lácteos, a otro tipo de alimentos?

- b) ¿Cuándo este grupo de organismos se encuentran en un producto alimenticio, es índice cierto de condiciones insalubres del mismo?
- c) ¿Indica peligro de bacterias patógenas?
- d) ¿Nuestros métodos actuales son capaces de detectar todos los organismos viables en la muestra de alimento?
- e) ¿Qué interferencias pueden existir entre los componentes selectivos e indicadores del medio y el material nutritivo que se le debe añadir, especialmente al emplear muestras con poblaciones bacterianas reducidas?
- f) ¿Cómo se puede aumentar la proporción de organismos detectados?

Aunque puede ser un poco arriesgado aplicar a otros los procedimientos propios de una clase de alimento y tratar de obtener los mismos resultados, el índice de coliformes ha sido muy utilizado para determinar la calidad higiénica de los alimentos, e incluso se han establecido standards de coliformes para ciertos alimentos y recomendado para bastantes otros. La principal diferencia entre el agua y los alimentos es que en la primera no crecen los microorganismos, mientras que en muchos alimentos sí lo hacen. (15)

3.2 CRECIMIENTO DE COLIFORMES.

Al igual que las bacterias gram negativas no patógenas, los coliformes crecen bien sobre muchos medios y alimentos. Se ha señalado que estos organismos crecen a -2°C y también a temperaturas próximas a 50°C . El crecimiento en los alimentos es pobre o muy lento a temperaturas de 50°C , aunque ciertos autores afirman que los coliformes crecen entre $3-6^{\circ}\text{C}$. Con respecto al pH se ha señalado que estos organismos crecen dentro de un amplio margen, con valores comprendidos entre 4.4-9.0. *E. coli* puede crecer en medios que contienen glucosa como única fuente de carbono orgánico, y $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ como fuente de nitrógeno, junto con otros minerales. Estos organismos crecen bien en agar nutritivo a 73°C , produciendo colonias visibles a las 24 horas. Por lo tanto se puede esperar su proliferación en gran número de alimentos que presenten condiciones adecuadas. Son capaces de crecer en presencia de sales biliares, que inhiben a las bacterias gram positivas. Este hecho se aprovecha para conseguir su aislamiento a partir de diversos materiales. A diferencia de la mayoría de las bacterias, fermentan la lactosa con producción de gas, y esta característica por sí sola es suficiente para efectuar determinaciones presuntivas de coliformes. La facilidad con que los coliformes pueden ser cultivados y diferenciados les hace idóneos como indicadores de la calidad higiénica. (15)

3.3 DISTRIBUCION DE COLIFORMES.

Como ya hemos dicho, la localización primaria de *E. coli* es el tracto intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, aunque a veces no está presente en el intestino del cerdo. Por otra parte, *A. aerogenes* se encuentra en los vegetales, y sólo ocasionalmente en el tracto intestinal. No obstante esto, los microorganismos se encuentran en el aire, polvo, manos o sobre muchos otros alimentos. Por lo tanto, el problema no se concreta a la simple presencia de coliformes, sino más bien a su cantidad. La mayoría de las verduras y hortalizas del mercado pueden ser asiento de un escaso número de bacilos gram negativos de tipo coliforme, fermentadores de la lactosa; pero si estos productos han sido adecuadamente recolectados y manipulados, su número tiene tendencia a --descender haciéndose bastante bajo, y por lo tanto, sin significado desde el punto de vista sanitario.

Una de las propiedades más seguras de *E. coli* como indicador fecal del agua es su período de supervivencia en ella. En general muere aproximadamente al mismo tiempo que la mayor parte de las bacterias patógenas intestinales comunes, aunque algunos autores indican que ciertas bacterias patógenas resisten más en el agua que este organismo. Basándose en los estudios de diferentes investigadores, Buttiaux y Mossel (1961) llegan a la conclusión de que algunos patógenos pueden persistir, en condiciones de refrige-

ración, en alimentos irradiados y en aguas tratadas, después de que E. coli haya desaparecido de los alimentos congelados. Estos autores han señalado que E. coli tiene particular valor como organismo indicador sólo en alimentos ácidos, debido a su relativa resistencia a pH bajo.

3.4 ESTANDARDS DE COLIFORMES PARA ALIMENTOS.

Aunque la presencia de gran número de coliformes en los alimentos no es deseable, es virtualmente imposible eliminar todos estos organismos de los alimentos frescos y congelados. Desde este punto de vista las cuestiones básicas son las siguientes:

- 1) ¿Cuál es el número más bajo de coliformes que es posible registrar cuando se observan adecuadas condiciones de recolección, manipulación, almacenamiento y transporte de los alimentos?
- 2) Con respecto al número de coliformes, ¿Cuándo un buen producto se puede transformar en peligroso? Los standards de coliformes para el agua, productos lácteos y otros alimentos amparados por determinados reglamentos federales, estatales y municipales son los siguientes: para la leche pasteurizada de grado A y para los productos lácteos no debe ser superior a 10/ml.; para la leche cruda no sobrepasar la cifra de 10, y para la leche pasteurizada certificada, no superior a 1; para alimentos congelados parcialmente cocidos o precocidos no debe ser superior a 10. (15)

4.0. LOS ENTEROCOCOS COMO INDICADORES DE LAS CONDICIONES HIGIENICAS DE LOS ALIMENTOS.

Los enterococos son miembros del género *Streptococcus*, - que son cocos gram positivos de cadenas largas o cortas, y que se diferencian de los demás cocos gram positivos en que son catalasa negativos. Los enterococos son miembros del grupo D de la clasificación serológica de Lancefield. Este grupo D comprende cuatro - especies distintas (Niven, 1963):

- S. *Faecalis*
 - var. *liquefaciens*
 - var. *zymogenes*
- S. *faecium*
 - var. *durans*
- S. *bovis*
- S. *equinus*

Los enterococos de mayor importancia en bromatología corresponden a los tipos *S. faecalis* y *S. faecium*, siendo los otros dos de menor interés. Estos organismos se denominan también estreptococos fecales. (15)

Se ha escrito mucho sobre los enterococos y sobre el más amplio grupo D de Lancefield de estreptococos como indicadores de -

contaminación fecal. Se encuentran normalmente presentes en las heces de mamíferos. En ciertos alimentos naturales no industrializados existe buena correlación entre la presencia de enterococos y la de coliformes (Seimonsen 1966). (16)

Ostrolenk y col. (1947) fueron los primeros que demostraron la posibilidad de utilizar los enterococos como indicadores de polución. Burton (1949) llevó a cabo el primer estudio comparativo entre coliformes y enterococos como indicadores de alimentos. (15)

Buttiaux ha llamado la atención sobre el valor en los alimentos no industrializados, es decir brutos, de la asociación entre el grupo D de estreptococos y las bacterias del grupo coliaerogenes como indicadores de contaminación fecal (Buttiaux, 1959; Buttiaux y Mossel, 1961).

La presencia de gran número de enterococos en un alimento significa una calidad microbiológica dudosa, ya que su presencia indica bien la exposición del mismo a condiciones que pudieran haber permitido una amplia multiplicación de muchas especies de seables de microorganismos o la deficiencia en las prácticas sanitarias. Los alimentos que se mantienen a temperaturas aptas para el crecimiento de los gérmenes mesófilos pueden contener gran número de enterococos y en alguna ocasión se ha pensado que estos alimentos han determinado casos de intoxicación, Buchbinder et. al. (1944)

han descrito tales casos y Hartman et al (1965) han revisado varias indicaciones similares.

Estos últimos autores, coinciden, sin embargo, con Niven (1963) y Deibel (1964) en el sentido de que no existen pruebas concluyentes que demuestren el papel de los enterococos como causa de intoxicación alimentaria. Es posible que sea necesaria la asociación sinérgica de estos gérmenes con algún otro microorganismo -- Hartman et al., 1965). (16).

El recuento de estreptococos fecales en los alimentos -- se lleva a cabo, por lo general, como medio para evaluar la eficacia de los métodos de limpieza y desinfección en las industrias de alimentos, en particular de superficies, para corroborar otras indicaciones de contaminación fecal, y como índice de calidad microbiológica general. (16).

4.1. CARACTERISTICAS Y CRECIMIENTO DE LOS ENTEROCOCOS.

Los enterococos son bacterias gram positivas y, por lo tanto, más exigentes en sus necesidades nutritivas que las bacterias gram negativas. Estos organismos son incapaces de crecer en medios simples, a base de sales y azúcares, necesitando varias vitaminas del grupo B y otros constituyentes orgánicos. Pueden crecer a temperaturas desde 0°C hasta por encima de 50°C. Aunque en la naturaleza estos organismos son básicamente mesófilos, puede decirse que muchas cepas son psicrófilas facultativas. Los enterococos crecen dentro de unos límites más amplios de pH que los coliformes.

Como se puede observar en la tabla 2, *S. faecalis* y *S. faecium* crecen en presencia de un 6.5 por 100 de cloruro de sodio y de un 40 por 100 de bilis. Esta tabla también presenta otras características fisiológicas que pueden ser de utilidad para diferenciar unas especies o variedades de otras.

Con respecto a la tensión de oxígeno, los enterococos, al igual que la mayoría de los estreptococos, son aeróbicos, pero crecen mejor en condiciones escasamente reductoras. Los organismos que se comportan de este modo se denominan en general microaerófilos. (15)

4.1. CARACTERISTICAS Y CRECIMIENTO DE LOS ENTEROCOCOS.

Los enterococos son bacterias gram positivas y, por lo tanto, más exigentes en sus necesidades nutritivas que las bacterias gram negativas. Estos organismos son incapaces de crecer en medios simples, a base de sales y azúcares, necesitando varias vitaminas del grupo B y otros constituyentes orgánicos. Pueden crecer a temperaturas desde 0°C hasta por encima de 50°C. Aunque en la naturaleza estos organismos son básicamente mesófilos, puede decirse que muchas cepas son psicrófilas facultativas. Los enterococos crecen dentro de unos límites más amplios de pH que los coliformes.

Como se puede observar en la tabla 2, *S. faecalis* y *S. faecium* crecen en presencia de un 6.5 por 100 de cloruro de sodio y de un 40 por 100 de bilis. Esta tabla también presenta otras características fisiológicas que pueden ser de utilidad para diferenciar unas especies o variedades de otras.

Con respecto a la tensión de oxígeno, los enterococos, al igual que la mayoría de los estreptococos, son aeróbicos, pero crecen mejor en condiciones escasamente reductoras. Los organismos que se comportan de este modo se denominan en general microaerófilos. (15)

TABLA No. 2 Estreptococos del grupo D: Caracteres fisiológicos diferenciales seleccionados (Shattock, 1962).

	DIVISION 1	DIVISION 2		DIVISION 3	
	S. Faecalis y Var.	S.fae- cium.	S.du- rans	S.bovis	S.equi- nus
B. Hemolisis	-/+	-	+/-	-	-
Crecimiento a 10°	+	+	+	-	-
45°	+	+	+	+	+
50°	+	+'	-	-	-
pH 9.6	+	-	+/-	-	-
ClNa 6.5 %	+/-	+/-	+/-	-	-
bilis 40 %	+	+	+	+	+
Resistencia a 60°/30'	+	+	+/-	-	-'
Arginina del NH ₃	+	+	+	+	+
Licuaación de la gela- tina	-/+	-	-	-	-
Tolerancia al teluri- to potásico al 0.04%	+	-	-	-	-
Acido de:					
Glicerol (anaerobico)	+'	-	-	-	-
Manitol	+	+	-'	-/+	-
Sorbitol	+'	-'	-	-/+	-
L-arabinosa	-	+'	-	+/-	-
Lactosa	+	+	+	+	-
Sacarosa	+'	+/-	-	+	+'
Rafinosa	-'	-'	-	+	+'

	DIVISION 1	DIVISION 2		DIVISION 3	
	S. Faecalis y Var.	S.fae- cium.	S.du- rans	S.bovis	S.equi- nus
Melobiosa	-	+'	-'	+	-'
Melecitosa	+'	-	-	-	-
Hidrólisis del al- midón	-	-	-	+'	-'
Reducción del tetra- zolum a pH 6.0	+	-	-	+/-	-

+ = Resultado positivo

- = Resultado negativo

+/- = Variación de las cepas con mayoría positiva

-/+ = Variación de las cepas con mayoría negativa

' = Cepas accidentalmente atípicas

Las divisiones 1 y 2 cumplen los criterios del "grupo enterococos" de Sherman (1938) (15)

4.2 DISTRIBUCION DE LOS ENTEROCOCOS EN LA NATURALEZA

Los enterococos al igual que los coliformes, especialmente *E. coli*, son primariamente de origen fecal, estando más relacionados *S. -- faecalis* y sus variedades con el intestino humano que con el de otros -- animales (Bartley y Slanetz, 1960), *S. faecium* y *S. durans* están más -- asociados con el intestino del cerdo que *S. faecalis*, mientras que *S. - bovis* y *S. equinus* se encuentran sobre todo en el intestino del ganado vacuno y del caballo, respectivamente.

Estos organismos existen, además de en las heces, en los vegetales, insectos y suelo (Mundt, 1961; Mundt y col, 1958; Mallman y Litsky, 1951). Muy posiblemente a través de materias fecales pueden llegar a los insectos y vegetales. Mundt (1961) considera que los enterococos son parásitos temporales de los vegetales y sostiene que llegan a ellos por los insectos y el viento, alcanzando finalmente el suelo a través de estos agentes, de la lluvia y de la gravedad. Estos organismos también se pueden encontrar en el polvo.

En general se hallan ampliamente distribuidos en la naturaleza Litsky y col (1953) han puesto de manifiesto que en las aguas del alcantarillado hay gran número de coliformes y enterococos, encontrándose - - trece veces más coliformes que enterococos. (15)

4.3. RELACION ENTRE ENTEROCOCOS Y CALIDAD SANITARIA DE LOS ALIMENTOS

Un gran número de investigadores han utilizado en índice de enterococos, considerándolo superior al de coliformes como índice sanitario, especialmente para alimentos congelados.

Burton (1949), en un estudio sobre 376 muestras de verduras congeladas, llegó a la conclusión de que los coliformes son más eficientes como indicadores que los enterococos antes de proceder a la congelación y almacenamiento, mientras que los enterococos son mejores indicadores de los alimentos congelados. En muestras conservadas a -20°C durante 1-3 meses, sobrevivían el 81% de enterococos y el 75% de coliformes. Después de un año, persistían el 89% de los enterococos, mientras que los coliformes solo llegaban a un 60%. Larkin y col (1955) demostraron que los enterococos se mantenían a un nivel relativamente constante durante 400 días, cuando se almacenaban a temperaturas de congelación.

Cuthbert y col (1955) estudiaron la viabilidad de *E. coli* y *S. faecalis* en el suelo y llegaron a la conclusión de que estos organismos en terrenos calizos persistían durante varias semanas, mientras que en suelos ácidos sólo resistían algunos días. Los enterococos tienen mayor capacidad de supervivencia lejos de las fuentes de contaminación. En la tabla 3 se estudian comparativamente los enterococos y coliformes como indicadores de la calidad sanitaria. (15)

TABLA No. 3 Comparación de enterococos y coliformes como indicadores de la calidad sanitaria.

Características	Coliformes	Enterococos
Morfología	Bacilar	Cocácea
Reacción de Gram	Negativa	Positiva
Incidencia en el tracto intestinal	$10^7 - 10^9$ /g.heces	$10^5 - 10^8$ /g.heces
Incidencia en materia fecal de diversas especies animales	Ausente en algunas	Presente en la mayoría
Especificidad para el tracto intestinal	Generalmente específica	Generalmente poco específica
Presencia fuera del tracto intestinal	Comúnmente en pocos casos	Comúnmente en muchos casos
Facilidad de aislamiento e identificación	Relativamente fácil.	Más difícil
Respuesta a las condiciones ambientales adversas	Poco resistentes.	Más resistentes
Respuesta a la congelación.	Poco resistentes	Más resistentes
Supervivencia relativa en alimentos congelados	Generalmente escasa	Elevada
Supervivencia relativa en alimentos desecados	Escasa	Elevada

Características	Coliformes	Enterococos
Inciden <u>cia</u> en vegetales frescos	Escasa	Generalmente <u>ele</u> vada.
Inciden <u>cia</u> en carnes -- frescas	Generalmente escasa	Generalmente escasa
Inciden <u>cia</u> en carnes <u>cu</u> radas	Escasa o ausente	Generalmente elevada
Relación con los pató <u>ge</u> nos intestinales transmitidos por los alimentos.	Generalmente elevada	Más escasa
Relación con los pató <u>ge</u> nos no intestinales -- transmitidos por los <u>ali</u> mentos.	Escasa	Escasa

4.4 ESTREPTOCOCOS FAECALIS.

El examen de las heces fecales en preparaciones coloreadas por el método de Gram pone de manifiesto la presencia de estreptococos, y tan pronto como se hizo esta observación se intentó aclarar la significación de su presencia y la posibilidad de que jugaran algún papel patógeno. Presentan una morfología bastante característica y es la de presentarse en cadenas cortas, cuyos elementos tienen la mayor parte de las veces una forma francamente ovoide. No posee cápsula, es inmóvil, no esporulado y es gram positivo. Crece bien en los medios corrientes y es anaerobio facultativo. Tiene mucha vitalidad y se conserva perfectamente en los medios artificiales de cultivo. (18)

Producen carbohidrato C grupo D-específico, y son capaces de crecer tanto a 10°C como a 45°C, así como en leche con 0.1% de azul de metileno, en bilis esculina agar o en presencia, de NaCl a una concentración de 6.5%. (14). Hidroliza la arginina, produce ácido del manitol, crece a pH de 9.6. Es éste el único enterococo que reduce el cloruro de 2,3,5,-trifenil tetrazolium (TTC), produce ácido del sórbitol, descompone la tirosina (medio de Mead), crece en presencia de 0.03% de telurito potásico. (6)

S. faecalis es un microorganismo extraordinariamente resistente, capaz de crecer en condiciones letales para otras especies bac-

terianas. Ofrece una característica resistencia al calor, puesto que sobrevive a la temperatura de 60° durante media hora. (7).

Son variables por lo que representa a su actividad hemolítica, los estreptococos fecales o el grupo enterococo están incluidos en el grupo verde o hemolítico α , que producen una zona de coloración verdosa alrededor de la colonia bastante menor que la zona clara de hemólisis beta. (4)

Son muy resistentes a muchos agentes antimicrobianos. Las penicilinas a menudo inhiben su crecimiento pero no los matan a menos que se halle presente un aminoglucósido. (14)

En contraste con los del grupo A, el grupo D son los estreptococos más resistentes a los agentes físicos químicos y terapéuticos. Esta diferencia en la mayor susceptibilidad, de los estreptococos del grupo A que la de los demás grupos, se aprovecha para hacer la identificación del grupo A por medio de la prueba de la bacitracina. En un medio de cultivo que contenga una unidad de bacitracina por ml, no crecerán los del grupo A y sí suelen hacerlo los de los otros grupos. (3).

5.0 PRESERVACION E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS.

La preservación y control de los alimentos es una acción que reviste especial importancia en la transmisión de enfermedades entéricas, bacterianas y parasitarias.

El control de alimentos no debe limitarse al punto de adquisición o expendio, sino alcanzar el lugar de origen del producto e incluye el transporte, recepción, almacenamiento, conservación, manipulación, preparación y distribución, a fin de que el consumidor reciba un alimento nutritivo, apto y sano. Las medidas de saneamiento que entran en el control están íntimamente relacionadas con la calidad y cantidad de agua, disposición de la excreta, recolección y tratamiento de las basuras, control de insectos y roedores de interés sanitario, condiciones estructurales y calidad de los equipos de la industria o local, especialmente de preparación, refrigeración y conservación de los alimentos, higiene de los utensilios y hábitos y aseo de los manipuladores, acción que ha sido un tanto descuidada y que reviste primordial importancia. (17)

Entre los microorganismos de mayor importancia sanitaria por su patogenicidad están *Echerichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium Welchii*, *Salmonella Typhi*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, el virus de la poliometitis y el de la hepatitis. (20)

5.1 ENFERMEDADES CAUSADAS POR ESCHERICHIA COLI Y ENTEROCOCOS.

Algunas cepas de *Escherichia coli* son patógenas para el hombre y los animales, produciendo supuración, infecciones del tracto urinario y gastroenteritis en niños. (6)

Los enterococos forman parte de la flora normal del intestino del hombre y los animales, aunque pueden causar enfermedad cuando se introducen en los tejidos, sangre, sistema urinario o meninges. (14)

El grupo D en el cual están los enterococos, ocupa el segundo lugar, después de los estreptococos viridans, como causa de endocarditis bacteriana subaguda. Este grupo incluye los estreptococos faecalis, que son agentes de infecciones genitourinarias, de tracto respiratorio y pueden causar septicemias. Estas y otras especies muy similares es frecuente descubrirlas en absesos dentales, en crecimientos de válvulas cardiacas y en articulaciones artríticas. En general producen infecciones menos agudas que los estreptococos de tipo beta, pero de todas maneras son peligrosos porque sus infecciones tienden a volverse crónicas. (8) (10)

Generalmente los estreptococos del grupo D son resistentes a las sulfamidas, susceptibles a la penicilina y estreptomina, pero relativamente resistentes a los antibióticos de amplio espectro. Las penicilinas semisintéticas, entre las que se incluyen las cefalosporinas y ampicilinas, no obstante, resultan agentes terapéuticos eficaces. (1)

METODOLOGIA Y MATERIALES

1. Localización del experimento:

, Se realizó en el Laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Querétaro.

2. Diseño Experimental:

2.1 Muestreo:

Para la realización del presente trabajo se utilizaron muestras de:

- 1) Lechugas
- 2) Zanahorias
- 3) Calabacitas
- 4) Rábanos
- 5) Acelgas

De las lechugas se tomaron las hojas intermedias - que son las que se consumen y se hallan protegidas por hojas exteriores que comúnmente se desechan, de las zanahorias se empleó toda, al igual que la calabacita y los rábanos, de las acelgas se usó toda la hoja.

Estas muestras se utilizaron tal y como se obtuvieron de los lugares de expendio, crudas y sin lavar.

Las muestras fueron escogidas al azar, de los diferentes puestos existentes en los mercados, y en las tiendas de auto-servicio de la ciudad de Querétaro.

2.2. Análisis Microbiológico:

Efectuar análisis microbiológico en cada una de las --
muestras:

1. Preparación y dilución de la muestra.
2. Prueba presuntiva.
3. Prueba confirmatoria.

3. Material y Equipo:

El material y equipo de laboratorio necesario para el análisis microbiológico fueron proporcionados por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Querétaro.

- a) Horno para esterilizar a 180°
- b) Autoclave con termómetro
- c) Baño maría con termostato y termómetro
- d) Morteros con arena estériles
- e) Balanza

- f) Pipetas bacteriológicas estériles de 10 ml. y 1 ml. (graduadas en 0.1 y 0.01 ml. respectivamente).
- g) Frascos de vidrio con tapón de rosca de 200 a 250 ml. de capacidad, conteniendo 99 ml. de solución Buffer diluyente después de la esterilización.
- h) Tubos de ensaye de 15 x 150
- i) Tubos para fermentación
- j) Asa de platino

3.1 Reactivos y Medios de Cultivo:

a) Solución de Ringer:

Cloruro sódico	9 gr.
Cloruro potásico	0.42 gr.
Cloruro calcico (anhidro)	0.48 gr.
Bicarbonato sódico	0.20 gr.

Instrucciones: Disolver los componentes en 1 lt. de agua destilada y esterilizar en autoclave a 121° C durante 10 min. PH final 7.

Solución Ringer diluida al cuarto: Diluir una parte de sol. Ringer de concentración normal de 3 partes de agua destilada, mezclar y -- repartir.

- b) Caldo Lauril Sulfato de Sodio.
- c) Caldo Bilis Verde Brillante.

3.2 Muestras de: Lechugas, zanahorias, calabacitas, rábanos y acelgas.

4. Metodología:

En las muestras mencionadas anteriormente se realizaron las siguientes pruebas:

4.1 Preparación y Dilución de la muestra:

Independientemente del grupo de microorganismos que se pretendan enumerar, el procesamiento de la muestra y la preparación de las diluciones deberá realizarse con estrecho apego a las directrices que se describen a continuación. El incumplimiento de estas condiciones dará lugar a variaciones importantes en los resultados hasta el punto de resultar inutilizables. (22)

Procedimiento:

1o.- Pesar 11 grs. de la muestra obtenidos de diferentes zonas. Transferirlos a un mortero con arena estériles y agregar 99 ml. de solución diluyente, moler hasta obtener una suspensión completa y homogénea.

2o.- La anterior constituye la primera dilución de la muestra y corresponde a 10^{-1}

3o.- Continuar las diluciones de la muestra con el mismo diluyente, transfiriendo 11 ml. de la primera dilución al segundo frasco de dilución y así sucesivamente hasta obtener una dilución de 10^{-3} .

4.2 Prueba Presuntiva:

En vista de la variedad de microorganismos presentes en el alimento y dado que solo un grupo de ellos interesa investigar, los organismos coliformes, se realiza una primera prueba llamada presuntiva cuyo objetivo es enriquecer cada tubo inoculado con este grupo de bacterias. (22)

Procedimiento:

1o.- Inocular 1 ml. de cada dilución a cada uno de 3 tubos con 10 ml. de Caldo Lauril Sulfato de Sodio.

2o.- Incubar los tubos durante 48 ± 2 horas a 35°C . Examinar los tubos a las 24 ± 2 horas y observar si hay acumulación de gas en la campana de fermentación. Reincubar 24 horas más. La presencia de gas en cualquier cantidad, dentro de 48 horas hace positiva la prueba.

4.3 Prueba Confirmatoria:

Aquellos tubos que resulten positivos después de la incubación correspondiente (formación de gas, enturbiamiento, cambio de color), son objeto de un segundo estudio que tiende a comprobar la identidad de los microorganismos. Es esta la prueba confirmatoria.

La consulta de las tablas llamadas de Número Mas Probable, en las que se expresa la concentración de gérmenes que corresponde a cada combinación de tubos positivos, permite obtener los valores buscados.

Por su mismo carácter probabilístico las cifras consignadas en las tablas constituyen la mejor estimación que puede hacerse del número de bacterias en la muestra original. Se indican, sin embargo, los límites que con una probabilidad de 0.95. pueden esperarse en cada caso.

Procedimiento:

1o.- Agitar suavemente los tubos de Caldo Lauril Sulfato de Sodio que resultaron positivos. Transferir 2 a 3 asadas de cada tubo o tubos con Caldo Bilis Verde Brillante.

2o.- Incubar los tubos a $44.5^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$ y observar si hay formación de gas a las 24 horas y 48 horas.

3o.- Los tubos que presentan gas al cabo de 48 horas se consideran positivos.

4o.- Después de este período de incubación se determina el número más probable de coliformes fecales por gramo de alimento.

TABLA No. 1

NUMEROS MAS PROBABLE DE ORGANISMOS

Tubos inoculados: 3 con 1 ml dilución 1:10 == 0.1 g muestra
 3 con 1 ml dilución 1:100 == 0.01 g muestra
 3 con 1 ml dilución 1:1,000 == 0.001 g muestra

Tubos Positivos NMP/g (0.1) (0.01) (0.001)			Tubos Positivos NMP/g (0.1) (0.01) (0.001)			Tubos Positivos NMP/g (0.1) (0.01) (0.001)								
3	3	3	3	3	3	3	3	3						
0	0	0	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23.0
0	0	1	1	0	1	7.2	2	0	1	14.0	3	0	1	39.0
0	0	2	1	0	2	11.0	2	0	2	20.0	3	0	2	64.0
0	0	3	1	0	3	15.0	1	0	3	26.0	3	0	3	95.0
0	1	0	1	1	0	7.3	2	1	0	15.0	3	1	1	43.0
0	1	1	1	1	1	11.0	2	1	1	20.0	3	1	1	75.0
0	1	2	1	1	2	15.0	2	1	2	27.0	3	1	2	120.0
0	1	3	1	1	3	19.0	2	1	3	34.0	3	1	3	160.0
0	2	0	1	2	0	11.0	2	2	0	21.0	3	2	0	93.0
0	2	1	1	2	1	15.0	2	2	1	28.0	3	2	1	150.0
0	2	2	1	2	2	20.0	2	2	2	35.0	3	2	2	210.0
0	2	3	1	2	3	24.0	2	2	3	42.0	3	2	3	290.0
0	3	0	1	3	0	16.0	2	3	0	29.0	3	3	0	240.0
0	3	1	1	3	1	20.0	2	3	1	36.0	3	3	1	460.0
0	3	2	1	3	2	24.0	2	3	2	44.0	3	3	2	1,100.0
0	3	3	1	3	3	29.0	2	3	3	53.0	3	3	3	3+1,100.0

RESULTADOS.- En los cuadros siguientes aparecen los resultados obtenidos de la muestras analizadas (Lechugas, Zanahorias, Calabacitas, Rábanos, Acelgas).

1. RESULTADOS:

CUADRO I DETERMINACION DE COLIFORMES FECALES
EN LECHUGAS.

Número de Muestra	Tubos positivos			nmp/gr.
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
1	3	3	3	+1,100.0
2	3	3	1	460.0
3	3	3	3	+1,100.0
4	3	3	1	460.0
5	3	3	2	+1,100.0
6	3	3	3	+1,100.0
7	3	3	3	+1,100.0
8	3	3	3	+1,100.0
9	3	3	3	+1,100.0
10	3	3	3	+1,100.0

CUADRO II DETERMINACION DE COLIFORMES FECA-
LES EN ZANAHORIAS.

Número de Muestra	Tubos Positivos			NMP/gr.
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
1	3	1	1	75.0
2	2	1	0	15.0
3	3	2	-3	290.0
4	3	3	1	460.0
5	3	3	2	1,100.0
6	3	3	2	1,100.0
7	3	3	2	1,100.0
8	3	3	3	+1,100.0
9	3	3	3	+1,100.0
10	3	3	3	+1,100.0

CUADRO III DETERMINACION DE COLIFORMES FECA
LES EN CALABACITAS.

Número de Muestra	Tubos Positivos			NMP/gr.
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
1	3	3	3	+1,100.0
2	3	1	1	75.0
3	3	2	2	210.0
4	3	3	3	+1,100.0
5	3	3	3	+1,100.0
6	3	3	3	+1,100.0
7	3	3	3	+1,100.0
8	3	3	3	+1,100.0
9	3	2	2	210.0
10	3	3	3	+1,100.0

CUADRO IV DETERMINACION DE COLIFORMES FECA-
LES EN RABANOS.

Número de Muestra	Tubos Positivos			NMP/gr.
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
1	3	3	2	1,100.0
2	3	3	3	+1,100.0
3	3	2	0	93.0
4	3	3	3	+1,100.0
5	3	0	0	23.0
6	3	3	3	+1,100.0
7	3	3	3	+1,100.0
8	3	3	3	+1,100.0
9	3	3	2	1,100.0
10	3	3	3	+1,100.0

CUADRO V DETERMINACION DE COLIFORMES FECALES
EN ACELGAS.

Número de Muestra	Tubos Positivos			NMP/gr.
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
1	3	3	2	1,100.0
2	3	3	3	+1,100.0
3	3	3	3	+1,100.0
4	3	3	1	460.0
5	3	3	3	+1,100.0
6	3	3	3	+1,100.0
7	3	3	1	460.0
8	3	3	3	+1,100.0
9	3	2	1	150.0
10	3	1	0	43.0

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1o.- De acuerdo a los resultados presentados se observan que en general las hortalizas tienen un alto grado de contaminación de origen fecal, y este tipo de contaminación nunca debe estar presente en productos alimenticios de consumo humano.

2o.- Como se puede observar, las hortalizas que resultaron más contaminadas fueron las lechugas y los rábanos y son éstas las de mayor consumo en crudo. En seguida se encuentran las acelgas, - las calabacitas y por último las zanahorias que son las menos contaminadas.

3o.- En esta contaminación microbiana de los productos vegetales pueden intervenir diversos factores, como el aire, la tierra en que se cultivan, los insectos, el riego con aguas negras y la manipulación humana.

4o.- Es muy importante, que al pesar la cantidad de muestra requerida, sea con la mayor exactitud posible y también que el diluyente esté medido correctamente, ya que de esto dependerá que exista un mínimo de error en la preparación de las diluciones. El incumplimiento de estas condiciones dará lugar a variaciones importantes en los resultados hasta el punto de no ser confiables.

5o.- Si la concentración de microorganismos en un alimento es pequeña y se requiere un medio de enriquecimiento previo a la identificación de un grupo o especie bacteriano, resulta más satisfactorio aplicar la técnica de dilución en tubo que el recuento en placa. Mediante dicha técnica, se efectúa en realidad una estimación de la densidad de bacterias en el alimento. Tal estimación tiene una base estadística: La probabilidad de obtener tubos de cultivo positivos, disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado.

6o.- Las técnicas empleadas en la realización de este trabajo, son fáciles de montar en cualquier laboratorio y pueden ser usadas en todo tipo de alimento (líquido o sólido) para determinar el grado de contaminación del producto. Estas técnicas son costeables para ser usadas dentro de la industria alimenticia.

7o.- El método admite diversas fuentes de error, en particular la heterogeneidad en la distribución de los microorganismos en la muestra y en sus diluciones, aunque este es uno de los métodos más confiables y fáciles de llevar a cabo en la práctica ya que permite con razonable seguridad diferenciar los organismos coliformes fecales de los restantes que incluye el grupo genérico.

80.- Al practicar la prueba en el laboratorio es indispensable un estricto control de la temperatura de incubación a fin de evitar falsos negativos (por excederse en la temperatura) o falsos positivos (por utilizar temperaturas más bajas):

90.- Por último, recomiendo que la medida más conveniente para luchar contra este problema es el lavado de las verduras con agua corriente, a chorro, realizado meticulosamente a nivel domiciliario, y sobre todo en las verduras que comúnmente se consumen crudas, así como el lavado sistemático de manos de quienes las manipulan, y sensibilizar al consumidor a utilizar alguna solución antimicrobiana.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bailey W. Robert, Scott Elvyn G, Diagnostico Microbiológico, Buenos Aires 1975, Editorial Medica Panamericana, S.A., pág. 172
- 2.- Broch Tomas D, Biología de los Microorganismos, Barcelona España 1976, Ediciones Omega, S.A., pág. 452, 453, 535, 536.
- 3.- Bryan Arthur H, Bryan Charles A, Bryan Charles G., Bacteriología, 2a. edición, México 1974, Editorial CECSA, pág' 272, 274.
- 4.- Burrows William, Tratado de Microbiología, 3a. edición, México 1974, Ed. Interamericana, pág. 375.
- 5.- Carpenter Philip L., Microbiología, 2a. edición, México 1968, Ed. Interamericana, pág. 295, 303.
- 6.- Collins C.H., Métodos Microbiológicos, Zaragoza España, 1969, Editorial Acribia, pág. 209,269.
- 7.- Davis Bernard D., Dulbecco Renato, Eisen Herman N., Ginsberg Harold S., Barry Wood W., Mc. Carty Maelyn, Tratado de Microbiología, 2a. Edición, España 1980, Salvat editores S.A., pág. 748.

- 8.- Divo Alejandro, Microbiología Medica, 2a. edición, México 1971, Ed. Interamericana, pág. 127.
- 9.- Duckworth R.B., Frutas y Verduras, España 1968, Editorial Acribia, pág. 107, 108, 109, 110, 116.
- 10.- Frosbisher Martin, Fuerst Robert, Microbiología, 1a. edición, México 1976, Ed. Interamericana, pág. 359.
- 11.- Gebhardt Louis P., Microbiología, 4a. edición, México 1970, Ed. Interamericana, pág. 246, 144, 145.
- 12.- Gray Young Genevieve, Microbiología, 6a. edición, México 1977, Ed. CECSA, pág. 219.
- 13.- Hawker L.E., Linton A.H., Folkes B.F., Carlile M.J., Elementos de Microbiología General, España 1964, Ed. Acribia, pág. 51, 330, 331.
- 14.- Jawetz Ernest, Melinck Joseph L., Adélberg Edward A., Manual de Microbiología Medica, 8a., edición, México 1979, Ed. El Manual Moderno S.A., pág. 207.
- 15.- Jay James M., Microbiología Moderna de los Alimentos, Zaragoza (España) 1973, Ed. Acribia, pág. 173-179.

- 16.- Thatcher F.S., Clark D.S., Análisis Microbiológico de los Alimentos, Zaragoza (España) 1973, Ed. Acribia, pág. 103, 104, 29, 39, 38.
- 17.- Unda Opazo Francisco, Salinas Cordero Sergio, Ingeniería Sanitaria Aplicada a Saneamiento y Salud Pública, 1a. edición en español, México 1969, Editorial Uteha. pág' 230'
- 18.- Zapatero Ballesteros Emilio, Microbiología Medica 7a. Edición, Valladolid (España) 1974, Ed. Severcuesta, pág. 216, 217.
- 19.- Investigación Epidemiológica sobre Contaminación Biológica de Verduras en el D.F. y Su Posible Desinfección. (De la biblioteca médica general del IMSS, Querétaro).
- 20.- Sociomedicina, Ciclos IX y X, Universidad Nacional Autónoma de México.
- 21.- Revista: Tecnología de Alimentos, Vol. X, No. 4 julio-agosto 1975, pág. 180, 181, 182, 183.
- 22.- Manual de Análisis Microbiológico de Alimentos, de la Secretaría de Salubridad y Asistencia Pública.

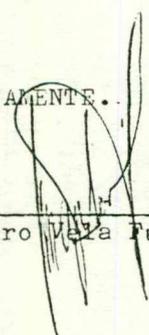
9 de Octubre de 1986

H. CONSEJO ACADEMICO
FACULTAD DE QUIMICA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO
P R E S E N T E .

Por este conducto, me permito comunicar al H. Consejo Académico, que una vez revisada la tesis titulada "Determinación del Grado de Contaminación de Hortalizas de Mayor Consumo en la Ciudad de Querétaro, Causada por Microorganismos de Origen Fecal", con opción a recibir el Título de Químico Biólogo, presentada por la Pasante MARIA MARTHA PATRICIA MALAGON CASTRO.

Por lo anterior me permito emitir mi voto aprobatorio de dichas tesis.

ATENTAMENTE..



Q.A. Pedro Vela Fuerte.

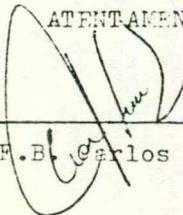
9 de Octubre de 1986

H. CONSEJO ACADEMICO
FACULTAD DE QUIMICA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO
P R E S E N T E .

Por este conducto, me permito comunicar al H. Consejo Académico, que una vez revisada la tesis titulada " Determinación del Grado de Contaminación de Hortalizas de Mayor Consumo en la Ciudad de Querétaro, Causada por Microorganismos de Origen Fecal", con opción a recibir el Título de Químico Biologo, presentada por la Pasante MARIA MARTHA - PATRICIA MALAGON CASTRO.

Por lo anterior me permito emitir mi voto aprobatorio de dicha tesis.

ATENTAMENTE.



Q.F.B. Carlos Sierra S.

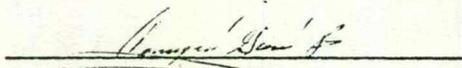
9 de Octubre de 1986

H. CONSEJO ACADEMICO
FACULTAD DE QUIMICA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO
P R E S E N T E .

Por este conducto, me permito comunicar al H. Consejo Académico, que una vez revisada la tesis titulada "Determinación del Grado de Contaminación de Hortalizas de Mayor Consumo en la Ciudad de Querétaro, Causada por Microorganismos de Origen Fecal", con opción a recibir el Título de Químico Biólogo, presentada por la Pasante MARIA MARTHA PATRICIA MALAGON CASTRO.

Por lo anterior me permito emitir mi voto aprobatorio de dicha tesis.

ATENTAMENTE.


Q.F.B. Ma. Concepción García de P.

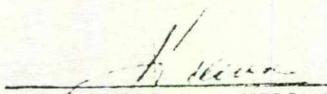
9 de Octubre de 1986

H. CONSEJO ACADEMICO
FACULTAD DE QUIMICA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO
P R E S E N T E .

Por este conducto, me permito comunicar al H. Consejo Académico, que una vez revisada la tesis titulada " Determinación del Grado de Contaminación de Hortalizas de Mayor Consumo en la Ciudad de Querétaro, Causada por Microorganismos de Origen Fecal", con opción a recibir el Título de Químico Biologo, presentada por la Pasante MARIA MARTHA PATRICIA MALAGON CASTRO.

Por lo anterior me permito emitir mi voto aprobatorio de dicha tesis.

ATENTAMENTE.



Q.E. M. ELENA VILLAGRAN.