DICNE
$ 500.--

27 ENE. 1986

FECHA DE DEVOLUCION

El último sello marca la fecha tope para ser devuelto este libro.
El lector pagará ~~$5.00~~ 40.- pesos por cada día que pase una semana después del vencimiento.

27 ENE. 1988
3 FEB. 1988
9 FEB. 1988
16 FEB. 1988
23 FEB. 1988
1 MAR. 1988
8 MAR. 1988
15 MAR. 1988
22 MAR. 1988

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

DIVISION DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

clasif.
040.664
H473a
1985
c.1

UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

título

ANALISIS BACTERIOLOGICO DE 3 VEGETALES . FRESCOS LAVADOS Y SIN LAVAR

REPORTE DEL PROGRAMA DE EVALUACION

FINAL

folio
900570

QUE EN OPCION AL TITULO DE

INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA

autor
ZEIN HEJASE IBRAHIM

VoBo.
Ma. Lourdes Mtz. M.

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

MONTERREY, N. L. NOVIEMBRE DE 1985

A mi madre con todo mi amor
por ayudarme a hacerme hombre
particularmente durante los
años en el extranjero.

Con amor y agradecimiento a mis
hermanos por su ayuda en este
gran paso de mi vida.

Agradezco especialmente a la maestra Ma. de Lourdes Martínez Macouzet por su gran ayuda durante la realización de este trabajo. También agradezco a la maestra I.A. Marina del Grande Leyva y al Ing. Aureliano por sus -- Consejos y asesoría durante mi carrera profesional.

I N D I C E

PAG.

INTRODUCCION 1

MATERIALES Y METODOS 8

RESULTADOS 13

DISCUSION Y CONCLUSIONES 17

RESUMEN 20

BIBLIOGRAFIA 21

INTRODUCCION

Los vegetales juegan un papel muy importante en la dieta humana debido a que poseen propiedades nutritivas muy especiales. Contribuyen a la neutralización de las sustancias ácidas producidas durante la digestión de carnes, quesos y otros alimentos; son de valor por su dureza la cual promueve la digestión y ayuda a prevenir la constipación, proporcionan los elementos minerales necesarios para el organismo, son fuentes importantes de vitaminas, y algunos, como las legumbres, de proteína, mientras que otros suministran energía por ser ricos en carbohidratos (3).

En general puede decirse que contienen un promedio de 85% de agua, 36% de carbohidratos como glucosa, fructosa y sacarosa y 2% de proteínas. El resto del contenido sólido consiste en celulosa, compuestos pécticos, sales y vitaminas (4).

Los vegetales pueden ser consumidos en su estado natural, - cocidos, fritos, preparados en sopas, en forma de salsas o en platillos mixtos. En base a su valor nutritivo, las hortalizas (verduras o legumbres) pueden dividirse en dos grandes grupos: los vegetales verdes y amarillos, que son fuente de provitamina A o pigmentos carotínicos (como la zanahoria y la calabaza), y los llamados otros vegetales que no son fuente de provitamina A, (como la coliflor).

La consistencia de las hortalizas es un factor importante - en su selección. Cuando el vegetal ya no es tierno, los tejidos son muy gruesos y por lo tanto la consistencia es dura, lo que hace más difícil su ablandamiento y la preparación del mismo, requiere de mayor tiempo de cocción y prolonga el período de digestión. Por otra parte, el comprar - vegetales muy maduros no es económico, ya que hay mayor cantidad de desperdicio (10).

Se cosechan en una etapa inmadura, tierna, antes que cualquier parte se vuelva fibrosa y dura. Se eliminan las verduras demasiado maduras, las infestadas de insectos y de -- otros materiales que pueden impartir un sabor desagradable al producto. Se enjuagan en agua para eliminar suciedad superficial y pequeñas basuras, y para las verduras que provienen del suelo y las de hoja puede utilizarse detergente.

Cada verdura se prepara, según se requiera: se pueden mondar (betabel, zanahoria, papa, etc.), desvainar (frijol, - ejote, etc.), descascarar (coliflor, maíz, etc.), cortar - (ejotes, okra, etc.), y dependiendo del vegetal se pueden ingerir crudos, cocidos, fritos o procesados (5).

En la superficie de los vegetales se aloja predominantemente una flora gram-negativa (*Erwinia* y *Pseudomonas*), la --

cual tiene un rango que varía de algunos miles hasta 100,000 por cm^2, dependiendo del producto y sus condiciones de crecimiento. También se encuentran con mayor incidencia, pero en cuentas pequeñas las bacterias del ácido láctico, levaduras y mohos. Frecuentemente varias especies de la flora residente se encuentran entre los tejidos de los vegetales. En algunos casos, estos microorganismos son incorporados durante el crecimiento de las plantas, sin embargo su multiplicación es limitada pero permanecen viables (2).

La mayoría de los microorganismos presentes en los vegetales frescos son saprófitos, por ejemplo, los corineformes, bacterias del ácido láctico, bacilos formadores de esporas, micrococos y pseudomonas, derivados del suelo, del aire y del agua. Los hongos, por ejemplo, Aureobasidium, Fusarium y Alternaria, se encuentran en cantidades relativamente pequeñas (14).

El suelo, el agua, el aire, los insectos y los animales contribuyen a la microflora de los vegetales. Un estudio reciente de vegetales al tiempo de la cosecha muestra que las cuentas de mohos varían de 1,000 hasta 67,000 por gramo o cm^2 de tejido. El número de mohos sobre el tejido de la planta se incrementa cuando la lluvia precede a la cosecha y cuando la temperatura es inferior de 24°C (14).

Actualmente, existe evidencia de que los vegetales frescos que crecen sobre suelos contaminados pueden ser responsables de ciertas enfermedades infecciosas, por ejemplo, Salmonella typhi, agente etiológico de la tifoidea puede vivir en el suelo de 30 a 36 días y en tierras estériles hasta por más de 60 días (15).

Las verduras como la zanahoria, la coliflor y la calabaza se consideran de alto contenido de fibra; la cual altera la flora bacteriana, así como disminuye el tiempo de tránsito de los alimentos en el intestino e incrementa el volumen fecal (11).

La zanahoria es una de las hortalizas más importantes debido a que la raíz, que es la parte comestible, contiene caroteno, fuente de vitamina A y almacena grandes cantidades de carbohidratos (8).

Se cultiva de raíces tuberizadas, en todas las estaciones.- Sus semillas son pequeñas (de 400 a 500 por gramo). Se deben escoger suelos pobres en guijarros, preferentemente arenosos y profundos. Los principales factores que influyen en su crecimiento son: 1) temperatura, 2) tipo de suelo, en lo referente a su contenido de agua, drenaje, acidez y friabilidad y 3) provisión de nitrógeno aprovechable.

La temperatura tiene un marcado efecto sobre la forma de la raíz de la zanahoria, la temperatura alta produce una raíz pequeña y la temperatura baja (10°C - 15.6°C) produce una - raíz mal alta (3,12).

Entre las alteraciones importantes de ellas en el mercado - se encuentran: podredumbre blanda bacteriana, podredumbre - negra, podredumbre por Fusarium, podredumbre gris, podredumbre por Rhizopus y podredumbre blanda acuosa (9).

Las calabazas almacenan grandes cantidades de carbohidratos y las variedades de pulpa amarilla contienen caroteno. Las abejas son los principales agentes polinizadores (6)

Respecto a sus alteraciones, puede presentar podredumbre - blanda por Rhizopus y varias podredumbres de los tallos;

Además de podredumbre gris, podredumbre por Fusarium y antracnosis (9).

La coliflor presenta una cabeza floral no desarrollada, - las hojas son generalmente más largas que las de repollo.- El principal componente de este vegetal es el agua. Los - carbohidratos, la fibra cruda, las proteínas, los lípidos y la ceniza, son los otros constituyentes que aparecen en proporciones relativamente altas, además de otros componentes celulares como son las vitaminas (6).

Sufre ciertas alteraciones que son: La blanda bacteriana, la podredumbre gris, podredumbre negra, podredumbre blanda acuosa y la podredumbre por Alternaria (parda) (9).

Los microorganismos presentes en la superficie de frutas y hortalizas recién recolectadas comprenden no solo la flora superficial natural, sino la procedente del suelo y agua, e incluso gérmenes patógenos de los vegetales. Entre los - géneros normalmente presentes se encuentran: Achromobacter, Pseudomonas, Enterobacter, Alcaligenes, Bacillus, Bacterium, Chromobacterium, Flavobacterium, Lactobacillus, Leuconostoc, Micrococcus, Sarcina, Serratia, Staphylococcus, Streptococcus, y otros, y entre los patógenos de vegetales, Erwinia y Xanthomonas. En ocasiones se encuentran distintas clases de mohos y levaduras. Cuando las superficies están húmedas o las partes externas han sufrido traumatismos, algunos microorganismos se desarrollan durante el tiempo - que transcurre entre la recolección y el momento de su - transformación o consumo. El control adecuado de la humedad y temperatura reducirá tal crecimiento.

El contacto de los vegetales en malas condiciones con los sanos, determina la contaminación de éstos y puede ocasionar pérdidas. La contaminación a partir de la maquinaria -

de la factoría puede reducirse con una limpieza y desinfección apropiadas. Es muy peligroso el desarollo de esporas termorresistentes de los gérmenes que ocasionan alteraciones, como por ejemplo las esporas de las bacterias de la fermentación simple, de los anaerobios de la putrefacción o de Clostridium thermosaccharolyticum.

El lavado a fondo de los vegetales los libera de la mayoría de los contaminantes accidentales de la superficie de las hojas, pero deja una gran parte de la flora natural. A no ser que el agua de lavado sea bacteriológicamente pura, puede añadir gérmenes que más tarde se desarollan en la superficie húmeda. A veces se emplean para el lavado agua clorada o una solución de bórax y también pueden adicionarse detergentes que facilitarán la eliminación de la suciedad y de los miroorganismos.

Así la reducción del contenido bacteriano y especialmente de los patógenos para el hombre favorece el estado de salud del individuo evitando muchas enfermedades (13).

Para determinar el grado de aceptación de los vegetales para el consumo humano, es necesario analizarlos cuantitativa y cualitativamente desde el punto de vista bacteriológico.

Se debe realizar una cuenta total de bacterias aerobias, con el objeto de calcular el número de microorganismos presentes por gramo de muestra. Por otra parte, para establecer el grado de contaminación fecal se lleva a cabo el recuento e identificación de coliformes.

Estudios realizados por diversos investigadores han demostrado que los vegetales adquiridos en el mercado y que se

consumen crudos, contienen cifras altamente significativas de microorganimos, entre los que se encuentran bacilos Gram negativos y coliformes (4).

Debido a que la ingestión de los vegetales, como la zanahoria, la calabaza y la coliflor es muy común en México; el objetivo de este trabajo es efectuar un análisis microbiológico antes y después de lavarlos, con el propósito de determinar la variación en el contenido bacteriano.

MATERIALES Y METODOS

Para la realización de este trabajo se obtuvieron 52 muestras de vegetales frescos (zanahoria, calabaza y coliflor) de diferentes localidades de la ciudad de Monterrey, en el transcurso de los meses de Agosto a Noviembre de 1985. Los vegetales se analizaron en el laboratorio de Microbiología de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Monterrey.

Las muestras fueron recolectadas en el mercado en bolsas de polietileno y transportadas al laboratorio, donde se analizaron sin lavar y lavándolas con agua corriente y detergente. A cada una de las muestras se les determinó la cuenta total de bacterias mesófilas aerobias y la cuenta total e identificación de coliformes.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA: Se pesan asépticamente 20 g de la muestra (sin lavar y lavada). Se cortan con un bisturí y se introducen asépticamente en un matraz conteniendo -- 180 ml de agua estéril. Se agita por 2 min y se deja reposar por 15 min. Esta suspensión representa una dilución - de 1:10. De esta dilución se transfiere 1 ml a un matraz conteniendo 99 ml de agua estéril (dilución 1:1000) y se procede a lo siguiente:

CUENTA TOTAL DE BACTERIAS: Se transfieren 0.1 ml de la dilución 1:10 a una placa petri estéril, y 1 ml y 0.1 ml de la dilución 1:1000 a otras 2 placas petri respectivamente. A cada placa se agrega agar para métodos estándares a 45°C y se mezcla por rotación. Se deja solidificar y se incuba a 37°C por 24 horas. Se cuenta el número de colonias en - las cajas petri que contengan entre 30 y 300 colonias y - se multiplica por la dilución para obtener el número de - bacterias mesófilas aerobias por gramo de muestra.

CUENTA TOTAL DE COLIFORMES: Se realiza el método anterior pero usando agar bílis rojo violeta (Fig. 1).

IDENTIFICACION DE COLIFORMES: La dilución 1:10 se inocula por estrías en agar EMB. Se incuba a 37°C por 24 horas - (Fig.1); se seleccionan las colonias fermentadoras de la lactosa y se inoculan en caldo Hajna; se incuba a 37°C y a partir de éste se procede a inocular los siguientes - medios: SIM(agar Azufre Indol Motilidad), TSI(agar Triple Azúcar Hierro), LIA(agar de Hierro y Lisina), MR(Rojo de Metilo), VP(Voges-Proskauer), SM(agar Simmons-Citrato) y Fenilalanina-Malonato. Se incuban a 37°C por 24 horas - (fig. 2) (14, 15, 16).

INTERPRETACION: Se observan los cambios ocurridos en los medios y se procede a realizar las siguientes pruebas: -

Prueba del Indol: Se agregan 4 gotas del reactivo de Kovac (R-1) a los medios Hajna y SIM.

Rojo de Metilo: Se agregan 4 gotas del reactivo rojo de metilo (R-2) al caldo MR-VP.

Voges-Proskauer: Se agregan 0.6 ml de Alfa-Naftol (R-3) y 0.2 ml de KOH-Creatina (R-4) al caldo MR-VP, se agita y se deja reposar por 20 min.

Se interpretan los resultados y se comparan con la tabla descrita por los autores "Edwards y Ewing" (7).

Fig. (1): TRATAMIENTO DE LA MUESTRA PARA LA CUENTA TOTAL DE BACTERIAS MESOFILAS AEROBIAS Y DE COLIFORMES

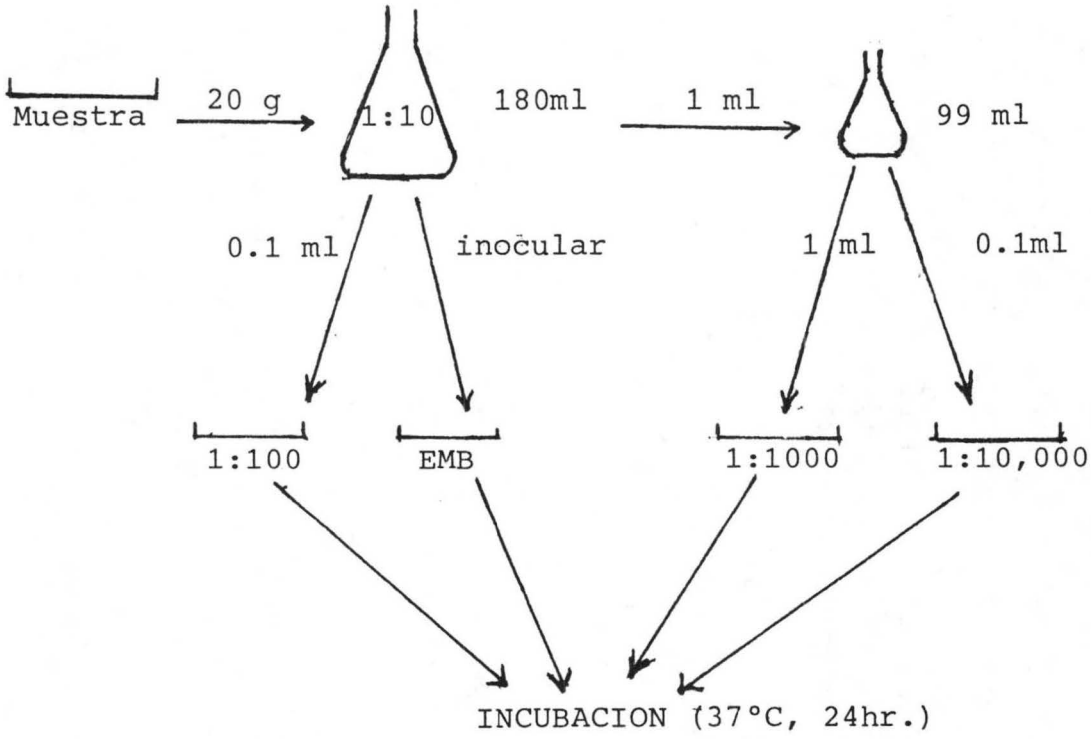
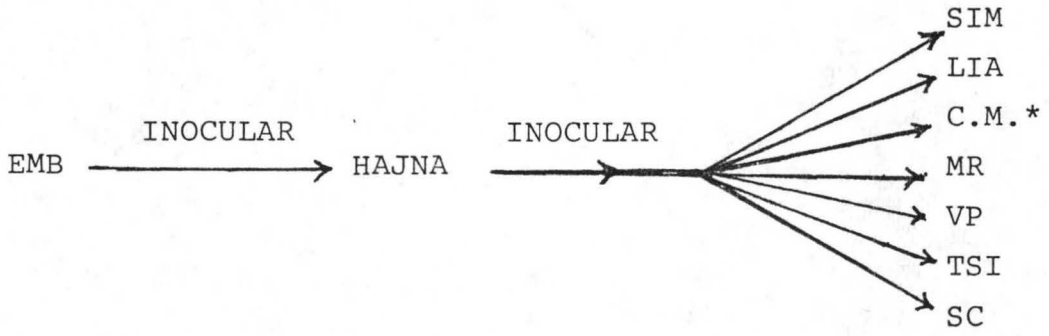


Fig. (2): LOS MEDIOS UTILIZADOS PARA LA IDENTIFICACION DE COLIFORMES.



*C.M.: Caldo Malonato

REACTIVOS:

R-1. Reactivo de Kovac:

Alcohol amílico	150 ml
p-dimetilaminobenzaldehido	10 g
Acido clorhídrico conc.	50 ml

Se disuelve el aldehído en el alcohol y se le agrega lentamenta el ácido.

R-2. Rojo de Metilo:

Rojo de Metilo	0.1 g
Alcohol etílico absoluto	300.0 ml
Agua destilada	200.0 ml

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

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

R-3. Alfa-naftol al 5%:

Alfa-naftol ..... 5 g

Alcohol etílico absoluto .....10 ml

Se disuelve el aldehído en el alcohol.

R-4. Solución de KOH-Creatina:

KOH ..... 40.0 g

Creatina ..... 0.3 g

Agua destilada .....100.0 ml

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

R E S U L T A D O S

La cuenta total de bacterias mesófilas aerobias y de coliformes de los 3 vegetales analizados, se muestran en las tablas I y II respectivamente.

Los resultados indican que la coliflor presentó el mayor contenido bacteriano, observándose una disminución significativa al aplicar el tratamiento del lavado.

En la tabla III se muestra en orden decreciente los microorganismos aislados y su distribución por vegetal. Se identificaron un total de 6 géneros bacterianos, siendo los más frecuentes Enterobacter - (42.30%), Citrobacter (13.46%) y Serratia (13.46%).

TABLA I

Comparación de la Cuenta Total de Bacterias Mesó filas Aerobias de Vegetales Lavados y sin Lavar.

Bacterias/g	No. de Muestras.					
	Zanahoria		Calabaza		Coliflor	
	S.L.*	L.*	S.L.	L.	S.L.	L.
$10^1 - 10^2$	0	0	0	13	0	2
$10^2 - 10^3$	0	0	0	0	0	0
$10^3 - 10^4$	1	5	0	4	0	6
$10^4 - 10^5$	3	10	0	1	0	8
$10^5 - 10^6$	3	1	11	0	4	2
$> 10^6$	9	0	7	0	14	0
TOTAL	16		18		18	

* S.L. : Sin Lavar

* L. : Lavar.

TABLA II

Comparación de la Cuenta Total de Coliformes de Vegetales Lavados y Sin Lavar

Bacterias/g	No. de Muestras					
	Zanahoria		Calabaza		Coliflor	
	S.L.*	L.*	S.L.	L.	S.L.	L.
$10^0 - 10^1$	7	11	8	16	7	14
$10^1 - 10^2$	0	2	0	0	0	1
$10^2 - 10^3$	0	3	0	1	0	1
$10^3 - 10^4$	4	0	2	1	1	0
$10^4 - 10^5$	1	0	3	0	4	2
$10^5 - 10^6$	0	0	2	0	4	0
$> 10^6$	4	0	3	0	2	0
TOTAL	16		18		18	

* S.L.: Sin Lavar

* L.: Lavar

TABLA III

Distribución de los Géneros Aislados del Total de Muestras

Género	No. de Aislamientos	% del Total de Muestras	Zana.*	Cala.*	Coli.*
Enterobacter	22	42.30	5	8	9
Citrobacter	7	13.46	3	2	2
Serratia	7	13.46	0	2	5
Klebsiella	5	9.61	2	2	1
Hafnia	4	7.70	2	2	0
Providencia	1	1.92	0	1	0

* Zana. : Zanahoria

* Cala. : Calabaza

* Coli. : Coliflor

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Con el objeto de evitar la contaminación externa, los vegetales analizados se transportaron al laboratorio en su empaque original, así como también se manejaron y procesaron en forma aséptica. En base a ésto, los resultados indican que los microorganismos presentes deben provenir del suelo, del agua de riego, de los fertilizantes y/o del manejo proporcionado en el mercado.

Las tablas I y II muestran recuentos de bacterias mesófilas aerobias y de coliformes en orden decreciente en la coliflor, la calabaza y la zanahoria respectivamente, lo cual podría explicarse si se toma en cuenta la morfología y textura de cada vegetal. Estos factores también pueden considerarse respecto a la disminución del contenido bacteriano que se observó después de efectuar el lavado.

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

Por otra parte, comparando las bacterias identificadas en la Tabla III con los resultados obtenidos por Charles - Wrigth y col. al analizar vegetales frescos para ensaladas, se puede apreciar la semejanza que existe, ya que en ambos casos el género aislado con mayor frecuencia fue Enterobacter.

Además la presencia de enterobacterias en todas las muestras analizadas, indica que estos microorganismos contribuyen a la flora natural de los vegetales. Sin embargo, en algunos casos, estos géneros pueden ser potencialmente patógenos para el hombre (17).

En relación al contenido de organismos coliformes, los resultados indican que no es conveniente ingerir vegetales - frescos sin lavar, debido a que la presencia de éstos refleja una posible contaminación fecal que puede conducir - en determinado momento a la aparición de enfermedades diarreicas, ya que se ha demostrado que algunas especies tienen la capacidad de producir enterotoxinas y por otra parte a la presencia de bacterias, virus o parásitos patógenos para el hombre.

Por tal motivo se recomienda lavar los vegetales frescos - para reducir el número de microorganismos presentes o en su defecto someterlos a un proceso de cocción.

Para mejorar la calidad microbiológica de los vegetales y contribuir a prolongar su vida de anaquel, es necesario - realizar un lavado a fondo utilizando detergentes, desinfectantes u otros agentes químicos o someterlos a procesos de conservación como la refrigeración o congelación.

En las industrias alimenticias que involucran a los vegetales el lavado es una etapa muy importante del proceso - debido a que contribuye a reducir la carga microbiana. En algunos casos se efectúa utilizando cepillos u otros instrumentos para eliminar las manchas y residuos de tierra adheridos a la superficie de los mismos, ya que el uso exclusivo del agua corriente no es tan eficiente.

En base a lo anterior, se puede concluir que el lavado o cocido de los vegetales son procesos importantes que deben realizarse para reducir el contenido bacteriano y de esta forma evitar que estos alimentos constituyan una - fuente de infección para el hombre.

R E S U M E N

Se analizaron 52 muestras de vegetales frescos (coliflor, zanahoria y calabaza), lavados y sin lavar, mediante los métodos de cuenta total de bacterias mesófilas aerobias y el recuento e identificación de coliformes con el objeto de establecer la variación en el contenido bacteriano.

Se encontró que la coliflor fue el vegetal con el mayor contenido bacteriano.

Asimismo, se observó una disminución en el número de bacterias después de efectuar el lavado de las muestras. Los géneros identificados con mayor frecuencia fueron: *Enterobacter* (42.30%), *Citrobacter* (13.46%), y *Serratia* (13.46%).

B I B L I O G R A F I A

1. Benson, J. H. 1973. Microbiological Applications. 2nd. ed. WCB. U.S.A.

2. Boyd, F. R. 1980. General Microbiology. Times Mirror Mosby, Va.

3. Brink, A. R. 1949. Vegetable Crops. Mc-Graw Hill, -- U.S.A.

4. Carbajal, S. G. y otros. 1984. Elaboración de Frutas y Hortalizas. 3a. ed. Trillas, México.

5. Desrosier, W. N.1983. Elementos de Tecnología de Alimentos. CECSA, México.

6. Edmond, B. J. 1978. Principios de Horticultura - 3a. ed.CECSA, México.

7. Finegold, S. M. and W. J. Martin. 1982. Diagnostic Microbiology. 6th. ed. Mosby Co., Saint - Louis, Mo.

8. Flores, R. I. 1979. Laboratorios de Cultivo Intensivos. ITESM, Monterrey, México.

9. Frazier, C. W. 1976. Microbiología de los Alimentos. 2a. ed. ACRIBIA, Zaragoza, España.

10. Icaza, J. S. 1981. Nutrición. 2a. ed. Interamericana, México.

11. Marcos, F. 1982. Fibra Vegetal en la Dieta. Tecnología de Alimentos. 17: 22 - 23.

12. Messiaen, M. C. 1979. Las Hortalizas. Editorial - Blume, México.

13- Rodríguez, M. 1980. Manual de Laboratorio de Microbiología Médica. U.A.N.L., Monterrey, México.

14. Silliker, J.H. 1981. Microbial Ecology of Foods. Vol. 2. Academic Press, New Nork.

15. Weiser, H. H. 1963. Practical Food Microbiology - and Technology. AVI, Connecticut.

16. Werner de García, B. y otros. 1978. Microbiología de Vegetales: I. Patógenos potenciales Gram - negativos en lechuga, escarola y berro. Rev. - Lat. Microbiol. 20: 201 - 203.

17. Wright, C. et al. 1975. Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Recovered from Vegetable Salads. App. Env. Microbiol. **31**: 453 - 454.

900570