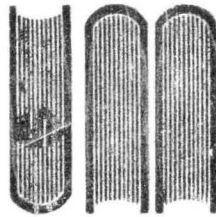


17 JUN. 1983

#STO =
DICNE

FECHA DE EVOLUCION

UNIVERSIDAD DE MONTERREY
DIVISION DE CIENCIAS NATURALES
Y EXACTAS



UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

Clasif.
040.664
6643e
1983
C.1

Título
ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE VEGETALES
CONGELADOS

REPORTE DEL PROGRAMA DE
EVALUACION FINAL
QUE PRESENTA

Felis
900080

Autor
RITA MARIA GONZALEZ GALVAN

EN OPCION AL TITULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS

Vo Bo
Ma. Lourdes Mty M.

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1983

A mis padres

Dr. José Inés González González y
Sra. Carolina Galván de González
con mi más grande agradecimiento
y todo mi amor .

Agradezco de manera especial a
la Q. F. B. Ma. Lourdes Martínez
Macouzet por el interés y el tiempo
dedicado a mi trabajo durante
su valiosa asesoría .

INDICE

	<u>PAG.</u>
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	11
RESULTADOS	24
DISCUSION Y CONCLUSIONES	29
RESUMEN	34
BIBLIOGRAFIA	35

INTRODUCCION

Los hombres de la Antigüedad descubrieron que los alimentos se conservaban por más tiempo cuando se les almacenaba a bajas temperaturas en cavas bajo tierra, en la nieve, en el hielo o junto a los manantiales de agua fría. Los pobladores de las regiones árticas tenían por costumbre someter las piezas de la caza y de la pesca a la acción del frío para utilizarlas después en épocas de escasez .

En el último cuarto del siglo XIX, al inventarse las máquinas de producción de frío, comienza la era de la congelación de los alimentos. Se observa que cuando la temperatura es mayor o igual a 0°C los alimentos se conservan por corto tiempo, pero cuando la temperatura es menor se congelan y el tiempo de conservación aumenta.

A partir de 1880 empiezan a construirse máquinas frigoríficas, primer paso fundamental para el desarrollo de las industrias del frío. En 1930 se lanzaron al comercio minorista, productos congelados envasados, y se consideró este año en los Estados Unidos como el pionero en la fabricación de los alimentos congelados, incrementándose día con día las empresas que dedican sus esfuerzos a esta actividad (10, 11).

El principal objetivo de la congelación consiste en la retención de la cualidad de frescura de los alimentos debido a que una congelación correcta los conserva sin producir cambios apreciables en su tamaño, forma, textura, color y sabor, por lo tanto muchos vegetales pueden ser congelados para mantener su frescura hasta llegar a la mesa del consumidor (4, 5, 13).

Las bajas temperaturas se utilizan para retardar las reacciones químicas, la acción de las enzimas alimenticias y para disminuir o detener el crecimiento y la actividad de los microorganismos en los alimentos (5, 8, 16) .

Cualquier alimento de origen animal o vegetal puede contener una gran variedad de bacterias, levaduras y hongos; los cuales necesitan condiciones adecuadas para crecer y como consecuencia ocasionar cambios indeseables en ellos .

Cada microorganismo presente tiene una temperatura de crecimiento óptima y una mínima por debajo de la cual éste no puede multiplicarse. Las temperaturas frías evitan el crecimiento de los microorganismos, sin embargo pueden llegar a mantener una baja actividad metabólica. El aspecto más importante de las bajas temperaturas se refleja en el decremento del rango de crecimiento microbiano .

Se ha reportado que las bacterias crecen a temperaturas tan bajas como : - 5°C en carnes, - 10°C en carnes curadas, - 11°C en pescado, - 12.2°C en vegetales y - 10°C en nieve, debido a és-

to, la mayoría de los congeladores comerciales operan a una temperatura inferior a los -18°C (4, 5, 8, 16) .

La calidad de los alimentos para ser congelados es de suma importancia. Los vegetales se seleccionan en base a su capacidad para congelarse y a su madurez, se lavan, se ordenan y se cortan. Posteriormente se escaldan o se blanquean con agua caliente o vapor, produciéndose los siguientes efectos :

- 1). Inactivación de la mayoría de las enzimas del vegetal, las cuales pueden causar cambios en el color, pérdidas del sabor, suavidad y valor nutritivo .
- 2). Reducción hasta el 99% en el número de microorganismos en el vegetal .
- 3). Mejoramiento del color de los vegetales verdes .
- 4). Desplazamiento del aire atrapado en los tejidos (8, 10, 11, 16) .

Seguido al proceso de blanqueado que se les da a los vegetales, el número de bacterias en éstos se incrementará considerablemente durante el manejo subsecuente .

El rango y la clase de deterioro que pueden sufrir los alimentos antes del congelado dependerá de sus condiciones y de los métodos de manejo .

La temperatura a la cual los alimentos se almacenen, entre otras condiciones, determinará la clase del microorganismo que se desarrollará y los cambios que se producirán en ellos. La condición del alimento al momento de congelarse determinará la calidad potencial de éste, una vez terminado el proceso .

El equipo para el manejo de los vegetales difícilmente se puede mantener libre de microorganismos, además el sistema de flujo de agua puede ser una fuente importante de contaminación microbiana. Por esta razón, el proceso de reciclar el agua que ha estado en contacto con los vegetales requiere de un estricto control (4, 8, 9, 10, 15).

A temperaturas de congelación las células vegetativas de los microorganismos que son incapaces de multiplicarse mueren. Se presenta un bajo pero continuo decremento en el número de los microorganismos viables, durante el almacenamiento; algunas especies mueren más rápidamente que otras, pero sobreviven por meses y

aún por años, cantidades mínimas de la mayoría de las especies.

El decremento observado en el número de microorganismos viables en los alimentos congelados puede ser el resultado de efectos letales o subletales. Los efectos letales se deben a la desnaturación o floculación de las proteínas esenciales de las células o de sus enzimas; posiblemente como un resultado del incremento en la concentración de solutos en el agua no congelada o quizá en parte por el daño físico causado por los cristales de hielo. En cuanto a los efectos subletales, algunas de las células pueden sufrir un daño que evita su desarrollo y por lo tanto su recuento. Las células en este estado han sido denominadas como congeladas-latentes, descongeladas-latentes, o metabólicamente-latentes. Por lo tanto una reducción en el número de microorganismos no siempre puede representar una muerte verdadera de la población.

Sin embargo se han reportado cuentas totales por encima de los 200 000 organismos por gramo en frijoles verdes congelados y más de 100 000 organismos por gramo en chícharos y elote. En vegetales grandes con formas irregulares como el brócoli, coliflor y espárragos, es difícil mantener la cuenta total baja y ésta puede fácil-

mente exceder los 100 000 organismos por gramo (4, 8) .

Si el descongelado es razonablemente rápido y el alimento se utiliza de inmediato los microorganismos existentes no causarán problema, porque las temperaturas serán demasiado bajas para permitir el crecimiento bacteriano. Solo cuando el descongelado es demasiado lento o cuando se realiza a temperatura ambiente, se presenta la oportunidad para que los microorganismos se desarrollen. La clase de microorganismo que crecerá dependerá de la temperatura y del tiempo en que el alimento se descongele (8) .

Las variables o factores que determinan el que algunos microorganismos mueran, otros permanezcan latentes y algunos no sean dañados durante el congelado son los siguientes :

- a). El estado y clase del microorganismo. La resistencia del microorganismo al proceso de congelado varía con la clase y la fase de crecimiento, así como también si se trata de una célula vegetativa o de una spora .
- b). El rango de congelado. Existe cierto rango de temperaturas debido al cual resultan efectos letales .

- c). La temperatura de congelado. Las temperaturas de congelado altas son más letales .
- d). El tiempo de almacenamiento congelado. El número de microorganismos viables decrece de acuerdo al tiempo de almacenamiento .
- e). La clase de alimento. La composición del alimento influye en la muerte de los microorganismos durante el congelado .
- f). La influencia del descongelado. El rango de temperatura a la cual se descongela el alimento determinará el número y la clase de microorganismos que se desarrollarán .
- g). La congelación y descongelación alternadas. Este hecho puede o no causar la muerte de los microorganismos .
- h). Las posibles modificaciones celulares durante el tiempo de congelado. A mayor tiempo de congelado puede cambiar el pH de la materia celular, la concentración de los electrolitos, etc.

La flora bacteriana de los vegetales congelados está formada principalmente por miembros de los géneros : Bacillus, Enterobacter, Erwinia, Flavobacterium, Achromobacter, Alcaligenes, Cellulomonas, Chromobacterium, Streptococcus, Lactobacillus, Leuconostoc,

Micrococcus, Neisseria, Pseudomonas, Mycobacterium, Phytomonas, Sarcina, Staphylococcus, Serratia y Vibrio (4, 15) .

El método recomendado para la realización de un estudio microbiológico de los vegetales congelados es el recuento total de bacterias mesófilas, de coliformes, de levaduras y hongos (15) .

De los resultados de la cuenta total dependerá la aceptabilidad de un producto en términos del cumplimiento de una norma bacteriana. Las industrias han atribuído gran importancia a estos contajes para garantizar su calidad técnica (2, 7) .

La industria de los alimentos congelados considera a la enumeración de coliformes y de enterococos como herramienta para determinar y mantener las condiciones de sanidad del proceso y del manejo de los alimentos, debido a que estos microorganismos son indicadores de contaminación fecal la cual ha sido determinada en los productos de horticultura (4, 6, 8, 14, 15) .

Por otra parte, las levaduras y los hongos están ampliamente distribuídos en la naturaleza y pueden encontrarse como parte de la

flora normal de los productos alimenticios, como contaminantes provenientes de un equipo no higiénico o como contaminantes del aire (15) .

El propósito de realizar un estudio microbiológico a los alimentos tiene como fin el garantizar la inocuidad de los mismos, para evitar que representen un riesgo para la salud de los individuos y causen pérdidas económicas tanto para el país como para el consumidor (3, 4) .

Debido al gran auge que en los últimos años han tenido los alimentos congelados, entre ellos las verduras, se ha querido enfocar este trabajo hacia el aislamiento y la identificación de los microorganismos Gram Negativos potencialmente patógenos para el hombre, presentes en la calabaza, la coliflor y la zanahoria congeladas, las cuales son verduras ampliamente consumidas en nuestro país .

MATERIALES Y METODOS

Para llevar a cabo este trabajo se recolectaron un total de 60 muestras de verduras congeladas (zanahoria, coliflor y calabaza) en diferentes localidades de la ciudad de Monterrey, N. L. y del municipio de Garza García, N. L. en el transcurso de los meses de Enero a Abril de 1983 .

Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Microbiología de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Monterrey .

I. RECOLECCION DE LA MUESTRA

Las muestras se adquieren en el lugar de expendio y se transportan de inmediato al laboratorio en los empaques en que éstas se venden .

II. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Se pesan 10 g de la muestra descongelada, se introducen en un matraz conteniendo 90 ml de Solución Ringer estéril (R-1), se agita el matraz y se deja reposar media hora. (Dilución 1:10). A partir de esta dilución se preparan diluciones 1:100 y 1:1000.

Las pruebas realizadas a cada una de las muestras fueron: Cuenta Total de Bacterias Aerobias y Cuenta Total e Identificación de Coliformes .

III. CUENTA TOTAL DE BACTERIAS

Se toma 1 ml de cada una de las diluciones y se transfiere a cajas Petri estériles, se agrega agar para Métodos Estándares a 55°C y se mezcla por rotación. Se incuba a 37°C por 48 horas (Fig. 1).

Se cuenta el número de colonias de las placas que contienen entre

30 y 300 colonias y se multiplica por la dilución para obtener el número de bacterias por grama de muestra .

IV. CUENTA DE COLIFORMES

Se toman 0.1 ml de cada dilución y se transfieren al centro de cajas Petri conteniendo agar Eosina Azul de Metileno, se distribuye por medio del método de la varilla de vidrio. Se incuba a 37°C por 48 horas .

Se cuentan las colonias de las placas que contienen entre 30 y 300 colonias y se multiplica por 10 y por la dilución para obtener el número de bacterias coliformes por gramo de muestra .

V. IDENTIFICACION DE COLIFORMES

Del EMB se toman todas las colonias diferentes y se inoculan en caldo Hajna, se incuba a 37°C por 24 horas (Fig. 2) .

Después de incubar el caldo Hajna se inoculan los siguientes medios : Agar Lisina Fierro (LIA), Agar Motilidad Indol Ornitina (MIO), Agar Triple Azúcar Fierro (TSI), Simmons Citrato, Agar Azufre Indol Motilidad (SIM), Caldo Voges Proskauer y Ro-

Fig. 1 Tratamiento de la muestra para la Cuenta total de bacterias aerobias y de coliformes

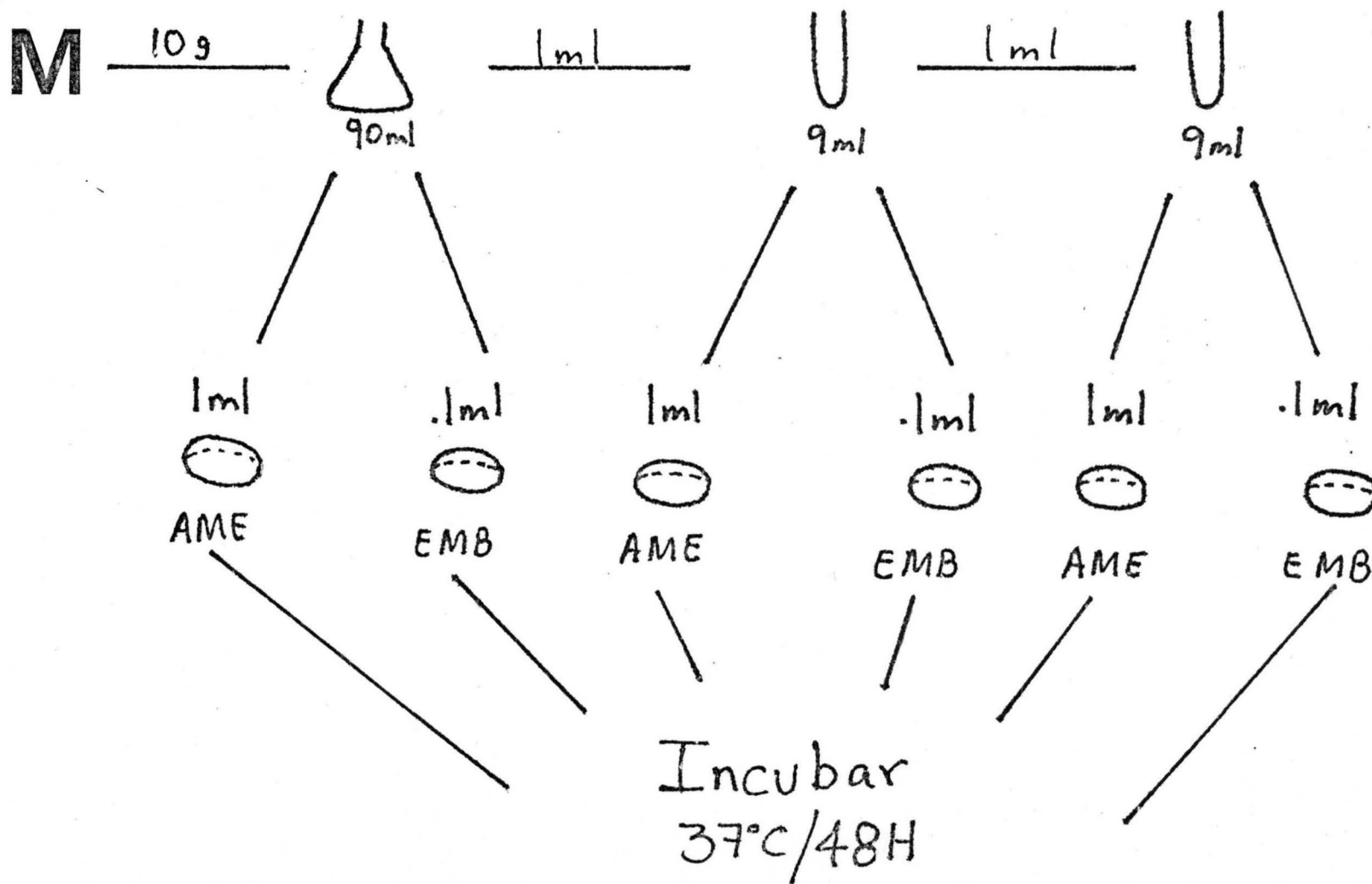


Fig. 2 Identificación de Coliformes

EMB

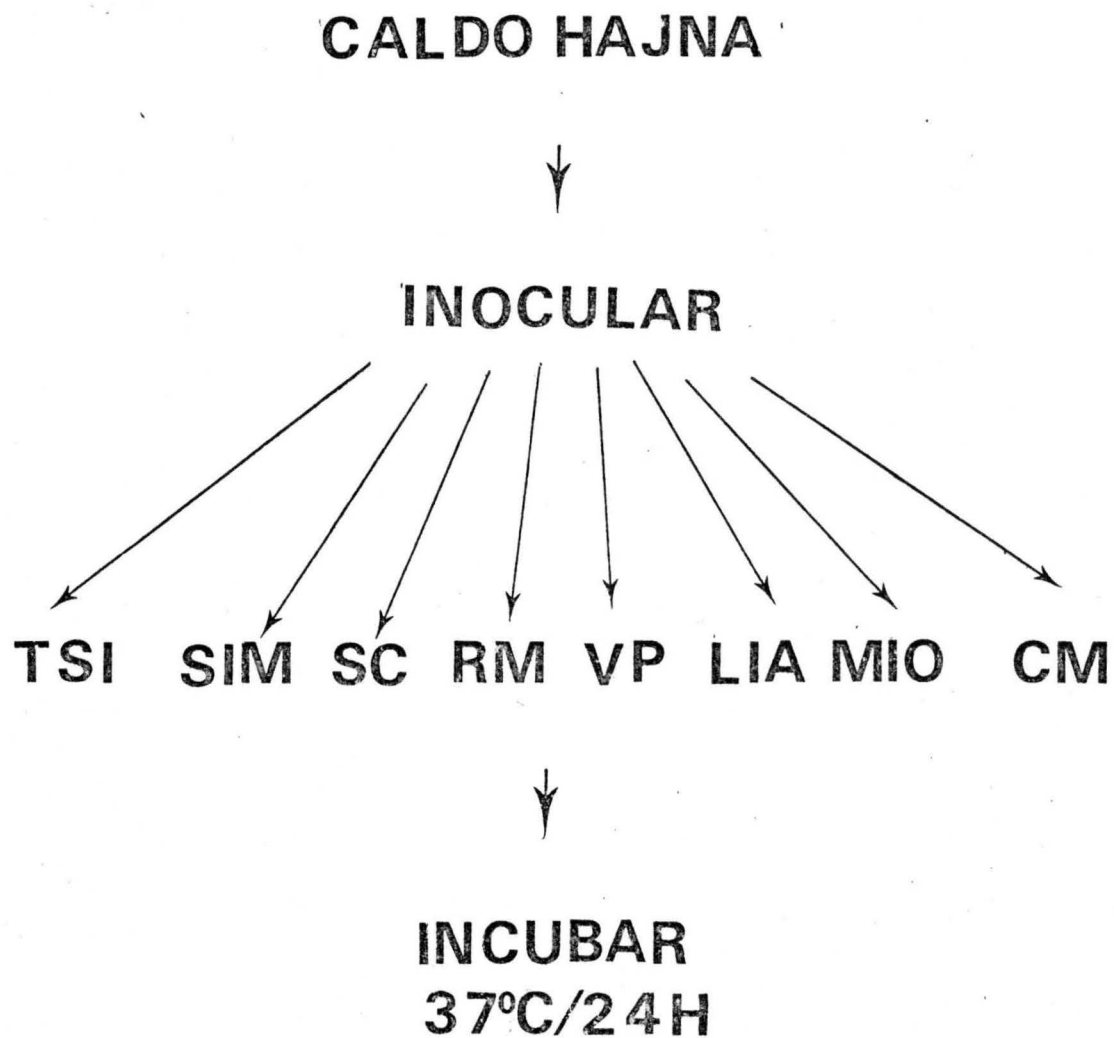


CALDO HAJNA



INCUBAR 37°C/24H

Cont. Fig. 2



jo de Metilo y Caldo de Malonato. Se incuban a 37°C por 24 horas (Fig. 2) .

A las bacterias no fermentadoras de carbohidratos se les realizan las siguientes pruebas : Vía de Utilización de Carbohidratos, Reducción de Nitratos y Prueba de la Oxidasa .

Se observan los cambios (Fig. 3) ocurridos en los medios y se realizan las siguientes pruebas :

Prueba del Rojo de Matilo : Al caldo utilizado para esta prueba se le añaden unas gotas de solución de rojo de metilo (R-2) .

Prueba de Voges-Proskauer : Se añaden 0.2 ml. de solución de KOH-creatina (R-3) y 0.6 ml. de alfa naftol al 5% (R-4) al caldo utilizado para esta prueba .

Prueba del Indol : Se agregan unas gotas del reactivo de Kovac (R-5), a los medios Hajna, SIM y MIO .

Vía de Utilización de Carbohidratos : Se examinan las reacciones

en el medio de prueba O-F .

Reducción de Nitratos : Se agregan 5 gotas de alfa-naftil amina (R-6) y 5 gotas de ácido sulfanílico (R-7) al medio Nitrito-Indol .

Prueba de la Oxidasa : Se colocan sobre las colonias discos impregnados con el reactivo p-aminodimetilanilina .

Se interpretan los resultados y se identifican las especies bacterianas en base a las tablas descritas por : Bailey & Scott y Mac Faddin (1,12) .

Fig.3 Interpretación de los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas

Prueba	Medio Utilizado	Resultados	
		Positivo	Negativo
Producción de Indol	MIO, SIM, Hajna	Anillo Rojo	Anillo Amarillo
Fermentación de Glucosa	TSI	's (roja) 'f (amarillo)	anaranjado
Fermentación de sacarosa y/o lactosa	TSI	s (amarillo) f (amarillo)	anaranjado
Producción de Ureasa	Hajna	Azul	Verde
Descarboxilación de la Ornitina	MIO	morado	amarillo
Descarboxilación de la Lisina	LIA	s (lila) f (lila)	amarillo
Desaminación de la Lisina	LIA	s (vino) f (amarillo)	amarillo
Utilización de CHO's vía fermentativa	O-F	#A (amarillo) &S/A (verde) o 2 amarillos	verde
Utilización de CHO's vía oxidativa	O-F	A (amarillo) S/A (verde)	verde
Utilización de Citrato	S-C	Azul	Verde
Producción de acetilmetilcarbinol	MR-VP	Rojo	Amarillo
Rojo de Metilo	MR-VP	Rojo	Amarillo
Utilización de Malonato	Caldo de Malonato	Azul	Verde

Prueba	Medio Utilizado	Resultados	
		Positivo	Negativo
Producción de H_2S	SIM, TSI LIA	Negro	Color original del medio
Motilidad	MIO, SIM	crec. en todo el medio	crec. solo en línea de inoculación
Reducción de nitrato	Nitrito Indol	Rojo	Rosa
Oxidasa	Disco Bioclin	Colonia Negra	Color de la colonia

's : superficie

"f : fondo

#A : aceite

ES/A : sin aceite

REACTIVOS

(R-1) Solución Ringer

NaCl.....	8.50 g
KCl.....	0.20 g
Na ₂ CO ₃	0.01 g
Agua Destilada.....	1000.00 ml.

Se disuelven las sales en el agua destilada y se esteriliza a 121°C por 15 min.

(R-2) Rojo de Metilo

Rojo de Metilo	0.10 g
Alcohol Etílico Absoluto ..	300.00 ml.
Agua Destilada.....	200.00 ml.

Se disuelve el rojo de metilo en el alcohol y se afora a 500 ml con agua destilada .

(R-3) Solución de KOH-creatina

KOH	40.00	g
Creatina.....	0.30	g
Agua Destilada.....	100.00	ml.

Se disuelve el KOH en el agua destilada y se le agrega la creatina .

(R-4) Alfa Naftol al 5%.

Alfa Naftol.....	5.00	g
Alcohol Etilico Absoluto ..	100.00	ml.

Se disuelve el aldehido en el alcohol y se agrega lentamente el ácido .

(R-5) Reactivo de Kovac

Alcohol Amflico	150.00	ml.
p-dimetilaminobenzaldehido	10.00	g
HCl concentrado.....	50.00	ml.

Se disuelve el aldehido en el alcohol y se agrega lentamente el ácido .

(R-6) Alfa-naftilamina

Alfa-naftilamina..... 5.00 g

Acido Acético (5N)..... 1000.00 ml.

Se disuelve el alfa-naftilamina en el ácido .

(R-7) Acido Sulfanílico

Acido Sulfanílico 8.00 g

Acido Acético (5N)..... 1000.00 ml.

Se disuelve el ácido sulfanílico en el acético .

RESULTADOS

El recuento total de bacterias aerobias y el de coliformes de los vegetales analizados, se muestra en las tablas I y II respectivamente. El vegetal que presentó el mayor recuento fue la coliflor y la calabaza el menor, en ambos casos .

En la tabla III se reportan en orden de frecuencia los microorganismos aislados e identificados pudiéndose observar que la bacteria que se presentó con mayor incidencia fue Enterobacter hafniae

en un 40% de los vegetales analizados .

Pseudomonas aeruginosa y Acinetobacter Iwoffii se encuentran en un 25% y 20% de las muestras respectivamente .

TABLA 1

Cuenta Total de Bacterias Aerobias de
vegetales congelados

Bacterias/g	No. de muestras		
	Calabaza	Coliflor	Zanahoria
$10^1 - 10^2$	0	0	0
$10^2 - 10^3$	0	0	4
$10^3 - 10^4$	20	7	7
$10^4 - 10^5$	0	11	6
$10^5 - 10^6$	0	1	3
10^6	0	1	0
Total	20	20	20

TABLA II

Cuenta Total de Bacterias Coliformes

Bacterias/g	No. de muestras		
	Calabaza	Coliflor	Zanahoria
0	7	0	11
$10^1 - 10^2$	12	6	7
$10^2 - 10^3$	1	10	1
$10^3 - 10^4$	0	4	1
Total	20	20	20

TABLA III

Frecuencia de los microorganismos aislados
del total de muestras

Microorganismos	No. de Muestras	Frecuencia porcentual
<u>Enterobacter hafniae</u>	24	40.00%
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	15	25.00%
<u>Acinetobacter lwoffii</u>	12	20.00%
<u>Citrobacter freundii</u>	7	11.66%
<u>Enterobacter agglomerans</u>	7	11.66%
<u>Alcaligenes faecalis</u>	6	10.00%
<u>Acinetobacter anitratum</u>	4	6.66%
<u>Klebsiella sp.</u>	4	6.66%
<u>Arizona sp.</u>	2	3.33%

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las muestras recolectadas se transportaron al laboratorio en su empaque original el cual se abrió hasta el momento del análisis , evitándose así toda contaminación externa, pudiendo atribuir el que los microorganismos aislados de las verduras congeladas deben provenir de un proceso defectuoso de escaldado o blanqueado, del agua utilizada para dicho proceso, del equipo usado, o bien del manejo subsecuente que se les da hasta el empaquetado .

La contaminación de los vegetales generalmente ocurre después del blanqueado y puede provenir de los canales de enfriamiento y traslado, de las cintas donde se realiza la selección, del empaque, del personal, de la entrada del aparato congelador y del congelador de almacenamiento .

La verdura que presentó mayor proporción de bacterias aerobias fue la coliflor, posiblemente por tratarse de un vegetal grande de forma irregular lo que provoca que albergue un número importante de microorganismo y una mayor dificultad de eliminación de los mismos durante el proceso de blanqueado .

El proceso de blanqueado es más efectivo en los vegetales de mayor conductividad calórica, la cual viene dada por la especie, la variedad, la madurez, la forma y el tamaño del vegetal y por la temperatura del medio. Probablemente debido a ésto se encontró que la zanahoria contenía un número más alto de microorganismos que la calabaza .

Los recuentos totales obtenidos no se pueden considerar muy altos, ya que según Herrmann (10), se han obtenido cuentas totales para

la coliflor hasta de 1 000 000 de bacterias por gramo y para la zanahoria según Weisser (16) de 3000 bacterias por gramo de vegetal congelado y de 5 800 000 bacterias por gramo descongelado después de 24 horas .

Respecto a la cuenta de bacterias Gram Negativas se encontró en la coliflor un mayor número de microorganismos que en la zanahoria y en ésta menor que en la calabaza. La mayoría de estos microorganismos correspondieron a las Enterobacterias las cuales constituyen una gran parte de la flora normal del intestino y por lo general no causan enfermedades entéricas a menos que se encuentren en tejidos fuera del intestino, particularmente en las vías urinarias, las vías biliares, los pulmones, el peritoneo o las meninges .

El número de enterobacterias encontrado en este estudio, hace suponer que los vegetales sirven de reservorio para el desarrollo de estos microorganismos y que además transforman a estos alimentos en una fuente importante de contaminación para el hombre .

Tradicionalmente se ha propuesto la presencia de Escherichia coli

como índice de contaminación fecal; en este caso no se aisló dicho microorganismo, pero en la literatura se ha sugerido considerar la presencia de Enterobacterias como una indicación de contaminación fecal en el caso del análisis microbiológico de alimentos deshidratados, congelados, y refrigerados, debido a que la supervivencia de E. coli en estas condiciones es muy baja y por otra parte al aumento de enfermedades diarreicas ocasionadas por los microorganismos coliformes .

Debe hacerse notar que los resultados de las cuentas totales pueden variar en una misma muestra, ya que no todas las bacterias se pueden enumerar, debido a que existen microorganismos incapaces de desarrollarse por encontrarse en un estado al cual se le ha denominado congelado-latente, descongelado-latente, o metabólicamente latente .

Por lo discutido anteriormente se puede en general concluir que la contaminación de los vegetales proviene de un mal manejo de los mismos durante el proceso de congelado así como también por parte del consumidor, sin embargo debe enfatizarse que el tipo y grado de contaminación de estos alimentos depende también de otros fac-

tores y de ciertas características del vegetal .

En cuanto a la posible contaminación fecal a la que están expuestas las verduras se puede inferir que está directamente relacionada con el agua de riego de los cultivos, el personal involucrado en su manipulación y con las condiciones de higiene mantenidas durante el proceso .

Antes de ingerir los vegetales se considera conveniente que se sometan a un proceso de cocción durante un tiempo considerable para disminuir o eliminar los microorganismos presentes y así evitar que estos alimentos constituyan un riesgo para la salud .

RESUMEN

Se analizaron un total de 60 muestras de verduras congeladas mediante los Métodos de Cuenta Total de Bacterias Aerobias y Cuenta Total e Identificación de Coliformes .

Se encontró que la coliflor es el vegetal con mayor contenido de microorganismos y que se aisló Enterobacter hafniae del 40% de los vegetales .

BIBLIOGRAFIA

1. Bailey, W. R. and E. G. Scott. 1974. Diagnostic Microbiology. 4th ed. The C. V. Mosby Company, Saint Louis .
2. Collins, C. H. 1976. Métodos Microbiológicos. Ed Acribia, Zaragoza, España .
3. Crónica. 1982. Control sanitario de los alimentos. Informe final. Bol. Sanit. Panam. 93 : 158 - 168 .

4. Cruess, W. V. 1958. Commercial Fruit and Vegetables Products. 4th ed. Mc Graw Hill Book Company, U. S. A.
5. Desrossier, N. and F. Tressler, 1977 . Fundamentals of Food Freezing. The Avi Publishing Company, Westport Connecticut .
6. Ercolani, G. L. 1976. Bacteriological quality assesment of fresh marketed lettuce and fennel. Appl. Environmen. Microbiol. 31 : 847-852
7. Fernández, M. y otros. 1981. Manual de Prácticas de Microbiología Sanitaria. 3a ed. Instituto Politécnico Nacional, México, D. F.
8. Frazier, W. C. and D. C. Westhoff. 1978. Food Microbiology. 3th ed. Mc Graw Hill Book Company, U. S. A.
9. Goodenough, T. and R. Atkin. 1981. Quality in stores and proceses vegetables and fruit. Academic Press, London.

10. Herrman, K. 1970. Alimentos Congelados, " Tecnología y Comercialización " . Ed. Acribia, Zaragoza, España .
11. Joslyn, M. and J. L. Heid. 1964. Food Processing Operations Vol. 3, The Avi Publishing Company, Westport, Connecticut .
12. McFaddin, J. 1980. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. 2nd ed. Waverly Press, Inc. Baltimore, Ma.
13. Potter, N. 1980. La Ciencia de los Alimentos, Edutex, México, D. F.
14. Silliker, J. 1982. Selecting methodology to meet industry's microbiological goals for the 1980's. Food Technol. 36 : 65-69 .
15. Speckm M. L. 1976. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington D. C.

16. Weisser, H. y otros. 1971. Practical Food Microbiology and Technology. 2nd ed. The Avi Publishing Company , Westport, Connecticut .