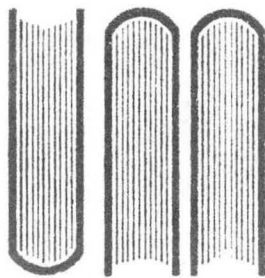


UNIVERSIDAD DE MONTERREY

DIVISION DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS



UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

"ANALISIS MICROBIOLOGICO DE VEGETALES FRESCOS"

901784

REPORTE DEL PROGRAMA DE EVALUACION
FINAL

QUE PRESENTA:

JUAN JOSE PEREZ SALAZAR

QUE EN OPCION AL TITULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS

Vo Bo.
Ma. Lourdes Intz. M.

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1984

BIBLIOTECA UNIVERSIDAD DE MONTERREY

OAO.664
P43Ba
1984
C.B

(D)52606

*Con cariño y gratitud para mi tía
Srta. Alicia Pérez Rodríguez.*

*Con admiración por todo su apoyo
para mi hermana L.A.E. Raquel I.
Pérez Salazar.*

*Con amor y veneración para mi madre
Sra. Hortensia S. Vda. de Pérez.*

Agradezco muy especialmente a la Q.F.B.
Srta. Ma. de Lourdes Martínez Macouzet
por su interés dedicado a la asesoría
de este trabajo.

INDICE

	<u>PAG.</u>
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	8
RESULTADOS	15
DISCUSION Y CONCLUSIONES	19
RESUMEN	23
BIBLIOGRAFIA	24

INTRODUCCION

En los últimos años, la atención de los microbiólogos en alimentos se ha enfocado hacia los diferentes vegetales que se consumen crudos, debido a que pueden llegar a ser fuentes de infección de microorganismos patógenos para el hombre (2).

Del interior de algunos vegetales se han podido aislar gérmenes viables, pero generalmente es en su superficie donde se localizan éstos y comprenden no sólo la flora normal, sino también los procedentes -- del suelo y el agua, e incluso patógenos de los vegetales (4).

El número de bacterias varía dependiendo del vegetal y del medio en que se encuentre y fluctúa desde unos cientos o miles hasta millones por centímetro cuadrado de superficie del vegetal (7).

Entre los géneros normalmente presentes se encuentran: Achromobacter, Alcaligenes, Bacillus, Bacterium, Enterobacter, Flavobacterium, Lactobacillus, Leuconostoc, Micrococcus, Sarcina, Serratia, Staphylococcus y Streptococcus. Los géneros Erwinia, Pseudomonas y Xanthomonas, entre otros, contienen las bacterias patógenas de los vegetales. Además poseen levaduras y hongos (2,4,7).

En general, los microorganismos presentes con mayor frecuencia en los vegetales pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, pero también hay géneros que pertenecen a las familias Pseudomonadaceae, Achromobacteriaceae, Micrococaceae, etc.

Los miembros de la familia Enterobacteriaceae son bacilos Gram negativos, no esporulados, muchos de los cuales son móviles y otros inmóviles (Klebsiella, Shigella). Las especies móviles poseen flagelos peritricos, a diferencia de los miembros de la familia Pseudomonadaceae, que poseen flagelos polares como medio de locomoción. Son aerobios y anaerobios facultativos, fermentan la glucosa y otros carbohidratos con producción de ácido o ácido y gas y usualmente reducen los nitratos a nitritos (3).

Esta familia esta compuesta por diversos grupos de organismos que varían en su estructura antigénica y en sus propiedades bioquímicas, en base a las cuales se han establecido los diferentes géneros y especies.

Estos organismos habitan en el intestino del hombre y animales, en las plantas y en el suelo. Algunos son parásitos, pero la mayoría son saprófitos (que viven de sustancia orgánica en descomposición) (4).

Algunos de los géneros que forman parte de esta familia son: Escherichia, Edwardsiella, Enterobacter, Salmonella, Shigella, Klebsiella, Arizona, Citrobacter, Hafnia, Serratia, Proteus y Providencia. Se ha dividido a esta familia en dos grupos en base a su capacidad para fermentar la lactosa, considerando a los no fermentadores como los - patógenos intestinales, sin embargo esta separación no es adecuada, pues existen microorganismos que no degradan este carbohidrato y que no causan daño intestinal.

Las enterobacterias no son exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales y pueden crecer en medios de cultivo sencillos. Los medios más útiles para su aislamiento son los que contienen bilis, - ya que inhiben la mayor parte de los bacilos y cocos Gram positivos. La presencia de un indicador y de lactosa en el medio, permite reconocer fácilmente al grupo que fermenta este carbohidrato, al cual se le ha denominado "coliforme". La especie más representativa de los organismos coliformes es Escherichia coli, la cual forma parte de la flora normal del intestino (1,3,5).

La contaminación de los vegetales generalmente proviene del suelo y del agua de riego, sin embargo puede ocurrir después de ser recolectada

dos. Cuando los vegetales comestibles se riegan y fertilizan con aguas residuales o negras sin tratamiento previo, existe el peligro de una contaminación debido a que pueden contener millones de bacterias por mililitro, entre las que se encuentran enterobacterias, estreptococos, bacilos anaerobios esporulados y otras bacterias que proceden del intestino. Cuando se detectan microorganismos de este origen en los vegetales se dice que han sufrido contaminación fecal que puede causar enfermedades gastrointestinales desde leves hasta severas (4,5).

Después de recolectados los vegetales pueden contaminarse por diversas fuentes como recipientes mal lavados, agua de lavado empleada anteriormente, otros vegetales alterados, personas encargadas de su manejo y público consumidor (4).

El lavado a fondo de los vegetales los libera de la mayoría de los contaminantes de la superficie pero deja una gran parte de la flora normal. En ocasiones se emplea agua clorada, solución de bórax, detergentes u otros germicidas que reducen la carga bacteriana. La refrigeración previa y su transporte frigorífico, permite que se conserven durante más tiempo. Cuando se le añade hielo a los recipientes de los vegetales, éste les da un aspecto de frescura temporal, pero existe el riesgo de que pueda contener bacterias psicrófilas que aumentan el número de microorganismos (4).

El deterioro sufrido por los vegetales puede deberse a causas físicas

como traumatismos, a la acción de sus propias enzimas, a la acción micro**biana, o a la combinación de estos factores; también pueden ser alterados por aves, roedores, insectos y otros parásitos. El daño causado por patógenos vegetales puede ocasionar que la parte comestible de la planta sea inutilizable o pueda abrir el camino al crecimiento de saprófitos que causan su alteración.**

El tipo de alteración microbiana depende no sólo de la clase de vegetal de que se trate, sino también de la variedad y se lleva a cabo por dos mecanismos: la degradación de los compuestos principales del vegetal y la síntesis de sustancias como pigmentos y mucílagos.

El deterioro de origen microbiano puede ser debido a: a) la acción de los microorganismos patógenos sobre cualquier parte del vegetal que sea comestible, b) microorganismos saprófitos que pueden producir una invasión secundaria a la de los patógenos, penetrar en una vegetal sano o multiplicarse en la superficie, como es el caso de las bacterias coliformes, c) la acción consecutiva de varios saprófitos.

Una de las alteraciones más comunes es la "putrefacción blanda bacteriana" producida por Erwinia carotovora y especies relacionadas que degradan la pectina. Este microorganismo produce un aspecto mojado, una consistencia blanda y frecuentemente un olor desagradable. Algunas especies saprófitas producen mucosidad y acidez en vegetales almacenados en lugares húmedos y calientes (4,5).

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 Re cu en to e I de n t i f i c a c i o n de co l i f o r m e s.

Estudios realizados por diversos investigadores han demostrado que los vegetales adquiridos en el mercado y que se consumen crudos, contienen cifras altamente significativas de microorganismos, entre los que se encuentran bacilos Gram negativos y coliformes (7).

Al analizar muestras de ensaladas que se consumían en hospitales, - Wrigth y col. (8) encontraron que Enterobacter agglomerans fue el microorganismo aislado con mayor frecuencia, siguiéndole E. cloacae, Klebsiella, E. aerogenes, y tres especies de Serratia. Las bacterias que se aislaron en menor proporción fueron Escherichia coli, Citrobacter y Proteus.

En base a la alta frecuencia de aislamiento de los miembros del grupo Klebsiella-Enterobacter-Serratia, los autores concluyeron que estos mi cro o r g a n i s m o s forman parte de la flora normal de los vegetales y que no son necesariamente contaminantes de origen humano.

Debido a que los vegetales son parte esencial de la dieta en nuestro país y que pueden ser fuente de infección si se consumen crudos, el objetivo de este trabajo es realizar un análisis bacteriológico de zanahoria, calabaza y coliflor, con el fin de evaluar su grado de aceptación para el consumo humano.

MATERIALES Y METODOS

Para realizar este trabajo se recolectaron 60 muestras de vegetales frescos (zanahoria, calabaza y coliflor) de diferentes supermercados de los municipios de Monterrey y Garza García, N.L., en el transcurso de los meses de Enero a Abril de 1984. Los vegetales se analizaron en el Laboratorio de Microbiología de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Monterrey.

A cada una de las muestras se les realizó la Cuenta Total de bacterias y la Cuenta e Identificación de coliformes.

I.- RECOLECCION. Las muestras se adquieren en los lugares de expendio y se transportan directamente al laboratorio en sus empaques originales.

II.- TRATAMIENTO DE LA MUESTRA. Se corta la superficie de la muestra con un bisturí estéril y se pesan 10 gramos. Se transfieren a un matraz conteniendo 90 ml de solución Ringer estéril (R1). Se agita y se deja reposar por espacio de media hora, después de la cual se preparan diluciones 1:100 y 1:1000.

III.- CUENTA TOTAL DE BACTERIAS. Se toma una alícuota de 1 ml de las diluciones 1:100 y 1:1000, se transfiere al centro de cajas de Petri estériles, se añade asépticamente Agar para Métodos Estándares a 55 °C y se mezcla por rotación, se incuban a 37 °C durante 48 horas. Se cuentan el número de colonias de las cajas de Petri que contengan entre 30 y 300 colonias y se multiplica por la dilución, para obtener el número de bacterias por gramo de muestra.

IV.- CUENTA DE COLIFORMES. Se toma una alícuota de 0.1 ml de las diluciones 1:100 y 1:1000, se transfiere a cajas de Petri conteniendo agar Eosina Eosina Azul de Metileno (EMB) y se distribuye por medio de una varilla de vidrio estéril. Se incuban a 37 °C durante 48 horas. Se cuentan las colonias de las cajas que contengan 100 colonias, se multiplica por 10 y por la dilución para obtener el número de bacterias coliformes por gramo de muestra.

V.- IDENTIFICACION DE COLIFORMES. De las cajas de Petri que se utilizan en la cuenta de coliformes, se toma con Asa bacteriológica recta el centro de cada colonia diferente, se inocula en caldo MR-VP y se incuba a 37 °C por 24 horas.

Después de incubar el caldo MR-VP, se inocula un sistema bioquímico para cada cultivo puro, éste consta de los siguientes medios: SIM (agar Azufre Indol Motilidad), Rojo de Metilo, agar Simmons Citrato, TSI (agar Triple Azúcar Hierro), LIA (agar de Hierro y Lisina), MIO (agar Motilidad Indol Ornitina), Caldo de Malonato y Caldo Urea. Se incuban los medios a 37 °C por 24 horas.

Se observan los cambios ocurridos en los medios y se realizan las siguientes pruebas:

Prueba de Indol: Se agregan unas gotas del Reactivo de Kovacs (R2) a los medios SIM y MIO.

Prueba del Rojo de Metilo: Se agregan unas gotas del Reactivo Rojo de Metilo (R3) al medio MR-VP.

Prueba de Voges-Proskauer: Se le añaden 0.6 ml de Alfa Naftol al 5% (R4) y 0.2 ml de solución KOH-creatina (R5) al medio MR-VP. Se agita y se deja reposar por 20 minutos.

Se interpretan los resultados y se identifican las bacterias aisladas en base a las tablas realizadas por Bailey & Scott, Rodríguez y otros (3,6).

Fig.1 Interpretación de los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas

Prueba	Medio Utilizado	Resultados	
		Positivo	Negativo
Producción de Indol	SIM, MIO	Anillo rojo	Anillo amarillo
Producción de Acetilmetilcarbinol	MR-VP	color rojo	color amarillo
Rojo de Metilo	MR-VP	color rojo	color amarillo
Utilización del citrato	Simmons citrato	color azul	color verde
Fermentación de la glucosa	TSI	(s) roja (f) amarillo	anaranjado
Fermentación de lactosa y/o sacarosa	TSI	(s) y (f) amarillos	anaranjado
Descarboxilación de la Ornitina	MIO <i>de Ornitina</i>	morado	amarillo
Descarboxilación de la Lisina	LIA	lila	amarillo
Desaminación de la Lisina	LIA	(s) vino (f) amarillo	amarillo

Prueba	Medio Utilizado	Resultados	
		Positivo	Negativo
Utilización del malonato	Caldo de Malonato	color azul	color verde
Producción de ureasa	Caldo urea	color rojo	color rosa
Producción de H ₂ S	SIM, TSI, LIA	color negro	color original del medio
Motilidad	MIO, SIM	Crec. en todo el medio o Turbidez del medio	Crecimiento <u>so</u> lo en la línea de inoculación

(s) superficie

(f) fondo

REACTIVOS

(R1) 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 minutos.

(R2) Reactivo de Kovacs

Alcohol amílico	150.00 ml
p-dimetilaminobenzaldehido	10.00 g
HCl concentrado	50.00 ml

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

(R3) 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.

(R4) Alfa Naftol al 5%

Alfa Naftol	5.00 g
Alcohol Etílico absoluto	100.00 ml

Se disuelve el aldehido en el alcohol.

(R5) *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 añade la creatina.

RESULTADOS

El valor de la Cuenta Total de bacterias aerobias y el de coliformes se presenta en las Tablas 1 y 2 respectivamente. El vegetal con mayor recuento fue la calabaza en ambos casos.

En la Tabla 3 se muestran los géneros aislados en orden de frecuencia y su distribución por vegetal.

Se identificaron 10 géneros bacterianos, siendo Enterobacter, Pseudomonas y Acinetobacter los más frecuentes.

TABLA 1
Cuenta Total de Bacterias Aerobias de
vegetales frescos

Bacterias/g	No. de muestras		
	Calabaza	Coliflor	Zanahoria
$10^1 - 10^2$	0	0	1
$10^2 - 10^3$	0	5	0
$10^3 - 10^4$	0	5	3
$10^4 - 10^5$	2	8	9
$10^5 - 10^6$	15	1	3
10^6	3	1	4
Total	20	20	20

TABLA 2

Cuenta Total de Bacterias Coliformes

Bacterias/g	No. de muestras		
	Calabaza	Coliflor	Zanahoria
$10^1 - 10^2$	0	0	0
$10^2 - 10^3$	0	0	0
$10^3 - 10^4$	0	1	0
$10^4 - 10^5$	4	16	3
$10^5 - 10^6$	10	1	3
10^6	6	1	3
No Determinado	0	1	11
Total	20	20	20

TABLA 3

Géneros aislados del total de muestras
y su distribución por vegetal

Género	No. de Aislamientos	Frec. * Porcentual	Zanahoria	Coliflor	Cala baza
<u>Enterobacter</u>	25	41.66%	9	13	3
<u>Pseudomonas</u>	17	28.33%	10	1	6
<u>Acinetobacter</u>	12	20.00%	1	0	11
<u>Citrobacter</u>	9	15.00%	0	2	7
<u>Providencia</u>	8	13.33%	0	4	4
<u>Klebsiella</u>	5	8.33%	0	1	4
<u>Serratia</u>	3	5.00%	0	2	1
<u>Alcaligenes</u>	2	3.33%	0	2	0
<u>Arizona</u>	2	3.33%	0	1	1
<u>Proteus</u>	1	1.66%	0	0	1

* Total de muestras: 60

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los vegetales fueron transportados y analizados en el laboratorio - asépticamente evitando de esta forma cualquier fuente de contaminación externa, lo que permite establecer que los microorganismos aislados e identificados provienen del suelo, del agua de riego y/o del inadecuado manejo en el mercado.

Los resultados obtenidos demuestran que los vegetales adquiridos en el mercado y que se consumen crudos contienen cifras significativas de gérmenes y una gran variedad de bacilos Gram negativos.

De los vegetales estudiados, la calabaza presentó el mayor recuento, debido probablemente a que la parte comestible de este vegetal está en contacto con el suelo, a partir del cual se puede contaminar,

El valor de la cuenta de bacterias aerobias y el de coliformes fue mayor al determinado por Ercolani (2) y Werner y col. (7), quizá - porque estos autores analizaron otro tipo de vegetales y desconocemos las condiciones de cultivo, obtención, transporte y manipulación; factores que influyen en el grado de contaminación.

Respecto a los bacilos Gram negativos identificados, la mayoría de ellos pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, los cuales constituyen gran parte de la flora normal aerobia del intestino del hombre. Sin embargo, no se aisló Escherichia coli, cuya presencia en los alimentos se ha aceptado como indicador de contaminación fecal.

Por esta razón podemos concluir que estos microorganismos provienen de otras fuentes o corresponden a la microflora natural de los vegetales.

No obstante, debemos tener presente, que la alta incidencia de las enterobacterias puede involucrar un riesgo para la salud del hombre, pues cada día se asocian con mayor frecuencia a enfermedades entéricas y son las responsables de la mayoría de las infecciones adquiridas en los hospitales, particularmente las de vías urinarias, biliares, de pulmón, de meninges y septicemias.

En relación al género Pseudomonas, la mayoría de las especies habitan el suelo y agua jugando un papel importante en la descomposición de la materia orgánica. Varias especies son patógenas de vegetales y animales, mientras que la mayor parte de ellas no infectan al hombre. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos pueden actuar como patógenas oportunistas y causar enfermedades severas, Green y col. han demostrado que la principal fuente de infección son los vegetales (8).

Con referencia al recuento de coliformes, se debe mencionar que en algunos casos no se logró determinar el número de bacterias, posiblemente porque la superficie de la placa no se encontraba libre de humedad, lo que ocasionó la confluencia del desarrollo bacteriano. Se utilizó el método de extensión en superficie ya que el medio diferencial EMB no es transparente, lo que dificultaría el recuento al utilizar otro método y por otro lado, para propósitos de identificación se requieren colonias aisladas en la superficie

González (4'), realizó un estudio similar en vegetales congelados y encontró que el recuento de bacterias aerobias y coliformes fue menor al que ahora se presenta, esto es debido a que durante el proceso del congelado se destruye un gran número de gérmenes. Los géneros identificados concuerdan con los reportados por el autor.

Debido a lo anterior, se recomienda que antes de ingerir los vegetales sean sometidos a un minucioso lavado con agua corriente, para evitar - enfermedades gastrointestinales y asegurar la salud pública.

RESUMEN

Se analizaron un total de 60 muestras de vegetales frescos mediante los métodos de la Cuenta Total de bacterias aerobias y el Recuento e Identificación de coliformes.

Se encontró que la calabaza fue el vegetal con mayor carga bacteriana. Los géneros aislados más frecuentemente fueron Enterobacter, - Pseudomonas y Acinetobacter en un 41.6%, 28.3% y 20% respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Collins, C.H. 1969. *Métodos Microbiológicos*. 2a ed.
Ed. Acribia, España.

- 2.- Ercolani, G.L. 1976. Bacteriological quality assesment of
fresh marketed lettuce and fennel. *Appl. Environ. Mi-
crobiol.* 31: 847 - 852.

- 3.- Finegold, S.M., and W.J. Martin. 1982. *Diagnostic Microbio-
logy*. 6th ed. Mosby Co., St. Louis, Mo.

- 4.- Frazier, W.C. 1976. *Microbiología de los Alimentos*. 2a ed.
Ed. Acribia, España.

- 4.- González, R.M. 1983. Estudio Microbiológico de Vegetales Congelados. Universidad de Monterrey.
- 5.- Pelczar, W.I., R.D. Reid y E.C.S. Chan. 1977. Microbiología. 4a ed. McGraw-Hill. México.
- 6.- Rodríguez, M.A. 1976. Microbiología Médica, Manual de Laboratorio. Fac. de Medicina, UANL, Monterrey, N.L.
- 7.- 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.
- 8.- Wriqth, Ch., S.D. Kominos and R.B. Yee. 1976. Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa Recovered from Vegetables Salads. Appl. Environ. Microbiol. 31: 453 - 454.

901784