



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE LO ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS

**Calidad microbiológica de hortalizas que se expenden en el  
Mercado Principal de la ciudad de Mérida, Estado Mérida.**

Trabajo de grado para optar al título de Licenciado en Bioanálisis.

**Autores:**

Flores V. Beatriz C.  
C.I 18.297.145

Quintero G. Yerlene I.  
C.I 18.798.326

**Tutor:**

Prof. Félix Daniel Andueza

Mérida-Venezuela  
2014

## ÍNDICE

	Pág.
Resumen.....	i
INTRODUCCION.....	1
<b>CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
1.1 Hortalizas, generalidades y tipos.....	4
1.2 Estructura y composición química de las hortalizas.....	6
1.3 Siembra, cosecha y procesamiento de las hortalizas.....	10
1.4 Microbiología de las hortalizas.....	14
1.5 Enfermedades transmitidas por hortalizas.....	20
<b>CAPÍTULO II. ANTECEDENTES DE LA HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
II.1. Antecedentes de la hipótesis.....	25
II.2. Justificación.....	27
II.3. Hipótesis.....	28
II.4. Objetivo general.....	29
II.5. Objetivos específicos.....	29
<b>Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
III.1. Materiales.....	30

<b>A. Población muestral.....</b>	<b>30</b>
<b>B. Medios de cultivos.....</b>	<b>31</b>
<b>C. Reactivos.....</b>	<b>31</b>
<b>III.2. Metodología.....</b>	<b>32</b>
<b>III.2.1. Preparación de dilución 1:10.....</b>	<b>32</b>
<b>III.2.2. Cuantificación del número de bacterias aerobias mesófilas en tres especies de hortalizas que se expenden en el Mercado Principal de la Ciudad de Mérida.....</b>	<b>32</b>
<b>III. 2.3. Enumeración de la cantidad de organismos coliformes totales y fecales en tres especies de hortalizas que se expenden en el Mercado Principal de la Ciudad de Mérida.....</b>	<b>33</b>
<b>III.2.4. Identificación de las colonias bacterianas aisladas.....</b>	<b>33</b>
<b>Tinción de Gram.....</b>	<b>34</b>
<b>Morfología de la colonia y producción de pigmento.....</b>	<b>34</b>
<b>Oxidación-fermentación de la glucosa.....</b>	<b>34</b>
<b>Galerías API 20 NE, 20E y Staphi.....</b>	<b>34</b>
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>CAPITULO V. DISCUSION DE RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>61</b>

## RESUMEN

Conocer la calidad microbiológica de las hortalizas tales como: lechuga, cilantro y perejil resulta de gran relevancia. Es por ello, que el control de la calidad microbiológica de las hortalizas de consumo, requieren análisis dirigidos a determinar la presencia de microorganismos patógenos, entre ellos, las bacterias que causan enfermedades con diferentes niveles de gravedad. Para determinar la calidad microbiológica de las hortalizas que se expenden en el Mercado Principal de Mérida, Estado Mérida, se analizaron 5 muestras mensuales, obteniendo un total de 10 muestras tomadas de forma arbitraria de varios establecimientos; encontrándose que las muestras que presentan mayor cantidad de UFC/gr son los cilantros. Se encontró que en relación a la presencia de Coliformes Totales, se logró determinar la presencia de estos en todas las muestras estudiadas, con rango entre 6400UFC/gr. Y 64UFC/gr. De estas 10 muestras, 4 resultaron puras (Bacilos Gram negativos) y al ser analizadas se logró identificar mediante la prueba microbiológica API 20E a las siguientes bacterias *Pantoea spp*, *Aeromona hydrophila* y *Enterobacter amnigenus*.

**Palabras claves:** Hortalizas, Calidad de hortalizas, Bacterias.

## INTRODUCCION

Los considerables beneficios para la salud humana relacionados con la ingesta de vegetales frescos ha favorecido la demanda mundial de estos productos. Sin embargo, en las últimas décadas, el aumento de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) asociadas con el consumo de alimentos frescos, ha conducido a las autoridades sanitarias a considerar estas patologías como un problema de salud pública [1].

Los reportes de brotes de ETA asociados a productos agrícolas en países industrializados constituyen un porcentaje relativamente bajo, aunque en los últimos años, el número de casos ha aumentado [1]. No obstante, en países subdesarrollados las ETA causadas por contaminación de hortalizas son frecuentes y en algunas áreas pueden causar una gran proporción de enfermedad, pero debido a la falta de registros sanitarios, la mayoría de estas epidemias no se detectan y la literatura científica reporta muy pocos brotes [2].

Una gran variedad de factores contribuye a la contaminación de hortalizas por microorganismos causantes de enfermedades a los humanos. Algunos de los factores que pudieran considerarse de riesgo en la calidad microbiológica de los productos frescos incluyen: globalización de los suministros de alimentos,

introducción inadvertida de patógenos en nuevas áreas geográficas, desarrollo de nuevos factores de virulencia microbiana y cambios en los hábitos alimenticios [3-5], el uso de agua de riego contaminada con heces fecales de humanos y animales; procesos inadecuados en los campos de cultivo; prácticas deficientes de desinfección; condiciones inapropiadas durante empaque; higiene deficiente de los trabajadores; y el mal manejo durante almacenamiento y transporte. Aunado a todo esto, una vez que ocurre la contaminación, muchos microorganismos patógenos poseen la capacidad de sobrevivir por largos períodos de tiempo en hortalizas frescas. Algunos microorganismos también son capaces de sobrevivir a procesos de desinfección, e incluso de multiplicarse en el producto durante su almacenamiento.

En la actualidad el consumo de hortalizas crudas se ha visto incrementado por el cambio de estilo de vida en la personas, al no tener tiempo para preparar alimentos recurren a la alimentación de comidas rápidas como las ensaladas, trayendo como consecuencias que no se traten adecuadamente las hortalizas es decir, tenga una buena manipulación en cuanto lavado y limpieza, causando estas graves enfermedades de transmisión alimentaria.

Diversos autores han reportado el aislamiento de microorganismos patógenos en vegetales como alfalfa, brócoli, lechuga, coliflor, cilantro, repollo, perejil. Los patógenos aislados a partir de productos frescos incluyen bacterias, helmintos, protozoarios y virus como Hepatitis A, Norwalk y Rotavirus [3,6-15].

En vista de que la microflora de los vegetales frescos varía ampliamente y refleja las condiciones de cultivo, así como, las condiciones sanitarias durante el procesamiento y comercialización; es necesaria la evaluación de la calidad microbiológica de estos productos, a fin de asegurar la ausencia de microorganismos patógenos y la inocuidad de los mismos [16,17].

Debido a la importancia de los vegetales frescos como fuente de ETA y el aumento del consumo de hortalizas, el presente trabajo tiene como finalidad analizar la calidad microbiológica de hortalizas que tienen mayor consumo en el estado Mérida para poder conocer los posibles riesgos y aplicar estrategias de prevención previa a su consumo.

bdigital.ula.ve

## **CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO.**

### **1.1 Hortalizas, generalidades y tipos.**

Las hortalizas son plantas herbáceas o subleñosas, destinadas a la alimentación humana que pueden ser consumidas frescas o sin pasar por un proceso industrial previo; en general, sus productos son muy perecederos. Existen unas 247 especies hortícolas, de las cuales 3 son de importancia en nuestra investigación. Estas son: Lechuga, perejil y cilantro [18].

Las hortalizas son la parte comestible de las plantas que se consumen con el plato principal de las comidas o cenas, como ensaladas o en sopas. Se pueden transformar en bebidas o almidones vegetales, comerse crudas o ligeramente procesadas, desecadas, en encurtidos o congeladas. Aportan a las dietas sus características propias de sabor, color y textura y sufren cambios durante el almacenamiento y cocinado. Situándose cerca de los cereales arroz, maíz y trigo [19].

Los vegetales aportan a la alimentación y nutrición las sales y vitaminas que juegan un papel importante desde el punto de vista fisiológico para el hombre. El contenido de nutrientes de las hortalizas es variable ya que va a depender de la naturaleza del vegetal y es muy difícil su cuantificación química dado a la dificultad

técnica que significa aislarlo y evaluarlo. Entre los aportes mas importantes como nutrientes tenemos los glúcidos o carbohidratos, ácidos orgánicos tales como: málico, cítrico tartárico y oxálico; además de fibras y algunas vitaminas como la A, E, K, B2, C y ácido fólico [20,21].

El consumo de hortalizas es vital para la salud humana puesto que poseen numerables propiedades alimenticias, sin embargo por sus características físicas y de cultivo, algunos de estos productos están expuestos a contaminación de tipo biológico y químico, situación que genera un riesgo para la salud humana [22].

La seguridad e inocuidad de los alimentos, ha sido una de las mayores preocupaciones de la humanidad y de los antecedentes al respecto pueden rastrearse desde tiempo inmemorables [22].

Los tipos de hortalizas que encontramos son:

- Hortalizas de flor: la parte que utilizamos para nuestra alimentación está constituida por los órganos florales, unos ejemplos claros son el grupo de la alcachofa y la coliflor.

- Hortalizas de fruto: la parte comestible es el fruto, este puede ser recolectado en un estadio juvenil (pepinos, judías tiernas) o cuando haya alcanzado la madurez (tomate, sandía, pimiento).
- Hortalizas de semilla: son aquellas que nos comemos las semillas contenidas en los frutos (judías, habas, guisantes).
- Hortalizas de raíz: con este término se definen las hortalizas de las que se consume la parte enterrada, es decir, no solo la raíz sino también tubérculos o bulbos (nabo, rábano, patata, ajo) [22].
- Hortalizas de tallo: la parte comestible de estas hortalizas es el tallo, en algunos casos modificado, de plantas como el esparrago, el apio, el hinojo, el cardo y el ajo porro [22].

bdigital.ula.ve

## **1.2 Estructura y composición química de las hortalizas.**

➤ De acuerdo a su composición [23]:

- Agua: estas contienen una gran cantidad de agua, aproximadamente un 80% de su peso.
- Glúcidos: Según el tipo de hortalizas la proporción de hidratos de carbono es variable, siendo en su mayoría de absorción lenta. Según la cantidad de glúcidos las hortalizas pertenecen a distintos grupos:

1. Grupo A: Contienen menos de un 5 por ciento de hidratos de carbono. Pertenecen a este grupo la acelga, el apio, la espinaca, la berenjena, coliflor, la lechuga, el pimiento, el rábano, entre todas las demás son un conjunto de plantas en este caso verduras que ayudan a que crezcan más rápido y sin usar ningún químico.
  2. Grupo B: Contienen de un 5 a un 10 por ciento de hidratos de carbono (alcachofa, guisante, cebolla, nabo, ajo porro, zanahoria, remolacha).
  3. Grupo C: Contienen más del 10 por ciento de hidratos de carbono (patata, yuca).
- Vitaminas y minerales: La mayor parte de las hortalizas contienen gran cantidad de vitaminas y minerales y pertenecen al grupo de alimentos reguladores en la rueda de los alimentos, al igual que las frutas. La vitamina A está presente en la mayoría de las hortalizas en forma de provitamina. Especialmente en zanahorias, espinacas y perejil. También son ricas en vitamina C especialmente pimiento, perejil, coles de bruselas y brócoli. Encontramos vitamina E y vitamina K pero en mucha menos cantidad en guisantes y espinacas. Como representante de las vitaminas del grupo B tenemos el ácido fólico que se encuentra en las hojas de las hortalizas verdes. El potasio abunda en la remolacha y la coliflor; el magnesio en espinacas y acelgas; el calcio y el hierro está presente en cantidades pequeñas y se absorben con dificultad en nuestro tubo digestivo; el sodio en el apio.

- Sustancias volátiles: La cebolla contiene disulfuro dipropilo, que es la sustancia que hace llorar.
- Lípidos y proteínas: Presentan un contenido bajo de estos macronutrientes.
- Valor calórico: La mayor parte de las hortalizas son hipocalóricas. Por ejemplo 100 gramos de acelgas solo contienen 15 calorías. La mayoría no superan las 50 calorías por 100 gramos excepto las alcachofas y las patatas. Debido a este bajo valor calórico las hortalizas deberían estar presentes en un gran porcentaje en una dieta contra la obesidad.
- Fibra dietética: Del 2 al 10 parte del peso de las hortalizas es fibra alimentaria. La fibra dietética es pectina y celulosa, que suele ser menos digerible que en la fruta por lo que es preciso la cocción de las hortalizas para su consumo en la mayor parte de las ocasiones. La mayoría de las hortalizas son ricas en fibra (berenjena, coliflor, judías verdes, brócoli, escarola, guisante) [23].

➤ De acuerdo a su estructura [24]:

Las hortalizas y las frutas están compuestas de células simples y complejas. Las células simples tienen una función y estructura similar. Constituyen el tejido dérmico y el tejido parenquimatoso. El tejido dérmico es la capa sencilla externa de la superficie de las hojas, yemas jóvenes, raíces y flores. El parénquima constituye la mayor parte de la planta. La actividad molecular básica como la síntesis y el almacenamiento de carbohidratos por la luz solar (fotosíntesis) se produce en el tejido parenquimatoso [24].

El tejido complejo es el tejido vascular y los tejidos de soporte colénquima y esclerénquima que dan fuerza a las plantas. El principal tejido vascular está constituido por el xilema y floema. El xilema conduce el agua desde las raíces a las hojas, mientras el floema conduce nutrientes desde las hojas a las raíces. El tejido vascular puede estar localizado en el centro de algunas hortalizas, como las zanahorias, o en toda la planta. La planta está formada primariamente por un tejido parenquimatoso simple. Cada célula de tejido parenquimatoso está rodeada por una pared celular, producida por el protoplasto, que sirve de soporte y protege el contenido celular. Son las características de la pared celular las que determinan la forma y contenidos (retención, entrada, liberación) de las células parenquimatosas. Por ejemplo, cuando la pared es firme, la forma original y la textura de la célula se mantienen, y si la pared se destruye por corte, deshidratación o cocción, la pared se rompe y derrama su contenido en el ambiente que la rodea. Se pueden perder agua, azúcares o vitaminas hidrosolubles. Las plantas tienen una pared celular primaria hecha de celulosa, hemicelulosa y sustancias pépticas, incluyendo pectina. Las plantas maduras tienen una pared celular secundaria compuesta de lignina además de la celulosa, hemicelulosa y sustancias pépticas [24].

Dentro de la pared celular está el protoplasto. El protoplasto está compuesto de tres partes: la membrana plasmática, el citoplasma y los orgánulos. La membrana plasmática es el material que rodea a la célula funcional. El citoplasma incluye todo el contenido celular dentro de la membrana, pero fuera del núcleo. Los orgánulos incluyen el núcleo, la mitocondria, ribosomas y plastidios. Los plastidios

contienen el material liposoluble tal como las vitaminas liposolubles y los pigmentos liposolubles: clorofila y carotenoides [24].

Fuera de la pared celular, entre células adyacentes, está la lámina media. Este es el material cementante entre células adyacentes y contiene sustancias pécticas, magnesio, calcio y agua. El espacio intercelular contiene espacios de aire. Cada célula contiene una cavidad conocida como vacuola. Puede ser grande y, por lo tanto, constituir la mayor parte de las células parenquimatosas. Las vacuolas contienen agua y proporcionan a las células no cocidas la deseable textura crujiente. La savia celular hidrosoluble en la vacuola contiene vitaminas hidrosolubles (vitaminas B y vitaminas C), azúcares, sales inorgánicas, ácidos orgánicos (más en frutas que en hortalizas) y compuestos azufrados. Estos se pueden perder en el agua de cocción o el agua usada para remojar. Los pigmentos hidrosolubles de la savia celular incluyen los pigmentos flavonoides: las antocianinas y antoxantin [24].

### **1.3 Siembra, cosecha y procesamiento de las hortalizas.**

➤ **Siembra directa:**

Implica depositar la semilla en el lugar definitivo para que establezca las plantas a la distancia recomendada. Se recurre a este sistema principalmente en casos de

hortalizas que sufren mucho al ser trasplantadas o que el costo de su semilla no es elevado [25].

La siembra directa exige una buena preparación y nivelación del terreno para que la germinación sea satisfactoria, no menor al 80 por ciento y uniforme. Para que una semilla sea buena, debe estar limpia, tener buen poder germinativo, ser sana y responder en todo a la variedad; por lo tanto, debe comprarse en casas comerciales que posean buena reputación [25].

Se recurre a siembra directa en las siguientes hortalizas: arveja, cilantro, maíz, melón, mostaza, rábano, remolacha, tomate, yuca, zanahoria. Es recomendable hacer pruebas de germinación, antes de efectuar la siembra directa, para evitar pérdidas correspondientes a la limpieza y preparación del terreno, uso de fertilizantes, tiempo y mano de obra empleados en esas labores [25].

Para efectuar pruebas de este tipo, puede usarse un recipiente pequeño, tal como un plato, se le coloca un papel secante o un pedazo de periódico se humedece y sobre él se colocan en hileras 100 semillas de la hortaliza que se va a sembrar. Luego se cubren con otro pedazo de papel periódico o papel secante, húmedo, ubicando el recipiente en un lugar fresco y protegido. Debe anotarse con sumo cuidado la fecha y humedecerse diariamente para facilitar la germinación [25].

Durante dos semanas deben irse separando las semillas que van germinando, para lo cual es necesario ir anotando diariamente el número de semillas germinadas, que sumadas darán el porcentaje de germinación[25].

➤ Siembra indirecta (almacigo):

Implica sembrar las semillas en lugares relativamente pequeños o semilleros, donde recibirán un trato cuidadoso para su posterior trasplante al campo. Los semilleros se utilizan generalmente en aquellos cultivos, cuyas plantas requieren de cuidados muy especiales en sus primeros días de crecimiento [26].

bdigital.ula.ve

Además se usan cuando:

- El valor económico de la semilla es muy elevado
- La germinación es lenta.
- El tamaño de la semilla es pequeña.
- Al sembrarlas se hace difícil colocarlas en hileras uniformes.
- Plantas que pueden reponer sus raíces al trasplantarlas.

Se recurre al empleo de almacigo en las siguientes hortalizas: Acelga, apio, berenjena, brócoli, cebolla, coliflor, chile, lechuga, repollo, tomate [26].

➤ Cosecha:

Es la separación de la planta madre de la porción vegetal de interés comercial, que pueden ser frutos como tomate, pimiento, manzana, kiwis, etc.; raíces como remolacha, zanahoria y otras; hojas, como espinaca, acelga; bulbos como cebolla o ajo; tubérculos como papa; tallos como el espárrago; pecíolos como el apio; inflorescencias como el brócoli o coliflor, etc. La cosecha es el fin de la etapa del cultivo y el inicio de la preparación o acondicionamiento para el mercado [23].

Existen dos sistemas de cosecha: manual y mecanizada aunque en algunos cultivos se utilizan combinaciones de ambos, como por ejemplo cebolla, papa, zanahoria y otras especies, en donde la remoción del suelo para la cosecha manual es facilitada por medios mecánicos. La elección de un sistema u otro depende fundamentalmente del cultivo considerado, del destino y muy especialmente del tamaño del predio a ser cosechado. La cosecha manual es el sistema predominante para la recolección de frutas y hortalizas para el consumo en fresco, mientras que la mecánica es preferida en hortalizas con fines industriales y en algunas otras cultivadas normalmente en grandes extensiones [23].

La cosecha mecanizada tiene como ventaja la rapidez y un menor costo por tonelada recolectada, pero al ser destructiva, sólo puede ser utilizada en cultivos de maduración concentrada. La inversión necesaria para la adquisición, el costo de mantenimiento y la ociosidad del equipo durante gran parte del año hace que la decisión de compra deba ser cuidadosamente analizada. Como desventajas adicionales se pueden mencionar que toda la operación debe estar diseñada para la cosecha mecánica, empezando por el cultivo, distancia entre hileras, nivelación del terreno, pulverizaciones, labores culturales y muy especialmente variedades que se adapten a un manipuleo más rudo. La preparación para el mercado (clasificación, limpieza, empaque) y venta también debe estar adaptado para manejar grandes volúmenes [23].

bdigital.ula.ve

#### **1.4 Microbiología de las hortalizas.**

La diversidad de las especies que existen en un determinado hábitat es una consecuencia de la relación entre los organismos y el ambiente, y desde un punto de vista ecológico, nos interesa conocer porqué existe esta diversidad, cómo está organizada en la comunidad microbiana y qué valor tiene para la estructura y función de toda la comunidad [20].

Son muchos los alimentos que pueden ser atacados por diversos microorganismos que los alteran totalmente en breve tiempo; otros por el contrario están bien protegidos frente a los microorganismos y solo ciertas especies microbianas lo modifican ligeramente [20].

Los microorganismos son tan antiguos como el hombre mismo y lo han acompañado a través de su evolución, han sobrevivido miles de años gracias a su mecanismo de adaptación al ser humano. La humanidad ha convivido mucho tiempo con microorganismos, a pesar del daño que estos le producen, lo que refleja en el deterioro de la salud y muchas veces la muerte [27].

bdigital.ula.ve

Los microorganismos indicadores de calidad sanitaria se les llaman así a diferentes grupos microbianos no patógenos presentes o no en los alimentos que ponen en evidencia indirectamente, las condiciones higiénicas bajo las cuales han sido manipulados o manejados los mismos. La importancia de investigar estas muestras de lechuga, cilantro y perejil es que permite presumir que estas hortalizas estuvieron expuestas bajo ciertas condiciones que los pudiera convertir en un peligro para la salud del público consumidor, por la posibilidad de que esas condiciones igualmente permita la contaminación, sobrevivencia y/o proliferación de patógenos para el ser humano [28].

La etiología de las enfermedades infecciosas incluyen bacterias, virus, hongos, parásitos, productos químicos y toxinas de origen vegetal y animal [29]. Dentro de las bacterias causantes de enfermedades de origen alimentario se destacan el *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum* como agentes causantes de intoxicación, el *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens* como agentes causantes de toxiinfección, y diversos géneros causantes de infección, como la *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* 0157H7, bacterias descritas por la Organización Mundial de la Salud como "una nueva y significativa amenaza a la salud pública"[30]. Entre las especies de mayor importancia se encuentran *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* que son causantes de septicemia, además existen más de 2300 serotipos que producen una infección intestinal conocida como salmonelosis [31].

bdigital.ula.ve

La hortalizas pueden contaminarse por una diversidad de fuentes dentro de las que destacan: el uso de agua de riego contaminada, la tierra, la materia fecal humana o animal, el aire, el equipo de cultivo y manejo, los recipientes y utensilios, materiales de transporte y humano[29]. El uso de estiércol u residuos cloacales como fertilizantes orgánicos, en el lote de producción es otra fuente de contaminación. Las aguas servidas o residuos municipales solo deberían usarse si se dispone de un método efectivo de esterilización. Las plantas bajas rastreras como las hortalizas de hojas en general, están más expuestas a la contaminación por el suelo, agua de riego y animales. El mantenimiento del producto en condiciones de almacenamiento adecuado, particularmente es la mejor ventaja

para evitar el desarrollo microbiano. El lavado es considerado un punto crítico de control, por lo que conocer sus posibilidades y limitaciones es una herramienta útil para quienes deben aplicar y controlar esta operación [32]. Por ello, es necesario cumplir con las denominadas Buenas Prácticas Agrícolas durante el desarrollo del vegetal en el campo, combinadas con aceptables métodos higiénicos durante la recolección, procesamiento, envasado, transporte y distribución, que podrían englobarse en las llamadas Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control [33].

Para producir alimentos seguros o de bajo riesgo hacia el humano es esencial poseer información veraz y reproducible que permite desarrollar programas destinados a eliminar los peligros microbianos asociados al consumo de vegetales mínimamente procesados [34].

La vigilancia del estado higiénico de aguas y alimentos se lleva a cabo mediante la detección de bacterias “indicador” de contaminación, organismos coliformes de origen fecal como *Escherichia coli* que normalmente solo habían en el intestino humano o animal, lo que los convierte en excelentes indicadores de la presencia de microorganismos entéricos patógenos, algunos de estos con capacidad de sobrevivir por largos periodos en las hortalizas frescas y de sobrevivir a procesos de desinfección e incluso de multiplicarse durante el almacenamiento [22].

Comprender la complejidad del problema de contaminación microbiana y tomar conciencia de su importancia es el primer paso hacia una alta calidad minimizando el riesgo [32]. La ciudad de Mérida posee una gran extensión de cultivos de hortalizas, muchas de las cuales se consumen crudas y son regadas con aguas de ríos a lo que se vierte agua residual no tratada; estos cultivos son vendidos en los mercados locales y consumidos por la población urbana y rural de la ciudad y de las comunidades locales, incluyendo aquellas que se encuentran cerca de los ríos [22].

La presencia de bacterias en las hortalizas está determinada por diversos factores tales como la contaminación presente en el lugar de producción (víveres), en el lugar de expendio, así como por la falta de higiene en la manipulación de los mismos al momento de su expendio. Es por ello que la intoxicación alimentaria es un problema vigente en nuestro medio [35].

Se ha señalado que la presencia de coliformes fecales en agua, está indicando la contaminación reciente de la misma por heces de animales y humanos. Es de señalar que las bacterias coliformes son fáciles de identificar, ya que se desarrollan en colonias de tamaño visible, utilizando medios para microbiología, lo que simplifica su determinación [36].

Las bacterias heterótrofas se definen como aquellas bacterias que usan compuestos del carbono orgánico como fuente de energía y el carbono para su crecimiento, en contraposición con las bacterias autotróficas que utilizan los compuestos inorgánicos como fuente de energía y el CO<sub>2</sub>, como fuente de carbono. Esta definición de bacteria heterótrofa es amplia e incluye tanto a las bacterias saprófitas como a las patógenas. Por lo tanto, las bacterias que causan como las que no causan enfermedades son heterótrofas [37].

Desde el punto de vista microbiológico, el examen de la calidad sanitaria de hortalizas tiene por objeto determinar la presencia de ciertos grupos de bacterias, que revelen una contaminación reciente por materia fecal o materia orgánica, siendo el criterio más utilizado la determinación de la clase y número de microorganismos que estas contienen. Tradicionalmente se han usado ensayos de microorganismos indicadores más que para la determinación de microorganismos patógenos. El grupo de bacterias coliformes ha sido siempre el principal indicador de calidad de los distintos tipos de hortalizas; el número de coliformes en una muestra, se usa como criterio de contaminación y, por lo tanto, de calidad sanitaria de la misma [38].

## **1.5 Enfermedades transmitidas por hortalizas.**

Los alimentos cuando se ingieren en mal estado, contaminados con bacterias, virus, mohos, toxinas o productos químicos, producen en el organismo una serie de enfermedades, cuyos síntomas más frecuentes son náuseas, vómitos, diarrea y dolores abdominales. Los alimentos pueden ser vehículos que transportan microorganismos o parásitos, cuando esto sucede, es por falta de higiene en la manipulación de los alimentos y su preparación, por ser cosechados en ambientes sucios, o por estar descompuestos a la hora de ingerirlos. Se han descrito alrededor de 200 enfermedades de transmisión alimentaria, donde las más frecuentes transmitidas por alimentos contaminados son: diarreas, hepatitis A, gastroenteritis, cólera, amibiasis, fiebre tifoidea, intoxicaciones. También pueden causar una intoxicación alimentaria las sustancias contaminantes que penetran accidentalmente en los alimentos, como puede ser el caso del mercurio, o determinados elementos nutritivos que producen una reacción alérgica en el tracto digestivo de algunas personas susceptibles a ellos [39].

En general las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), la mayoría de las cuales son de origen microbiano, constituyen uno de los principales problemas de salud pública más importantes a nivel mundial, donde los alimentos y el agua contaminada son fuentes importantes de contagio [29]. En el continente americano las ETAs figuran entre las primeras cinco causas de muerte en menores de 5

años, con una incidencia promedio anual de cuatro episodios diarreicos anuales por niño [40].

En nuestro país, el sistema de vigilancia epidemiológica para ETAs se basa en la detección e investigación o prevención de brotes [41]; el enfoque ha sido principalmente preventivo, por ello, en enero de 1959 fue publicado en Gaceta Oficial numero 25.864 el reglamento general de alimentos donde se considera aspecto como fabricación, almacenamiento, venta y consumo de alimentos [42]. El capítulo cinco de dicho reglamento especifica la inspección visual y toma de muestra en los establecimientos donde se elabora, depositan y expenden alimentos, siendo solamente la inspección visual, también llamada inspección sanitaria, la principal herramienta gubernamental de prevención de ETAs en estos establecimientos [43].

El ente gubernamental considera prioritaria la prevención de ETAs en establecimientos que prestan servicios a sectores de la población tipificados como colectivos vulnerables [43]. Las ETAs se consideran como la mayor causa de morbilidad, tanto en países industrializados como en vías de desarrollo, y en estos últimos son causa frecuente de mortalidad. La magnitud del impacto socio-económico que generan estas enfermedades es difícil de medir, más aún cuando muchos casos ni siquiera son informados [44].

Históricamente, las enfermedades producidas por microorganismo se han relacionado con la pobreza, pero en la actualidad, se observan muchos casos en los que incide, además el desconocimiento y la falta de políticas sanitarias, todo esto, evidencia fallas en el saneamiento ambiental [45]. La venta y preparación hogareña de las hortalizas son las últimas etapas donde un producto puede contaminarse. Se reitera aquí todo lo mencionado referido a la higiene personal y la necesidad de evitar la entrada de animales domésticos a los locales de venta [32].

Tomando en consideración los antecedentes que se han indicado en los párrafos anteriores, se planifico realizar un trabajo de investigación en el Municipio Libertador del Estado Mérida donde se encuentra un establecimiento llamado Mercado Principal de Mérida, al cual la población de los alrededores, así como personas provenientes de otros lugares del estado Mérida y estados vecinos, acuden, y compran hortalizas para su consumo, ignorando la posible presencia de microorganismos, algunos de los cuales pueden ser patógenos y causar algún tipo de afección.

Bajo este contexto, la investigación se planteo como problema:

¿Es adecuada la Calidad Microbiológica de las hortalizas como la lechuga, perejil y cilantro de consumo humano en el Mercado Principal ubicado en la ciudad de Mérida, Estado Mérida, Venezuela?

bdigital.ula.ve

bdigital.ula.ve

## Capítulo II. Antecedentes de la hipótesis, justificación, hipótesis y objetivos

### II.1. Antecedentes de la hipótesis.

Rangel y colaboradores (1998) realizaron en Venezuela un estudio donde evaluaron la calidad microbiológica de la lechuga (*Lactuca sativa*) y del cilantro (*Coriandrum sativum*). Encontrando algunas de estas muestras contaminadas por coliformes fecales y coliformes totales, donde luego ellos sometieron estas muestras a tratamientos de desinfección con hipoclorito a 5ppm y ácido acético al 15% lo cual resulto una disminución de la población de coliformes totales y coliformes fecales [46].

Carrasco (2007) realizó una tesis Doctoral donde analiza el riesgo alimentario de listeriosis a través del consumo de ensaladas. Se demostró en un modelo primario ajustado a datos de crecimiento del patógeno en el alimento que permite la no superación de 100 ufc/g del patógeno, concluyendo que a pesar que el producto presente cierta prevalencia de contaminación, se puede comercializar siempre y cuando no supere este límite de 100 ufc/g [47].

Melina y colaboradores realizaron en el año 2005 un estudio que tuvo como objetivo evaluar el grado de contaminación fecal en 3 de las hortalizas de mayor consumo crudo expandidas en cuatro importantes mercados mayoristas de Lima Metropolitana. Se recolectaron en total 180 muestras, 15 de lechuga (*Lactuca sativa*), 15 de col (*Brassica oleracea*) y 15 de espinaca (*Spinacea oleracea*). Las muestras fueron procesadas según el método del Número más Probable para detección y recuento de coliformes fecales y *E. coli* Tipo I (Típico), así como por la prueba de Ausencia/Presencia para *Salmonella spp.* El estudio demostró que el 18.9% y 56.7% del total de hortalizas, y el 22.2% y 64.4% de hortalizas provenientes de los mercados 1 y 3, presentaron niveles de coliformes fecales superiores a lo establecido por la ICMSF (100) y el MINSA (10), respectivamente. Además, el 2.2% de las hortalizas del mercado 4 presentó niveles de *E. coli* Tipo I (Típico) superiores a lo establecido por la ICMSF y el MINSA. En ambos casos, la espinaca tuvo la mayor contaminación. Respecto a *Salmonella spp.*, el 10% de las verduras presentó contaminación, resaltando la col y fue el mercado 2 el que presentó el mayor porcentaje (20%). Los mercados 3 y 4 presentaron las hortalizas con el mayor porcentaje de aceptabilidad total y el mercado 2 aquellas con el mayor porcentaje de rechazo [48].

## **II.2. Justificación**

En Venezuela y particularmente en Mérida se han realizado pocos estudios sobre la calidad microbiológica de las hortalizas, desconociéndose el papel de estas en la transmisión de agentes etiológicos de tanto interés en nuestro medio. Así mismos se tiene escasa información sobre la carga de coliformes totales y de coliformes fecales en estos productos y su relación con la presencia de patologías.

bdigital.ula.ve

### **II.3. Hipótesis**

Las hortalizas que se expenden en el Mercado Principal en la Ciudad de Mérida tienen una calidad microbiológica no adecuada para su consumo en forma cruda, evidenciada por los altos valores que presentan los grupos de microorganismos evaluados como indicadores de calidad microbiológica, a saber bacterias heterótrofas, coliformes totales y coliformes fecales.

bdigital.ula.ve

## **II.4. Objetivo general**

Determinar la calidad microbiológica de hortalizas que se expenden en el Mercado Principal de la Ciudad de Mérida, mediante la evaluación de los microorganismos indicadores de calidad: bacterias aerobias heterótrofas, coliformes totales y coliformes fecales.

## **II.5. Objetivos específicos**

1.- Cuantificar el número de bacterias aerobias mesófilas presentes en tres especies de hortalizas, lechuga, perejil y cilantro que se expenden en el Mercado Principal de la Ciudad de Mérida.

2.- Enumerar la cantidad organismos coliformes totales presentes en tres especies de hortalizas, lechuga, perejil y cilantro que se expenden en el Mercado Principal de la Ciudad de Mérida.

3.- Enumerar la cantidad de organismos coliformes fecales y *E. coli* en tres especies de hortalizas, lechuga, perejil y cilantro que se expenden en el Mercado Principal de la Ciudad de Mérida.

4.- Identificación de las cepas aisladas en las distintas determinaciones microbiológica.

## Capítulo III. MATERIALES Y METODOS

### III.1. Materiales

#### A. Población muestral.

Se recolectaron muestras de lechuga, cilantro y perejil procedentes de distintos establecimientos del Mercado Principal del Estado Mérida. La selección de los establecimientos se realizó de manera aleatoria.

La toma de muestra de las hortalizas se realizó mensualmente en cada establecimiento estudiado, durante un periodo de dos meses. Recolectando de esta manera 5 muestras mensuales, obteniendo un total de 10 muestras (Figura 1).



Fuente: fotografías tomadas el día de recolección de la muestra.

**FIGURA 1. SITIO DE RECOLECCION DE LAS MUESTRAS DE HORTALIZAS EN EL MERCADO PRINCIPAL DE MERIDA, ESTADO MERIDA.**

De cada una de las muestras de hortalizas recolectada se tomó aproximadamente 100 gramos, cada tipo de hortaliza se recolecto en bolsa plástica estériles y se transportaron hasta el laboratorio para su proceso microbiológico. Cada muestra fue identificada y rotulada como muestra M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 y M10.

## **B. Medios de cultivos**

Se utilizaron medios de cultivos deshidratados provenientes de las casas comerciales así como los medios preparados directamente por el fabricante, como los medios Petrifilm. En el caso de los medios deshidratados, se esterilizaron a 15 PSI de presión y 120°C durante 30 minutos [49].

## **C. Reactivos**

Todos los reactivos usados fueron de grado analítico.

## **III.2. Metodología**

### **III.2.1. Preparación de dilución 1:10.**

Para ello se pesaron asépticamente 10g de la muestra. Se añadió a los frascos 90mL de diluyente estéril (Agua peptonada 0,1%) y se agitó para homogenizar la muestra. Así conseguimos el macerado inicial que es la dilución 1:10.

### **III.2.2. Cuantificación del número de bacterias aerobias mesófilas en tres especies de hortalizas que se expenden en el Mercado Principal de la Ciudad de Mérida.**

La cuantificación de bacterias aerobias mesófilas se realizó, por la técnica de dilución en placa. Se utilizó el medio Petrifilm, incubando a 30° C por 24 horas. El volumen utilizado fue de 1 ml de cada una de las muestras diluidas.

Finalizada la incubación, se contabilizaron las colonias crecidas mediante la ayuda de un contador de colonias Quebec. Los resultados se expresaron como medias aritméticas de las unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/gr).

Las colonias más representativas y con morfología diferente se aislaron en agar BHI (Brain Heart Infusion Agar o Agar Cerebro Corazón Infusión ) para su posterior identificación.

### **III. 2.3. Enumeración de la cantidad de organismos coliformes totales y fecales en tres especies de hortalizas que se expenden en el Mercado Principal de la Ciudad de Mérida.**

Para su cuantificación se transfirió 0,1 ml del tubo de ensayo con agua peptonada al 0,1% sobre una placa Petri con agar MK (Mac Conkey). Se incubó a 37° C para coliformes totales y coliformes fecales que se incubó a 44° C. Finalizado el tiempo de incubación se contaron las colonias crecidas, mediante la ayuda de un contador de colonias Quebec. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/gr). Por otro lado, las cepas sospechosas seleccionadas fueron aquellas que fermentaron la lactosa y presentaron colonias rojizas y en muchos casos mucoides.

### **III.2.4. Identificación de las colonias bacterianas aisladas**

Las cepas aisladas de bacterias se identificaron por características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Las pruebas se realizaron según Barrow y Feltham (1993) y fueron las siguientes:

- **Tinción de Gram**

1. A partir de un cultivo de 24 horas a 37° C en agar BHI, se realizó la tinción de Gram por la técnica estándar [50].

- **Morfología de la colonia y producción de pigmento**

Se sembró el microorganismo por estría en superficie del agar BHI. Se incubó a 37° C durante 24 horas, finalizada la incubación se observaron los siguientes caracteres: tamaño, pigmentación, borde, brillo y elevación.

- **Oxidación-fermentación de la glucosa**

Fueron sembrados ocho tubos de medio Hugh y Leifson con pipeta Pasteur, a partir de un cultivo de 24 horas en agar PCA (Plate count agar). Cuatro de los tubos luego de sembrados se recubrieron con vaselina estéril. Se incubaron a 37C durante 24-48 horas [51].

- **Galerías API 20 NE, 20E y Staphi.**

Se prepararon las galerías siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomó una colonia aislada de la placa de cultivo y se realizó una suspensión en un tubo con 5

ml de una solución salina estéril, homogeneizando cuidadosamente las bacterias comparándola con el patrón 0,5 de Mcfarland. Posteriormente se inocularon la serie de 20 micro tubos de las galerías con la suspensión bacteriana, Las galerías se incubaron durante 24 horas a 37° C. Finalizado el tiempo de incubación, se le añadieron los correspondientes reactivos a los micro tubos que lo necesitaron y se procedió a leer visualmente las distintas pruebas, siguiendo el manual de procedimiento de las galerías API 20 NE, 20E y Staphi. Se volvió a incubar durante 24 horas más a 37° C posteriormente se hizo una segunda lectura de las reacciones bioquímicas. Por último, y de acuerdo a los resultados obtenidos, se procedió a obtener los perfiles taxonómicos de las cepas analizadas en la base de datos APIWEB de BioMérieux.

bdigital.ula.ve

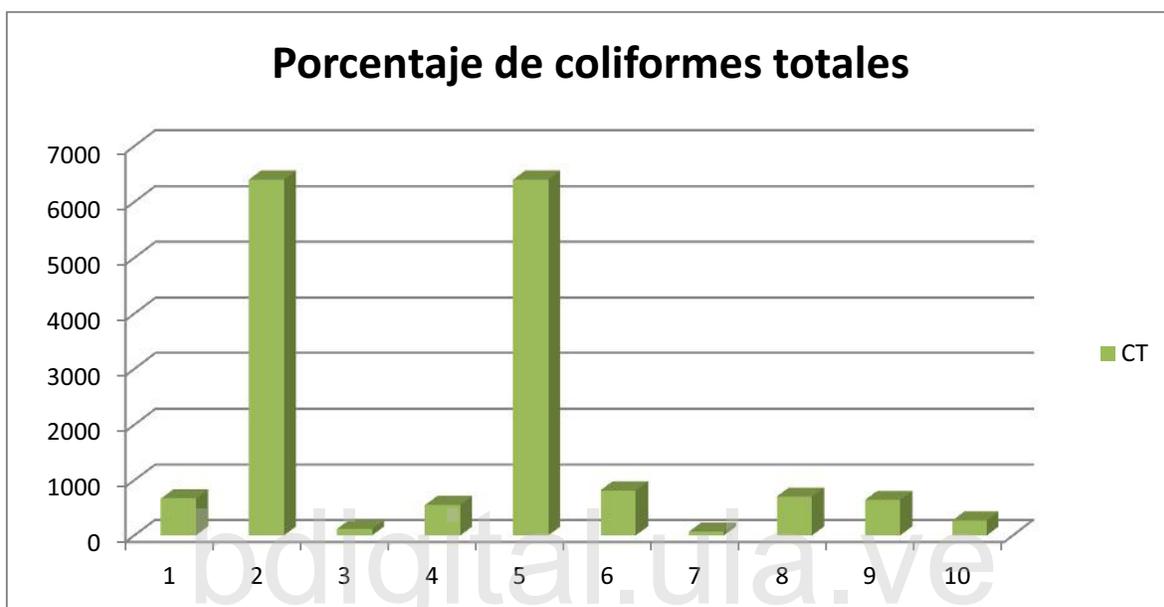
## CAPITULO IV. RESULTADOS

TABLA 1. VALORES PROMEDIO DE LOS INDICADORES DE CALIDAD MICROBIANA EN MUESTRAS DE LECHUGA, PEREJIL Y CILANTRO EXPENDIDAS EN EL MERCADO PRINCIPAL DE MERIDA.

MUESTRAS	BAM (ufc/gr)	COLIFORMES TOTALES (ufc/gr)	COLIFORMES FECALES (ufc/gr)
M1	$\geq 2 \times 10^3$	$6.66 \times 10^2$	0
M2	$\geq 2 \times 10^3$	$\geq 6,4 \times 10^3$	0
M3	$\geq 2 \times 10^3$	$1.152 \times 10^3$	0
M4	$\geq 2 \times 10^3$	$5.50 \times 10^2$	0
M5	$\geq 2 \times 10^3$	$\geq 6,4 \times 10^3$	0
M6	$\geq 2 \times 10^3$	$8.19 \times 10^2$	0
M7	$\geq 2 \times 10^3$	$6.4 \times 10^1$	0
M8	$\geq 2 \times 10^3$	$7.04 \times 10^2$	0
M9	$\geq 2 \times 10^3$	$6.4 \times 10^2$	0
M10	$\geq 2 \times 10^3$	$2.69 \times 10^2$	0

Fuente: Datos obtenidos del cuaderno de protocolo de reportes de laboratorio.

De la tabla 1: (ufc/gr): Unidades formadoras de colonias por gramos. Primer muestreo M1: lechuga, M2: cilantro, M3: perejil, M4: lechuga, M5: cilantro. Segundo muestreo M6: perejil, M7: lechuga, M8: cilantro, M9: perejil, M10: lechuga. (BAM): Bacterias aerobias mesófilas.



**FIGURA 2. DISTRIBUCION PORCENTUAL DE NUMEROS DE COLIFORMES TOTALES.**

De las 10 determinaciones microbiológicas realizadas, se determinó la presencia de diversos porcentajes de coliformes totales. (Tabla 1 y figura 2).

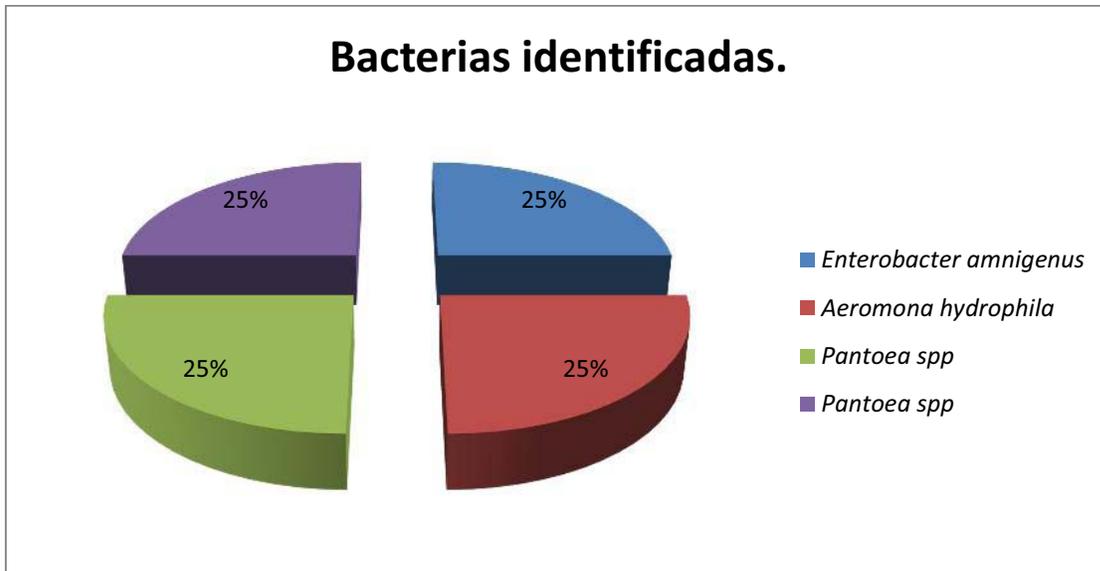
**TABLA 2. ESPECIES BACTERIANAS AISLADAS E IDENTIFICADAS EN LAS MUESTRAS DE LECHUGA, CILANTRO Y PEREJIL QUE SE EXPENDEN EN EL MECADO PRINCIPAL DE MERIDA, ESTADO MERIDA.**

<b>MUESTRA</b>	<b>ESPECIE</b>
<b>M1</b>	<i>Enterobacter amnigenus</i>
<b>M2</b>	<i>Aeromona hydrophila</i>
<b>M8</b>	<i>Pantoea spp</i>
<b>M9</b>	<i>Pantoea spp</i>

Fuente: Datos obtenidos del cuaderno de protocolo de reportes de laboratorio

M1: lechuga (Primer muestreo), M2: cilantro (Primer muestreo). M8: cilantro (Segundo muestreo), M9: perejil (Segundo muestreo)

Consecuentemente, de las 10 muestras analizadas, se lograron aislar e identificar 4 cepas bacterianas Gram negativas, dando como resultado que de 2 de las muestras de cilantro presentaron dos patógenos diferentes identificados como *Aeromona hydrophila* y *Pantoea spp*, mientras que la muestra correspondiente a lechuga resulto contaminada con *Enterobacter amnigenus*; seguidamente en la muestra de perejil se determinó la presencia de *Pantoea spp*.



**FIGURA 3. DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LOS TIPOS DE COLONIAS BACTERIANAS IDENTIFICADAS.**

Estas bacterias Gram negativas fueron identificadas como *Aeromonas hydrophila*, *Pantoea spp* y *Enterobacter amnigenus*. (Tabla 2 y figura 3)

## CAPITULO V. DISCUSION DE RESULTADOS

En todo el mundo se ha incrementado la frecuencia de brotes de enfermedades de transmisión alimentaria asociadas al consumo de hortalizas contaminadas. Lo anterior se debe a que este tipo de productos tienen contacto durante su cultivo directamente con el suelo, lo cual favorece la presencia de un amplio grupo de microorganismos, mucho mayor que la que presentan normalmente los vegetales obtenidos de árboles y arbustos [51]. Además, durante su preparación, estas suelen someterse a picado y/o troceado; estas maniobras pueden favorecer también a la contaminación con microorganismos patógenos. Debido a que las hortalizas crudas son consumidas sin un tratamiento térmico adicional, es de gran importancia que sean sometidas a un proceso efectivo de desinfección para minimizar los peligros microbianos que pudieran estar presentes. Los desinfectantes pueden ser aplicados para reducir el número de microorganismos en los alimentos siempre y cuando por si solos no representen un peligro químico en el producto terminado. Como se ha mencionado, los grupos patógenos son un problema importante de salud pública. Para prevenir de manera eficaz las enfermedades que estos grupos patógenos provocan por el consumo de alimentos, es necesario, entre otras cosas, conocer su frecuencia en los alimentos involucrados [52].

La enumeración de las bacterias heterótrofas provee una estimación del número total de bacterias viables y da información acerca de la calidad sanitaria de las hortalizas [53]. de Bacterias aerobias mesófilas (BAM) con valores mayores a  $2 \times 10^3$  unidades formadoras de colonias. En el presente estudio realizamos un primer muestreo en Enero 2013, seguido de un segundo muestreo en Febrero del mismo año, donde en todas las muestras de hortalizas analizadas, se detectó la presencia colonias por gramos de agua, resultados similares a los descritos por autores como Luna y colaboradores, en el año 2008, donde indica que los conteos de mesófilos pueden llegar a valores de  $9 \log_{10} \text{UFC/g}$  pero los rangos típicos oscilan entre 4 a  $6 \log_{10} \text{UFC/g}$  [54].

Recuentos altos de mesófilos aeróbicos en este tipo de productos crudos o no tratados, a menudo están constituidos por la microflora normal o quizás indican una alteración incipiente del alimento y no un riesgo potencial para la salud del consumidor. Sin embargo, un alto contenido de este tipo de microorganismos indica materias primas contaminadas o tratamientos no satisfactorios desde el punto de vista sanitario. Además, este hecho significa en muchos casos que por las condiciones favorables de temperatura de crecimiento cercanas a las del cuerpo humano, en especial del tracto intestinal, significa que pueden haberse dado las condiciones favorables para la multiplicación de los microorganismos patógenos de origen humano o animal. Algunas cepas de bacterias mesófilas comunes, son consideradas generalmente como agentes de enfermedades transmitidas por los alimentos, como *Proteus spp*, *Enterococos* y *Pseudomonas aeruginosa*, han sido señaladas como causa de enfermedad cuando existía un

número elevado de células viables en los alimentos. Se debe tomar muy en cuenta que todas las bacterias patógenas conocidas vehiculadas por los alimentos son mesófilas y en algunos casos contribuyen con su presencia a los recuentos en placa encontrados en el laboratorio. Cuando la alteración de los alimentos es debida al desarrollo en ellos de microorganismos, la causa más frecuente de alteración, debe esperarse en los mismos recuentos elevados. Los niveles de población precisos para producir modificaciones organolépticas ostensibles varían ampliamente según el tipo de alimento y, de modo particular, la clase de microorganismo [54].

Los resultados del presente trabajo son comparables a los obtenidos por algunos investigadores en hortalizas [51, 54, 55], observándose ligeras variaciones.

El hecho de tener un número incontable de bacterias heterótrofas indica que la calidad microbiológica de lechuga, cilantro y perejil no es adecuado. Debido a la falta de higiene del manipulador, productos contaminados por contaminación cruzada, mal almacenamiento del producto terminado o materias primas, malas prácticas agrícolas, falta de control microbiológico de las aguas de riego, deficiencia en los procesos de limpieza y desinfección, mal almacenamiento de las herramientas y sustancias de limpieza, ha traído como consecuencia que muchas de estas hortalizas se hayan contaminado, alterando de esta manera su composición química y microbiológica. Sin embargo, otras son vigiladas

cuidadosamente para evitar que cualquier intervención perjudicial altere sus características organolépticas y microbiológicas [56].

De los resultados obtenidos en el análisis de las 10 muestras no se encontró la presencia de coliformes fecales. La escasa presencia de bacterias de origen entérico se puede deber a que estas hortalizas no estuvieron expuestas a contaminación fecal con heces de humanos o animales de sangre caliente o que también este grupo de coliformes fecales crecen a temperatura elevada (44.5 o 45°C) y de donde las muestras proviene la temperatura oscila entre 12-20°C [57].

Por el contrario, los resultados obtenidos en el presente trabajo, respecto a la presencia de coliformes fecales, son diferentes a los señalados en un estudio realizado en Venezuela, donde *E. coli* fue detectada en aproximadamente 30.3% de los hortalizas examinadas [54].

En relación a la presencia de Coliformes Totales, se logró determinar la presencia de estos en todas las muestras estudiadas, con rango entre 6400UFC/gr. Y 64UFC/gr. (Tabla 1). De estas 10 muestras, 4 resultaron puras (Bacilos Gram negativos) y al ser analizadas se logró identificar mediante la prueba microbiológica API 20E a las siguientes bacterias *Pantoea spp*, *Aeromona hydrophila* y *Enterobacter amnigenus*. La mayor contaminación se presentó en cilantro con 2 muestras contaminadas con dos patógenos diferentes, seguida de la

lechuga y perejil con un patógeno diferente cada una. Estos resultados de los análisis de las muestras de lechuga, cilantro y perejil se muestran en la Tabla 2.

*Pantoea spp* pertenecen a un gran grupo de organismos de la familia Enterobacteriaceae, también llamado bacilos entéricos Gram-negativos o cocobacilo. No forman esporas y crecen mejor en ausencia de oxígeno, a pesar de que son capaces de crecer con el oxígeno presente en su entorno. Son principalmente patógenos de las plantas, que se producen en muchos hábitat ecológicos, incluso en asociación con el suelo, el agua, los productos lácteos, la carne, el pescado, los seres humanos y los animales [58].

*Aeromonas hydrophila* es una eubacteria heterótrofa Gram negativa, que vive principalmente en zonas con un clima cálido. Esta bacteria también puede vivir en aguas dulces, saladas, cloradas y no clorinadas, también puede sobrevivir en medios aerobios y anaerobios. Es capaz de digerir materiales, como por ejemplo la gelatina o la hemoglobina. *A. hydrophila* fue aislada de humanos y animales en la década de los 1950. Es la más conocida de las seis especies del género *Aeromonas*. Es muy resistente a medicamentos, cloro, y bajas temperatura. Es un bacilo Gram negativo de bordes redondeados, que suele medir entre 0,3 y 1 micrómetros de ancho y entre 1 y 3 micrómetros de largo. No forma endosporas y puede prosperar en aguas tan frías como 4 °C. Estas bacterias presentan desplazamiento por medio de flagelos polares [59].

Debido a su estructura la *Aeromonas hydrophila* es muy tóxica para numerosos organismos. Cuando entra en el organismo huésped, viaja por la sangre hasta el primer órgano que encuentra. Produce la enterotoxina tóxica aerolisina (ACT), una toxina que puede provocar daños tisulares. *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria* son conocidas como patógenos oportunistas, es decir, sólo infectan huéspedes con una respuesta inmunitaria debilitada. A pesar de que *A. hydrophila* está considerada una bacteria patógena, los científicos no han sido capaces de demostrar que es la causa real de algunas de las enfermedades con que está asociada. Se cree que contribuye a la infección de estas enfermedades, pero que no las causa ella misma [59].

bdigital.ula.ve

*Enterobacter amnigenus* es un pequeño organismo en forma de bacilo gramnegativos aislados del agua potable, las aguas superficiales, y del suelo, pero no sabe que tienen algún significado clínico. El gas se produce a partir de la glucosa y la mayoría de las cepas son móviles [60].

En estudios anteriores sobre la población microbiana de las hortalizas han sido las bacterias Gram negativas las de mayor población [61-64], resultado que se vuelve a confirmar en el presente trabajo donde han predominado las bacterias Gram negativas, principalmente de la clase Gammaproteobacterias.

Los resultados de este estudio son comparables con los reportes de varios autores quienes han evaluado la calidad microbiológica de diversos productos de consumo fresco. Así, Monge y col [12], analizaron la calidad sanitaria de hortalizas que se consumen crudas en Costa Rica y reportaron en lechuga y cilantro recuentos de CF entre  $10^4$ - $10^7$  NMP/gr. Acevedo y col [65] evaluaron la carga microbiana de ensaladas de hortalizas frescas y encontraron un recuento de coliformes totales de  $10^5$  NMP/gr.

Diversos autores han comunicado diferentes niveles de indicadores entéricos. Mukherjee y col. [66] analizaron la calidad sanitaria de frutas y hortalizas frescas y comunicaron un recuento promedio de CT de  $10^2$  NMP/gr. De igual forma, en un estudio realizado por Arias y Antillón [7], se evaluaron parámetros de calidad microbiológica en ensaladas, donde el 71% de las muestras presentaban recuentos de coliformes fecales mayores de  $10^2$  NMP/gr. Pingulkar y col. evaluaron la calidad microbiológica de hortalizas frescas y ensaladas listas para consumir, encontrando índices de CT en las hortalizas frescas entre 3-1100 NMP/gr y niveles significativos de CF en un 65,60% de las muestras. En las ensaladas listas para consumir, el rango de CT estuvo entre 11-460 NMP/g; no así para CF los cuales no fueron recuperados en este grupo de alimentos [67].

Otros autores han comunicado diferencias en los recuentos de indicadores entéricos en diversos vegetales, de acuerdo con el sitio de muestreo. Así, en un estudio llevado a cabo en la ciudad de México por el centro de Estudios y Control de Contaminación (CESCO), se evaluaron productos hortícolas en dos supermercados y un mercado público, el rango de CT en el mercado popular osciló entre 10->2400 NMP/gr y los CF entre 5-1100 NMP/gr; en contraste, el muestreo en los supermercados arrojó recuentos significativamente menores [10].

Los resultados de este estudio y las publicaciones de otros autores señalan que la microflora contaminante de productos frescos como frutas y hortalizas, puede tener una amplia variedad de orígenes y reflejar tanto las condiciones de cultivo y cosecha, así como, la calidad sanitaria de los procesos de transporte y comercialización. Por lo tanto, es difícil la implementación de criterios uniformes de estándares microbiológicos que puedan aplicarse a nivel mundial. Por tal motivo, es necesario el desarrollo de estándares microbiológicos locales que establezcan criterios de aceptabilidad para estos productos, tomando en cuenta las condiciones regionales específicas que afecten en menor o mayor grado la calidad microbiológica de estos productos alimenticios [68].

De igual forma no existen estudios publicados sobre las hortalizas (lechuga, cilantro y perejil) que se expende en el Mercado Principal de Mérida, por lo que el presente estudio representa la primera investigación realizada al respecto, lo cual no permitió la comparación con resultados obtenidos de este mercado.

## CONCLUSIONES

Aunque las muestras de hortalizas analizadas presentaron una elevada carga de bacterias aerobias mesófilas y coliformes totales, los rangos obtenidos permitieron catalogar a la mayoría de las muestras de lechuga y perejil dentro de los niveles de calidad microbiológica considerados como satisfactorias. Sin embargo, una elevada proporción de las muestras de cilantro analizadas fueron ubicadas en la categoría de insatisfactorias, desde el punto de vista microbiológico.

Además, de que no se encontraron bacterias indicadores de contaminación fecal como *Escherichia coli*, no se observó diferencia entre la calidad microbiológica de las hortalizas por su periodo de recolección, es decir, el grado de riesgo de enfermedad por consumir estas hortalizas crudas es el mismo.

En las hortalizas existe un claro predominio de Bacilos Gram negativos, lo cual lleva a pensar en una colonización de este microorganismo.

Este estudio sugiere que la manipulación de las hortalizas tanto desde su cultivo hasta su manipulación requieren de estrictas medidas de higiene que eviten, hasta donde sea posible, la contaminación de las hortalizas desde su preparación hasta su consumo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las hortalizas deben llevar a cabo una vigilancia más estricta, esto con la finalidad de prevenir y controlar posibles brotes de enfermedades por transmisión alimentaria (ETAs.)

Los resultados sugieren tomar acciones correctivas que minimicen los riesgos de contaminación microbiológica durante el proceso de producción. Estas acciones incluyen la capacitación de los productores y su personal de manera que adquieran los conocimientos necesarios sobre Buenas Prácticas Agrícolas.

bdigital.ula.ve

## RECOMENDACIONES

Continuar de manera exhaustiva el control de calidad microbiológico a hortalizas.

Realizar estudios con tendencia a determinar el efecto de las condiciones ambientales y de manejo sobre los microorganismos y evaluar microbiológicamente las hortalizas e identificar los microorganismos presentes.

Lavar los vegetales antes de preparar los alimentos. Lo más recomendable es realizar el lavado con ácido acético al 5% y agua potable.

Realizar estudios de la calidad microbiológica del agua de riego utilizada en el cultivo de las hortalizas.

Realizar estudios de la calidad microbiológica del agua utilizada por los expendedores de vegetales, para así conocer el grado de contaminación de la misma y evitar problemas de salud en los consumidores.

Cuidar las condiciones de transporte y almacenamiento de las hortalizas para garantizar su vida útil y calidad.

Difundir información a toda la población, a cerca de las enfermedades de transmisión alimentaria, sus causas, vectores y sobre todo sus consecuencias.

Para evitar la proliferación de los microorganismos presentes en hortalizas de hoja se recomienda evaluar el tratamiento de las hortalizas con desinfectantes comerciales de bajo costo, que los productores puedan adquirir de manera fácil y económica.

bdigital.ula.ve

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gil A, Morón A, Gaesrte Y, University of Maryland. Mejorando la seguridad y calidad de frutas y hortalizas frescas: Manual de Formación para Instructores. 2002. En: [http://www.jifsan.umd.edu/pdfs/gaps\\_español/seccion-v.pdf](http://www.jifsan.umd.edu/pdfs/gaps_español/seccion-v.pdf).
2. PAHO/INPPAZ. Foodborne disease outbreaks and cases reported in 1996 to the Regional Information System for the Epidemiological Surveillance of Foodborne Diseases. 1996.
3. Beuchat L. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Food Safety Unit, World Health Organization. Series: Report En: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/surface.decon.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/surface.decon.pdf). Acceso: el 28 de octubre de 2008.
4. Hedberg CW, MacDonald KI, Osterholm MT. Changing epidemiology of food-borne disease: a Minnesota perspective. Clin Infect Dis. 1994; 18: 671-82.
5. Potter ME, Motarjemi Y, Käferstein FK. Emerging foodborne disease. World Health, January-February. 1997: 16-7.
6. Arce G, Ávalos M., Giusti S, Miranda G, Tuhay N, Merino L. Consumo de vegetales crudos en la ciudad de Corrientes en relación con las enfermedades transmitidas por alimentos. Rev de Postgrado de la VI Cátedra de Medicina. 2002; 115: 10-1.

7. Rivera-Jacinto, M., Rodríguez-Ulloa, C., López-Orbegoso, J. Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. Rev. Perú. med. exp. Salud pública; 26(1).
8. Beuchat LR, Ryu JH. Produce handling and processing practices. Emerg Infect Dis. 1997; 3(4): 1-13.
9. Buck J, Walcott R, Beuchat L. (2003). Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. En: <http://www.plantmanagementnetwork.org/php/public.asp>.
10. Centro de estudios y control de contaminantes (CESCCO). (2009). Calidad microbiológica en productos hortícolas. En: <http://www.cescco.gob.hk/informes/calidad%20microbiologica%20de20productos%20horticolas.pdf>.
11. Giese J. Microbial testing of produce-laboratory. Food Technol. 2003; 57: 70-3.
12. Monge R, Chinchilla M, Reyes L. Estacionalidad de parásitos y bacterias intestinales en hortalizas que se consumen crudas en Costa Rica. Rev Biol Trop. 1996; 44: 369-75.
13. European Commission. (2002). Risk profile on the microbiological contamination of fruits and vegetables eaten raw. En: [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index\\_en.htm](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.htm).
14. Sagoo SK, Little CL, Mitchell RT. The microbiological examinations of ready-to eat organic vegetables from retail establishments. LACOTS/PHIS Coordinated Liaison group studies. PHLS environmental surveillance unit. Junio 2001.

15. Knabe S. The World of food Science. Resumen de la situación científica. Enfermedades transmitidas por alimentos. Disponible en: <http://www.worldfoodscience.org/cms/?pid=1001315>.
16. Busta FF, Suslow ME, Parish LR, Farber JN, Garrett EH, Harris LJ. The use of indicators and surrogate microorganisms for the evaluation of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Rev Food Sci F.* 2003; 2: 179-85.
17. Garcia R, Chavez J, Mejia A, Duran C. Microbiological determination of some vegetables from the Xochimilco zone in México City, México. *Rev Latinoam Microbiol.* 2002; 44(1): 24-30.
18. Díaz T., R.; Salas A., J.; González, H.; Martínez de Carrillo, M. (1995). Producción de hortalizas. 2da. ed. ampliada. Maracay (Ven.) Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Lara. 206 p. (Serie B).
19. Jaclavik, Vickie A. (2010). Agua en los alimentos, Pectina y otros carbohidratos, Hortalizas y frutas. Fundamentos de ciencia de los Alimentos. Ed. Acribia. México.
20. Muller G. (1981). Microbiología de los Alimentos y Vegetales. Ed. Acribia. Buenos Aires: Argentina.
21. Salinas R. (1988). Alimentos y Nutrición: Bromatología aplicada en la salud. Ed. El Ateneo. Buenos Aires: Argentina.
22. García-Gómez R, Chávez-Espinosa J, Mejía-Chávez A, Durán-de-Bazúa C. Microbiological determinations of some vegetables from the Xochimilco zone in Mexico City, Mexico. *Rev Latinoam Microbiol.* 2002; 44(1): 24-30.

23. FAO (Food and Agriculture Organization). La calidad en frutas y hortalizas. En: Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas: del campo al mercado. Depósito de Documentos de la FAO. Disponible en <http://www.fao.org//docrep/006> (consultado en Febrero de 2013).
24. Ramírez, R. Unidad 1. Tecnología de Frutas y Hortalizas. UNAD. Colombia; 2010.
25. Dainello, J. Cultural practices. Vegetable growers handbook. USA; 1991.
26. Arrollo, N. Sistema y Métodos de siembra en hortalizas, Costa Rica. Práctica de campo; 2009.
27. Freer, E. Los parásitos nos ganan la partida. Revista Bimestral Centroamericana. 2000 Julio-Agosto; (15).
28. Díaz R. (2006). Microorganismos indicadores de Calidad sanitaria en los alimentos. Curso de Microbiología de los Alimentos.
29. Anacleto F, Campas ON, Meza M. Calidad sanitaria de alimentos disponibles al público de ciudad Obregón, Sonora, México. Respyn, 2005 [27 septiembre 2010]; 6 (3).
30. Gordis, L. Enfermedades infecciosas y epidemiológica. New york time 2008 diciembre 3; Salud.
31. FAO. Food inspection. Food And Nutrition Paper. 1984; (14): 107-112.
32. López A. Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas del campo al mercado. 151 ed. Argentina: FAO; 2003.

33. Guemes DR, Piagentini AM, Pirovani ME, Tesis MA. Survival and growth of Salmonella hadar on minimally processed cabbage as influenced by storage abuse conditions. J. of Food Sci. 1997 ; (3): 616-618.
34. Castro J, Rojas M, Noguera Y, Santo E, Zúñiga A, Gómez C. Calidad sanitaria de ensaladas de verduras crudas, listas para su consumo. [<http://www.alfaeditores.com/alimentaria/JulioAgosto06/Calidad.pdf?phpMyAdmin=alj69rg0MYWn18mTYfYRyPHZ2T4>]. Consultado: 29 septiembre 2010.
35. Alarcó, A. Calidad Sanitaria. [[www.comtf.es/actamedica/1999/Jun/Pag12y13.html](http://www.comtf.es/actamedica/1999/Jun/Pag12y13.html)]. Consultado: 29 septiembre 2010.
36. Cacia, I. Caracterización fisicoquímica y microbiológica para aguas subterráneas en zonas de influencia del acueducto metropolitano de Bucaramanga e implementación de los métodos de análisis para arsénico, selenio y flúor. Ed. Universidad Industrial de Santander. Colombia, 2004.
37. De la Rosa, J; Mosso, M. Diversidad microbiana de las aguas. Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. España.
38. Martínez R, Tobianny C, Perez A, Leidys N. Calidad bacteriológica del agua potable envasada comercialmente. Universidad de Oriente. Pág. 1-8. Junio 2010.
39. Jatar, A. (2000). Ciencias de la Naturaleza y Tecnología 5°. Ed CO-BO. Venezuela.

40. Larrea, F. (1998). Enfermedades transmitidas por los alimentos. Boletín de Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Dirección General sectorial de Epidemiología. Dirección de vigilancia Epidemiológica.
41. Muñoz, J. Propuesta de un sistema de vigilancia Epidemiológica en la protección de alimentos de consumo humano en Venezuela. Cuaderno de la escuela de Salud Pública. 2004 Julio-Diciembre; (76): 3-7.
42. Junta de Gobierno de la República De Venezuela. Reglamento general de alimento 1959. Decreto 525 (12 de Enero 1959).
43. Caballero, A., Legomin, N. Causa más frecuente del problema sanitario en alimentos. Revista cubana Aliments Nutr. 1998 Diciembre 12; (1): 20-23.
44. Vanderzant C, Splittstoesser D. Compendium of methods microbiology examinations of foods. Washington: APHA. 1992: 317.
45. Gil, MJ. (1998) Envenenamiento por plaguicidas en verduras, frutas y otras plantas. Revista ornitológica de pájaros.
46. Rangel, M, Zambrano, M, Fragenas, N. (1998). Calidad microbiológica de la lechuga (*Lactuca sativa*) y del cilantro (*Coriandrum sativum*) aplicando dos modalidades de desinfección.
47. Carrasco E. (2007). Análisis del riesgo microbiológico “*Listeria monocytogenes*” en ensaladas de IV gama. [Tesis Doctoral]. Córdoba: Universidad de Córdoba.
48. Muñoz, S. (2005). Frecuencia de enterobacterias en verduras frescas de consumo crudo expandidas en cuatro mercados de Lima Metropolitana. [Tesis Pregrado]. Perú: Universidad del Perú.
49. Cano, S. (2006). Método de análisis microbiológico. Normas ISO, UNE.

50. Gastón de Iriarte, E (1975). Microbiología Técnicas, controles y análisis clínicos. Ed. Augusta. Barcelona España
51. Besser, R.E., S.M. Lett, J.T. Weber, M.P. Doyle, T.J. Barrett, J.G. Wells y P.M. Griffin (1993). An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* 0157:H7 in fresh pressed apple cider. JAMA 269: 2217-2220.
52. Fernández, E. Microbiología Sanitaria. Agua y alimentos. Universidad de Guadalajara, Mexico; 1981.
53. Castro J, Rojas M, Noguera Y, Santos E, Zuñiga A, Gómez C. Calidad Sanitaria de Ensaladas de Verduras crudas listas para su consumo. Alfa Editores Técnicos. 2006; Julio-Agosto: 9-21.
54. Luna, J, Daga, J, Martínez, P. Determinación microbiológica de *Listeria* sp. en lechuga y espinaca. (Tesis Pregrado ). Colombia; 2008.
55. Mendez, E. Correlación entre la presencia de microorganismos indicadores y grupos patógenos de *E. coli* determinados por PCR en ensaladas de verduras crudas. (Tesis Pregrado). Mexico ; 2008.
56. Fuentes-Hernández, J.M; Cepedillo-Jauregui, L. (2009). Enfermedades transmitidas por los alimentos (E.T.A): Definición e historia. Cuba
57. Mossel, B. Moreno, C. B. Struijak. (2008). 2ª edición, "Microbiología de los Alimentos", Editorial Acribia, Pág. 413-414.
58. Loiret, F.G.; Ortega, E.; Kleiner, D.; Ortega-Rodés, P.; Rodés, R.; Dong, Z. 2004. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. Journal of Applied Microbiology. 97: 504-511.

59. Fulton, MacDonald. (2010). "The Bacterium *Aeromonas hydrophila* from Lizards of the genus *Anolis* in Puerto Rico". Louisiana State University Medical Center, Nueva Orleans)
60. Gyaneshwar, P.; Parekh, L. J.; Archana, G.; Poole, P. S.; Collins, M. D.; Hutson, R. A.; Naresh Kumar, G. 1999. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter absuriae*. FEMS Microbiology Letters. 171: 223-229.
61. Arias-Echandi, M., Antillon, F. Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica. Biomed. 2000; 11:113-122.
62. López, L., Romero, J., Duarte, F. Calidad microbiológica y efecto de lavado y desinfección en vegetales petrozados expendidos en Chile. ALAN. 2003; 53(4): 8.
63. Cova, G., Rosa, A. (2012). Aislamiento y susceptibilidad antimicrobiana de *Aeromonas* sp. en vegetales frescos que se utilizan para la preparación de comida rápida en puestos ambulantes de alimentos en la ciudad de Cumaná, estado Sucre. (Tesis Pregrado). Universidad de Oriente Núcleo de Sucre.
64. Ruiz, L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. (Tesis doctoral). Universidad de Barcelona.
65. Acevedo L, Mendoza C, Oyón R. Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, *Staphylococcus* sp. y hongos en ensaladas para perros

- calientes expendidas en la ciudad de Maracay, Venezuela. ALAN. 2001; 51(4): 12-22.
66. Mukherjee A, Speh D, Dyck E, Diez F. Preharvest Evaluation of Coliforms, Escherichia coli, Salmonella, and Escherichia coli O157:H7 in Organic and Conventional Produce grown by Minnesota Farmers. J Food Protect. 2004; 67(5): 894-900.
67. Pingulkar K, Kamat A, Bongirwar D. Microbiological quality of fresh leafy vegetables, salad components and ready-to-eat salad: an evidence of inhibition of Listeria monocytogenes in tomatoes. Int J Food Sci Nutr. 2001; 52 (1): 15-23.
68. Castro J, Rojas M, Noguera Y, Santos E, Zuñiga A, Gómez C. Calidad Sanitaria de Ensaladas de Verduras crudas listas para su consumo. Alfa Editores Técnicos. 2006; Julio-Agosto: 9-21.

## ANEXOS



*Anexo 1- Medios de cultivo.*



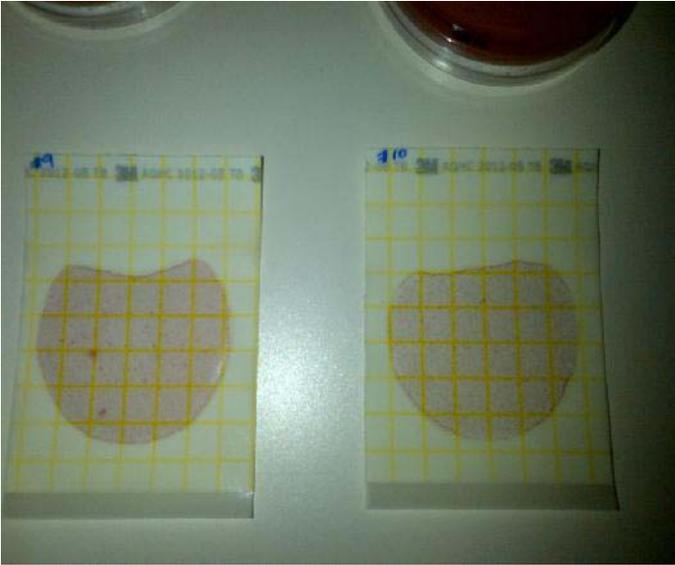
*Anexo 2- Muestras de lechuga, cilantro y perejil.*



**Anexo 3-** *Siembra de muestras en medios de cultivo.*



**Anexo 4-** *Crecimiento de colonias en Agar MK.*



**Anexo 5-** *Crecimiento bacteriano en placas Petrifilm.*



**Anexo 6-** *Galería API 20E*



**Anexo 7-. Galería API 20E**



**Anexo 8-. Galería API 20E**