

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

**Calidad sanitaria de las ensaladas expendidas en los centros comerciales
Del Municipio Libertador de la ciudad de Mérida, Estado Mérida.**

*(Trabajo especial de grado presentado como requisito para optar al título de Licenciada
en Bioanálisis)*

www.bdigital.ula.ve

Presentado por: Br. Cubillan Neila y Br Orellana Astrid

Tutor: Dr. Andueza Félix
Co-Tutora: Farm. Araque Judith

Mérida – Venezuela
Octubre de 2014 2015

DEDICATORIA

Principalmente dedicamos este trabajo a Dios, quien nos da Sabiduría e inteligencia y en cada etapa de nuestras vidas ha estado para fortalecernos y darnos aliento para seguir, y su amor eterno a través de nuestro Señor Jesús a quien le debemos la salvación y la vida, a Él sea la gloria y la Honra.

Dedicamos a nuestros padres puesto que nos brindaron apoyo en el desarrollo y transcurso de esta tesis, en donde su sabiduría y ánimo nos ayudó a concluir satisfactoriamente nuestro proyecto.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Dios por darnos la inteligencia y la fortaleza durante la elaboración de este trabajo. Él es quien da sabiduría a todas las personas si es de su voluntad darla.

Agradecemos a la ilustre Universidad de los Andes ya que nos ha formado como profesionales y nos ha dado el conocimiento necesario para el desarrollo de nuestro proyecto.

También agradecemos a nuestra Co- Tutora quien nos atendió pacientemente para la elaboración de nuestro proyecto haciendo posible el desarrollo totalmente de este. Y a aquellos compañeros y amigos que de varias maneras nos acompañaron y ayudaron en los momentos más necesarios.

www.bdigital.ula.ve



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



**Calidad sanitaria de las ensaladas expendidas en los centros comerciales
Del Municipio Libertador de la ciudad de Mérida, Estado Mérida.
Autores: Br. Cubillan Neila y Br. Astrid Orellana**

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la calidad sanitaria de las ensaladas expendidas en los centros comerciales de la ciudad de Mérida a través de la identificación de los coliformes totales y fecales y también a través de la existencia de *Staphylococcus aureus* en dicho alimento. Para esto se procedió al análisis de 3 muestras de 3 expendios ubicados en 2 centros comerciales comúnmente concurridos en la ciudad, lo cual se llevo a cabo utilizando las diluciones (1/10, 1/100 y 1/1000) y el procedimiento planteado por las normas COVENIN para la identificación de enterobacterias y *Staphylococcus aureus*. En el conteo de bacterias se encontró una cantidad incontable de enterobacterias para la muestra 2 y 3 en todas las diluciones mientras que para la muestra 1 se encontró un total en la dilución 1/10 de $4,2 \times 10^3$ ufc/gr en la dilución 1/100 se contaron $7,5 \times 10^4$ ufc y en la dilución 1/1000 no hubo crecimiento. Para *Staphylococcus aureus* para la muestra 1 en la dilución 1/10 hubieron $1,7 \times 10^3$ ufc/gr y en la dilución 1/100 se evidenciaron $9,0 \times 10^3$ ufc/gr mientras que en la dilución 1/1000 no hubo crecimiento, para la muestra 2 en la dilución 1/10 hubieron $1,3 \times 10^2$ ufc/gr y en la dilución 1/100 se contaron $6,0 \times 10^3$ ufc/gr y en la dilución 1/1000 $4,0 \times 10^4$ ufc/gr pero para la muestra 3 no hubo crecimiento. Luego se identificaron utilizando la tinción de Gram donde se observaron bacilos gramnegativos y cocos Grampositivos dispuestos en racimos, a los bacilos gramnegativos le realizamos las pruebas bioquímicas O/F el cual dio +/+, IM que dio para *Escherichia coli* ++ y para *Klebsiella* y *Enterobacter* - - para los *Staphylococcus aureus* se realizó la prueba de la catalasa dando positivo, procedimos a la coagula la cual dio positivo, evidenciando la presencia de *Staphylococcus aureus* y también el manitol salado. Y se confirmaron utilizando las galerías API 20E para enterobacterias y API Staph para *Staphylococcus aureus*.

Índice General

1. INTRODUCCIÓN
2. MARCO TEÓRICO
 - 2.1. Los Microorganismos
 - 2.2. Las Bacterias
 - 2.2.1. Bacterias Grampositivas y Gramnegativas
 - 2.2.2. Tinción de Gram
 - 2.2.3. Factores de Crecimiento
 - 2.3. Indicadores de calidad sanitaria
 - 2.3.1 Coliformes
 - 2.4. Géneros y Especies a estudiar
 - 2.4.1. Género *Staphylococcus aureus*.
 - 2.4.2. Género *Escherichia coli*
 - 2.4.3. Género *Enterobacter aerogenes*
 - 2.4.4. Género *Klebsiella pneumoniae*
 - 2.5. Principales pruebas y técnicas de identificación a utilizar
 - 2.5.1. Prueba de la coagulasa
 - 2.5.2. Prueba de Indol Motilidad (IM)
 - 2.5.3. Prueba de Hunh y Leifon (O/F)
 - 2.5.4. Siembra en placas por extensión y estrías
 - 2.5.5. Los sistemas miniaturizados API
 - 2.6. Verduras.
 - 2.6.1. Microflora de las verduras frescas
 - 2.6.2. Alteraciones microbianas de las verduras
 - 2.6.3. Ensalada
 - 2.6.4 Producción mundial de los vegetales
3. ANTECEDENTES DE LA HIPÓTESIS
4. HIPÓTESIS
5. OBJETIVOS
 - 5.1. Objetivo general
 - 5.2. Objetivo Específico
6. MATERIALES Y MÉTODOS
7. METODOLOGÍA
 - I Parte: Preparación de los diferentes medios o caldos de cultivos comerciales
 - II Parte: Siembra en los medios de cultivos
 - a) Determinación de Coliformes Totales (CT) y Coliformes Fecales (CF)

b) Determinación de *Staphylococcus aureus*

III Parte: Identificación Bacteriana

8.DISEÑO EXPERIMENTAL

9. RESULTADOS

10. DISCUSIÓN

11. CONCLUSIÓN

12. RECOMENDACIONES

13. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

14. REFERENCIAS DE PÁGINAS VIRTUALES

www.bdigital.ula.ve

Índice de Tablas

Tabla No	Página
TABLA 1. Contaje de colonias.	40
TABLA 2 Enterobacterias encontradas en las ensaladas.	41
TABLA 3. Otras bacterias encontradas en las ensaladas.	41

www.bdigital.ula.ve

Índice de Figuras

Figura No	Página
Figura 1. Estructura de la célula procariota.	13
Figura 2. Pared celular de las bacterias Gram Positivas.	14
Figura 3. Estructura de la pared celular de las bacterias Gram Negativas.	14
Figura 4. Tinción de Gram.	15
Figura 5. Prueba de la Catalasa.	21
Figura 6. Prueba de la Coagulasa.	22
Figura 7. Prueba de Indol Motilidad.	22
Figura 8. Prueba de Hugh y Leifson (O/F).	23
Figura 9. Galerías API 20E.	24
Figura 10. Galerías API STAPH.	25
Figura11. Vegetales.	25
Figura 12. Ensaladas.	26
Figura 13. Esquema de Metodología empleada.	35
Figura 14. Esquema de Diseño Experimental.	37
Figura 15. Conteo de colonias.	38
Figura 16. Identificación bacteriana.	39

1. INTRODUCCIÓN

Las necesidades básicas del hombre incluyen aire en el que se halla oxígeno en cantidad adecuada, agua que sea potable, alimentos comestibles y abrigo o alojamiento. Los alimentos proporcionan al hombre la fuente de energía necesaria para trabajar y para las reacciones químicas que se producen en su cuerpo, así como las sustancias químicas para el crecimiento. La comida es necesaria para la existencia del ser humano, hasta tal punto que la búsqueda de alimentos ha sido una de las principales ocupaciones del hombre en el transcurso de la historia. *(George, 1982).*

El control de calidad, es el grado de satisfacción que ofrece las características de un producto en relación con las exigencias del consumidor al que se destina. En el control de calidad se debe enumerar unas categorías esenciales de caracteres a los que deben responder los diversos productos. *(Idelfonso, 1999).*

- **Caracteres organolépticos:** Son apreciables por los sentidos. Se refiere a la forma, el color, la consistencia la homogeneidad, la presentación, el perfume, el aroma, el olor y la delicadeza. *(Idelfonso, 1999).*
- **Carácter de salubridad e inocuidad:** un alimento es sano cuando está en buen estado de conservación y se reconoce como apto para el consumo. Un alimento no es nocivo, incluso prolongado en el tiempo no es susceptible de causar trastorno en el organismo del consumidor. *(Idelfonso, 1999).*
- **Carácter nutritivo:** El valor nutritivo de un alimento está en función, esencialmente, de su composición y consiste en su aptitud para satisfacer las necesidades del organismo. *(Idelfonso, 1999).*

La importancia del control de higiene se debe a que los alimentos como las hortalizas favorecen el crecimiento de microorganismos patógenos debido a la contaminación accidental de agua, suelos o actividades humanas no higiénicas pudiendo afectar la salud de quienes la consumen. *(Laura y col 2001).*

Las enfermedades transmitidas por alimentos constituyen aún hoy un problema de salud a nivel mundial, no sólo en los países en vías de desarrollo sino también en aquellos desarrollados. Diversos factores ambientales, humanos, comerciales y culturales han influido para que cambien los escenarios en que estas enfermedades se manifestaban así como los alimentos involucrados en ellas, constituyéndose en nuevos desafíos para la salud pública. Cada vez son más frecuentes los brotes de enfermedad gastrointestinal

relacionados con la ingesta de vegetales frescos como lechuga, brotes de alfalfa y de soja. A pesar de la existencia de recomendaciones para la producción de alimentos con la mayor calidad microbiológica posible, la contaminación biológica sigue siendo elevada en los puestos de venta en diversos países del mundo. Entre los patógenos ligados a vegetales que se consumen crudos se encuentran tanto bacterias como virus y parásitos y su remoción por métodos convencionales de lavado nunca es total, por lo que los controles de la contaminación deben realizarse en todos los puntos desde el sitio de cultivo hasta la mesa del consumidor. (Luis, 2008).

En Mérida no se ha profundizado en estudiar el índice de contaminación de las ensaladas expendidas en puestos de venta de comida aparentemente sana como son los vegetales, que son vehículos para bacterias que están intrínsecamente relacionadas con enfermedades digestivas que afectan a niños, jóvenes y adultos.

www.bdigital.ula.ve

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Los Microorganismos.

Los microorganismos, o microbios, son unos seres muy pequeños, de tamaño microscópico. El término incluye a todos los seres vivos cuya observación requiere el uso de microscopio. (Pascual, 2005).

La Microbiología estudia los seres infinitamente pequeños, aquellos que solo pueden verse con el auxilio del microscopio, es un grupo heterogéneo porque tienen sus representantes de los reinos animal y vegetal, que por sus pequeñas dimensiones se han llamado microbios y son unicelulares. Tienen los principales atributos de los seres vivos, ya que asimilan, crecen y se reproducen. (Ernesto, 1957).

Los microorganismos y parásitos que pueden intervenir, de una forma u otra, en enfermedades de origen alimentario son:

- Bacterias.
- Virus.
- Hongos.
- Protozoos.
- Helmintos. (Pascual, 2005)

2.2. Las Bacterias.

Son microorganismos unicelulares más pequeños capaces de duplicarse por sí solos a expensas del medio que los rodea, posee un tipo de estructura muy primitiva al que se le denomina *procariotas* a diferencia de estructuras celulares evolucionadas, denominadas *eucariotas*. Carecen de núcleo endoplasmático y mitocondrias. Sin embargo tiene una estructura externa compleja: la pared celular que rodea al citoplasma. (Paraje y Amelia, 1976)

Las bacterias tienen características morfológicas que permiten diferenciarlas en grandes grupos, algunos de estos son:

- Cocos.
- Bacilos. (Paraje y Amelia, 1976).

Cocos: Bacterias redondas, con variaciones en su forma que ayudan a la identificación.

Bacilos: Bacterias alargadas en forma de bastoncitos también con variaciones propias.

Las bacterias se miden en micras. Las hay pequeñas (1 micra), medianas (alrededor de 3 micras) y grandes (más de 3 micras). Para poder ver las bacterias al microscopio, es necesario conocer algunas técnicas de coloración y luego estudiar su estructura. (*Paraje y Amelia, 1976*)

La morfología de las bacterias puede ser influenciada por la composición del medio de cultivo, por haberse desarrollado en medio sólido o en medio líquido, por la temperatura de incubación y otros factores. Cuando se describe la morfología de una especie bacteriana hay que pensar que se trata de células jóvenes en crecimiento activo, sobre un medio favorable y a temperatura eugenésica, siempre que no se especifique lo contrario. (*Ernesto, 1957*)

También puede orientarnos en su identificación y, conociendo su estructura, podremos combatirlas, porque vamos a conocer sus elementos constituyentes, su forma de nutrirse, respirar, reproducirse, etc. (*Paraje y Amelia, 1976*)

Toda bacteria está constituido por componentes que les son característicos los cuales son:

- Pared celular.

La pared celular, que tiene un espesor de 10-25 nm, garantiza gracias a su rigidez y a una cierta elasticidad, la forma característica de cada tipo de bacteria. Es muy porosa y no tiene funciones osmóticas, siendo estas desempeñadas por la membrana citoplasmática (*Hans, 1983*)

La pared es quien protege a la célula frente a sustancias tóxicas y es el lugar de acción de varios antibióticos. (*Prescott, 1999*)

- Membrana plasmática.

Las membranas plasmáticas de las bacterias contienen tanto lípidos como proteínas. La mayoría de los lípidos asociados a membranas son estructuralmente asimétricos, con extremos polares y no polares y se denominan anfipáticos, las porciones polares interactúan con el agua, se le denominan hidrófilos; los extremos no polares hidrófobos son insolubles en agua y tienden asociarse entre sí. Esta propiedad de los lípidos le confiere la capacidad de formar una bicapa en las membranas, la membrana es una barrera permeable que transporta nutrientes y residuos, claramente la membrana es esencial para la supervivencia de los microorganismos. (*Prescott, 1999*)

- **Citoplasma.**
El citoplasma de las células bacterianas posee Ribosomas y ADN pero no tiene organelas organizadas. *(Jaime, 1999)*
- **Núcleo.**
La bacteria carece de estructuras nucleares, solo posee una cadena de ADN que está estrechamente plegada llamada nucleóide. *(Jaime, 1999)*
- **Capsula.**
Material que se encuentra fuera de la pared celular, está compuesta de polisacáridos pero pueden estar constituidos por otros materiales. Confiere varias ventajas entre ellas les ayuda a resistir la fagocitosis por células fagocíticas. *(Prescott. 1999)*
- **Cilios o flagelos.**
Apéndices locomotores en forma de hilos que se extienden afuera de la membrana plasmática y pared celular. *(Prescott. 1999)*
- **Fimbrias.**
Apéndices cortos, finos, similares a pelos, más delgados que los flagelos y no participan en la movilidad. Algunas fimbrias fijan a las bacterias en superficies sólidas como los tejidos de los huéspedes. *(Prescott. 1999)*

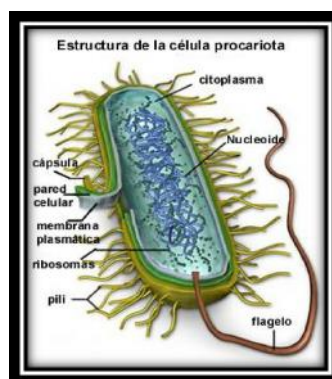


Figura 1. Estructura de la célula procariota

<http://celulabhil.galeon.com/enlaces1218266.htm>

2.2.1. Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas.

Después de que Christian Gram en 1884 desarrollase la tinción que lleva su nombre, se comprobó que las bacterias podían clasificarse en dos grupos principales, según su respuesta a este método de tinción. Las bacterias Gram positivas se tiñen de color azul-violeta, mientras que las Gramnegativas adquieren un color rosa a rojo, esto es debido a que la pared de las bacterias Gram positivas está formada por una única capa homogénea, 20 a 80 nm de grosor, de peptidoglucano o mureína; por lo contrario la pared de las bacterias Gramnegativas es bastante compleja. Posee una capa de 2 a 7 nm de grosor de peptidoglucano rodeado por una membrana externa de 7 a 8 nm y la membrana plasmática. (Prescott. 1999)

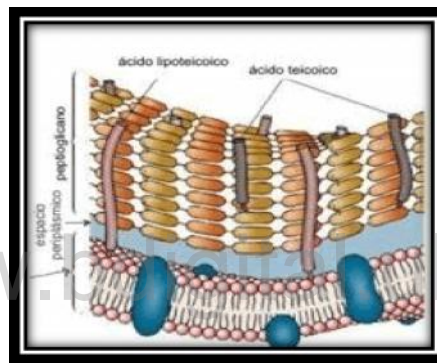


Figura 2. Pared celular de las bacterias Gram Positivas

<http://www.educa.madrid.org/web/cc.nsdelasabiduria.madrid/Ejercicios/2b/Biologia/Microbiologia/morfologia/gramnegativa.gif>

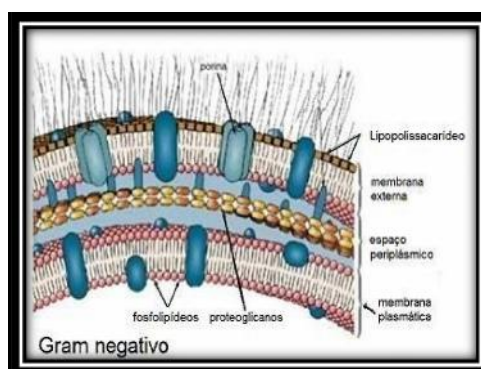


Figura 3. Estructura de la pared celular de las bacterias Gram Negativas

<http://www.educa.madrid.org/web/cc.nsdelasabiduria.madrid/Ejercicios/2b/Biologia/Microbiologia/morfologia/grampositiva.gif>

2.2.2. Tinción de Gram.

Es una coloración probablemente la más importante que se usa en bacteriología. Gracias a esta coloración las bacterias se pueden clasificar en dos grandes grupos: Gram positivas y Gramnegativas.

Durante el procedimiento, una vez fijada la muestra al portaobjeto, se le añade una solución de violeta de genciana o cristal violeta (Colorante primario) que penetra todas las bacterias de la preparación. Luego se agrega solución lugol (Mordiente), el yodo entra a la célula y forma un complejo insoluble con la violeta de genciana, posteriormente se procede a la decoloración con una mezcla de alcohol – acetona; las bacterias cuya pared celular es más densa constituida principalmente por peptidoglucano (Gram positivas), se deshidratan y cierran los poros de la pared impidiendo la salida del complejo violeta de genciana – yodo por lo tanto estas bacterias permanecen de color púrpura; mientras que las bacterias Gramnegativas debido al alto contenido de lípidos, al decolorar quedan poros en la pared que permiten la salida del complejo violeta de genciana – yodo y al adicionar colorante de contraste safranina estas toman dicho colorante por lo que se observa de color rosado. (Ramírez y col, 2006)

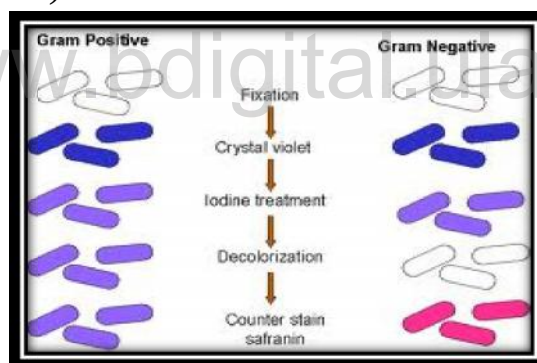


Figura 4. Tinción de Gram

<http://pathmicro.med.sc.edu/fox/gram-st.jpg>

2.2.3. Factores de crecimiento.

Las células bacterianas, al igual que todos los microorganismos vivos, requieren para multiplicarse de elementos que se encuentran en su composición química. Estos elementos deben encontrarse ya preformados en el medio de crecimiento. Existe una amplia variedad de compuestos que pueden ser utilizados como fuentes de estos elementos y de la energía necesaria para su actividad metabólica. Entre el nutrimento que se brinda a la bacteria los elementos necesarios para su crecimiento están las fuentes de carbono. Según éstas sean inorgánicas u orgánicas, las bacterias pueden clasificarse en autótrofas o heterótrofas. Son autótrofos los que pueden utilizar dióxido de carbono como fuente de carbono, y un sustrato inorgánico como fuente de energía. Las bacterias heterótrofas, por su parte,

requiere carbono orgánico para crecer. La glucosa es quizás el compuesto más utilizado como fuente orgánica algunos otros factores de crecimiento son las vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas. (*Carmona y col, 1997*).

A continuación nos referimos a otros factores que más influyen en el crecimiento bacteriano:

- Temperatura.
- Alcalinidad.
- Oxígeno. (*Carmona y col, 1997*).

2.3. Indicadores de calidad Sanitaria.

Los microorganismos indicadores de la calidad microbiológica o vida útil de los alimentos son microorganismos y/o sus productos metabólicos cuya presencia en alimentos concretos en cantidades determinadas puede ser usada para evaluar la calidad existente o mejor para predecir la vida útil de los alimentos. Cuando se usan de este modo, los microorganismos indicadores deben cumplir los criterios siguientes:

- Deben estar presentes y deben ser detectables en todos los alimentos, cuya calidad o falta de la misma se debe evaluar.
- Su multiplicación y su número debe tener una relación directa negativa con la calidad del alimento.
- Deben ser detectados y contados fácilmente y se debe poder diferenciar claramente de otros microorganismos.
- Se debe poder contar en un corto espacio de tiempo, a ser posible en una jornada de trabajo.
- Su crecimiento no debe ser obstaculizado por otros componentes de la flora de los alimentos. (*Jay, 1994*).

2.3.1. Coliformes.

Son miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Estas bacterias constituyen el 10 % de los microorganismos intestinales de los seres humanos y otros animales y se utilizan ampliamente como indicadores, los grupos de coliformes incluyen Escherichiacoli, Enterobacteraerogenes y Klebsiellapneumoniae, estos son bacterias anaerobias facultativas, Gramnegativas, no esporulante, con forma de bacilos, que fermentan la lactosa con formación de gas en 48 horas a 35 °C. (Prescott 1999)

2.4. Géneros y Especies a estudiar.

2.4.1. *Staphylococcus aureus*.

Está entre las especies cocos Grampositivo incluido en la familia Micrococcaceae. (Platki y Krivoshein, 1981).

Se pueden encontrar en nariz, boca, garganta, en la saliva, la piel, así como en contenido intestinal y las heces. Se presentan en números variables en agua, leche, agua residuales y otros objetos. (Platki y Krivoshein, 1981).

Son células redondas o algo ovaladas, de 0,5 a 15 nm de diámetro, inmóviles, no flageladas. Su característica de agrupación es en racimos. (Carmona y col, 1997).

Los *Staphylococcus* se caracterizan por una resistencia relativamente elevada a la desecación, la congelación, radiación solar y sustancias químicas.

En el estado seco viven más de 6 meses y en polvo de 50 a 100 días. La congelación y descongelación repetidas no lo mata, tampoco la acción de la radiación solar directa al estar expuesta a la misma durante horas; pueden resistir calentamiento a temperatura de 70 grados centígrados más de 1 hora. (Platki y. Krivoshein, 1981).

La patogénesis de la enfermedad estafilocócicas está determinada, tanto por las exotoxinas, como por las propias bacterias.

(Platki y Krivoshein, 1981)

En el hombre los estafilococos patógenos provocan furúnculos, meningitis, apendicitis, conjuntivitis, neumonía entre otras.

(Platki y Krivoshein, 1981)

La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* causan una enteritis estafilocócica relacionada con la síntesis de toxinas extracelulares. Estas toxinas son proteínas termorresistentes. Los efectos de las toxinas se hacen notar rápidamente y los síntomas aparecen en las 2 a 6 horas siguientes a la ingestión. El crecimiento y la producción de enterotoxinas suele realizarse cuando los alimentos contaminados se mantienen a temperatura ambiente durante varias horas. Los síntomas típicos comprenden dolor abdominal, espasmos, diarrea, vómitos y náuseas. (Prescott, 1999)

Los 5 factores implicados en la contaminación por el estafilococo con mayor frecuencia son:

- Refrigeración insuficiente.
 - Preparación de los alimentos con excesiva anticipación al servicio planificado.
 - Deficiente práctica de higiene personal de las personas infectadas.
 - Cocción o tratamiento térmico insuficiente.
 - Mantenimiento de alimento en dispositivos para conservarlo caliente a temperaturas apropiadas para el crecimiento de las bacterias.
- (Platki y Krivoshein, 1981).

2.4.2. *Escherichia coli*.

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Durante mucho tiempo fue la única especie de este género, hoy en día agrupa a otras cinco de las cuales tres son de importancia: *E. hermannii*, *E. fergusonii*, *E. vulneris*. (Carmona y col, 1997).

Habita en el intestino grueso del hombre y los mamíferos, así como en el intestino de las aves, los peces, los reptiles, los anfibios y los insectos. Se encuentra constantemente en el medio ambiente (suelo, el agua y los objetos). (Platki y Krivoshein, 1981).

Se trata de bacilos entre 1 a 3 μm X 0.6 μm , que se presentan solos o en parejas, son inmóviles no capsulados y son gramnegativos. (Carmona y col, 1997)

Los coliformes sobreviven en el medio ambiente durante varias semanas y meses, su resistencia a factores físicos y químicos externos es elevada. La temperatura de 55°C los destruye en una hora y la de 6°C en 15 minutos. (Platki y Krivoshein, 1981).

Aunque forma parte de la flora intestinal normal del ser humano, es capaz de ejercer acción patógena en el intestino o fuera de él. *Escherichia coli* está asociada con al menos cuatro tipos de enfermedades entéricas en el humano; incluye cepas enteropatógenas

(EPEC), enterotoxigenas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC) enterohemorrágicas (EHEC) (Platki y Krivoshein, 1981).

La ETEC, esta produce enterotoxinas que son responsables de la diarrea y que se distingue por su estabilidad frente al calor, la diarrea es acuosa eliminando electrolitos y agua por la luz intestinal. (Prescott. 1999)

La ECEI, esta tiene la capacidad de invadir las células epiteliales se acompaña de la presencia de un gran plásmido. Puede producir también una citotoxina y una enterotoxina. Produce diarrea en el hombre. (Prescott. 1999)

La EPEC, se adhiere al epitelio intestinal y causa daño celular se representa por la destrucción de las microvellosidades, esta destrucción celular lleva a la diarrea. (Prescott. 1999)

La EHEC, lleva los determinantes genéticos para producir las lesiones de anclaje y aclaramiento, es decir produce destrucción de las microvellosidades y los de producción de toxinas, se creen que estas toxinas matan las células del endotelio vascular. Un serotipo importante de EHEC es *Escherichia coli* 0157.H7 que ha provocando muchos brotes de colitis hemorrágica. (Prescott. 1999)

2.4.3. Género *Enterobacter*.

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, se conocen actualmente ocho especies; sin embargo solo cinco tienen importancia clínica en infecciones en el ser humano: *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. agglomerans*, *E. gergoviae* y *E. sakazaki*. Comprende un grupo heterogéneo de bacilos gramnegativos. (Carmona y col, 1997).

Enterobacter aerogenes común en suelos y aguas y alguna veces en el tracto intestinal.

Como medida de salud pública, se ha establecido que la forma más adecuada de proteger a la población contra las enfermedades transmitidas por el agua, es evaluar su contaminación fecal para determinar la presencia de *Enterobacter*, sin embargo el examen bacteriológico se debe diferenciar de *Escherichia coli* ya que es la más frecuente. (Carmona y col, 1997)

2.4.4. *Klebsiella pneumoniae*.

K. pneumoniae es un bacilo Gram-negativo, no móvil, de la familia Enterobacteriaceae. Es la especie de mayor importancia clínica y más estudiada dentro del género *Klebsiella*.

Dentro de su hábitat se encuentra el suelo y el agua siendo este un vehículo para contaminar alimento especialmente vegetales y el intestino humano

Klebsiella pneumoniae es considerada como una de las especies bacterianas como agente etiológico de enfermedades gastrointestinales, en ocasiones, los cultivos primarios de heces de pacientes con diarreas muestran un crecimiento denso asociado con ésta que en dichas cantidades no forman parte de la microbiota del tracto gastrointestinal

Se observó en una paciente varios episodios infecciosos siendo uno de los más importantes la bacteriemia por *K. pneumoniae* a punto de partida probablemente intestinal, digo esto porque ante el cuadro diarreico sufrido por el paciente estudiamos un coprocultivo que mostró una severa disbacteriosis en la materia fecal, aislándose como flora única *Klebsiella pneumoniae* multirresistente, ésta enterobacteria es ampliamente conocida como agente etiológico de neumonías, infecciones urinarias, del tejido celular subcutáneo y sepsis en el medio hospitalario .

Son múltiples sus factores de virulencias, algunos de estos son: el polisacárido capsular las fimbrias y las toxinas.(S pedrari 1996)

El significado clínico de especies de *Klebsiella*, tradicionalmente, ha sido limitado a neumonía pulmonar; sin embargo, se ha visto que estos microorganismos son capaces de causar una gran variedad de infecciones, incluyendo brotes institucionales de diarrea infantil.

Realizaron un estudio sobre la Microflora patógena de la familia Enterobacteriaceae en dos grupos de niños, sanos y con infección intestinal aguda, hallando como principal diferencia entre ellos la presencia de especies de género *Klebsiella* con un desarrollo abundante en los infantes enfermos.

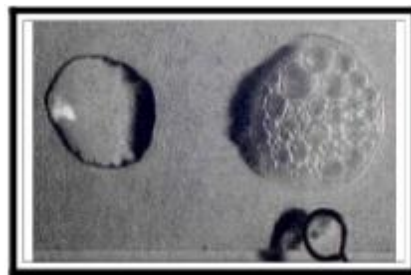
2.5. Principales pruebas y técnicas de identificación microbiana a utilizar.

2.5.1. Prueba de la catalasa

Se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La principal excepción es *Streptococcus*.

Método del portaobjeto

•Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18-24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio de vidrio.



www.bdigital.ula.ve

una suspensión de un cultivo bacteriano productor de coagulasa libre, después de unas horas de incubación se puede observar la formación de un coagulo. (Ramírez y col, 2006).

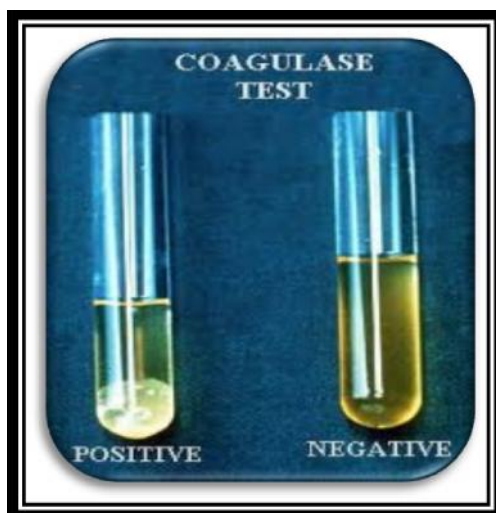


Figura 6. Prueba de la Coagulasa

<http://www.telmeds.org/wp-content/uploads/2009/10/coagulase.bmp>

2.5.3. Prueba de indol motilidad.

Determina la capacidad de un microorganismo de moverse (presencia de flagelos) y de producir INDOL.

Lectura: Se efectúa de 18 a 24 horas de incubación a 37°C. Agregar 10 gotas de reactivo de EHRLICH. Fundamento: el INDOL es uno de los productos del metabolismo del aminoácido TRIPTOFANO. Las bacterias que poseen la enzima TRIPTOFANASA son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. El indol se puede detectar en un medio adecuado observando el desarrollo de un color rojo después de agregar el reactivo de Kovacs indicando una prueba POSITIVA, debido a que el indol reacciona con el grupo aldehído del p- dimetilaminobenzaldehído. Si el color es amarillo indica una prueba NEGATIVA. La prueba de motilidad se interpreta realizando un cuidadoso examen macroscópico del medio para observar una zona de desarrollo difuso que parte de la línea de inoculación. (Martha Murcia Aranguren 2000).

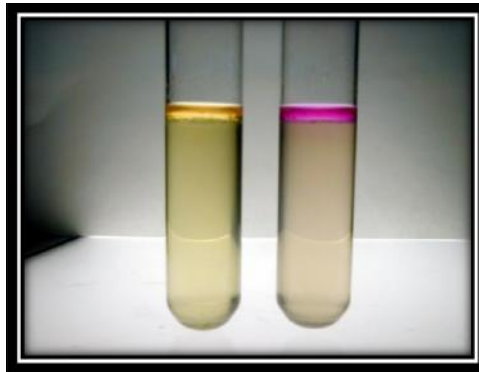


Figura 7. Prueba de Indol Motilidad

<http://microbiologiabioanalisis.blogspot.com/2012/06/prueba-de-indol-fundamento-evalua-la.html>

2.5.4. Prueba de Hugh y Leifson (O/F).

Determina el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono, lo cual ayuda a la identificación de las bacterias aerobias o anaerobias facultativas, tales como los bacilos gramnegativos o fermentadores y de otros microorganismos.

Las bacterias utilizan los hidratos de carbono para uno o dos procesos metabólicos, fermentativo u oxidativo.

Las bacterias, al utilizar el carbohidrato por cualquiera de los dos metabolismos, producen ácidos que disminuyen el pH del medio por lo cual el indicador azul de bromotimol vira de verde a amarillo. La baja proporción de peptonas reducen la formación de aminos alcalinas que pudieran neutralizar las pequeñas cantidades de ácidos débiles formados durante el metabolismo oxidativo. Las grandes cantidades de glucosa permiten la formación de mayor cantidad de ácido. La consistencia semisólida del agar

Permite que el ácido producido permanezca concentrado. (Ramírez y col, 2006).

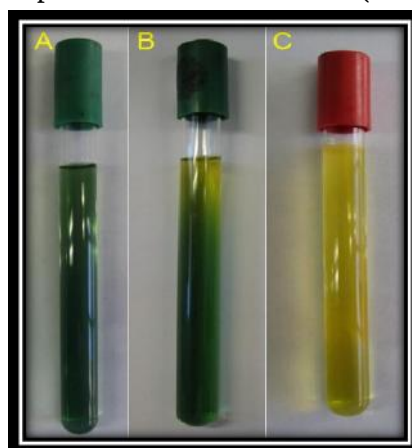


Figura 8. Prueba de Hugh y Leifson (O/F).

http://www.cfkeep.org/html/phpThumb.php?src=/uploads/of_tests_normal_oxidation_fermentation_copy2.jpg&a0e=1&

2.5.5. Siembra en placas por extensión y estrías.

Se extiende una mezcla de células en una superficie de agar, de manera que cada célula crezca formando una colonia independiente (formación o agrupación macroscópicamente visible) cada colonia representa un cultivo puro. La siembra por extensión es una forma fácil y directa de conseguir este resultado. Se pasa un volumen pequeño de una mezcla microbiana diluida que contenga entre 100 y 200 células, o menos, al centro de una placa de agar y se extiende uniformemente sobre la superficie de la placa con una varilla doblada de vidrio estéril. Las células dispersas desarrollan colonias aisladas. Como el número de colonias debe ser igual al número de organismos de la muestra, este tipo de siembra puede usarse para contar una población microbiana.

Las colonias puras se pueden obtener también mediante siembras en estrías. Se pasa la muestra microbiana a un extremo de la placa de agar con un asa de inoculación o con un hisopo formando estrías en la superficie siguiendo un patrón. En algunos puntos de este proceso algunas células individuales se desprenden del asa al frotarla con la superficie y desarrollan colonias separadas. (*Prescott y col, 2004*)

2.5.6. Los sistemas miniaturizados API.

Son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Estos sistemas consisten en un dispositivo de plástico con varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratado o diferentes sustratos de enzimas de acuerdo al tipo de prueba que se requiere montar. Entre algunas de las pruebas bioquímicas que pueden realizarse con estos sistemas están las pruebas de fermentación de carbohidratos, la determinación de la producción de H₂S, la determinación de la hidrólisis de la gelatina, entre otras. (*BIOMERUX*).

2.5.6.1. Galerías API 20E.

Permite la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de las Enterobacterias y de otros bacilos Gram negativos. Es una galería conformada por 20 microtubos. (*BIOMERUX*).

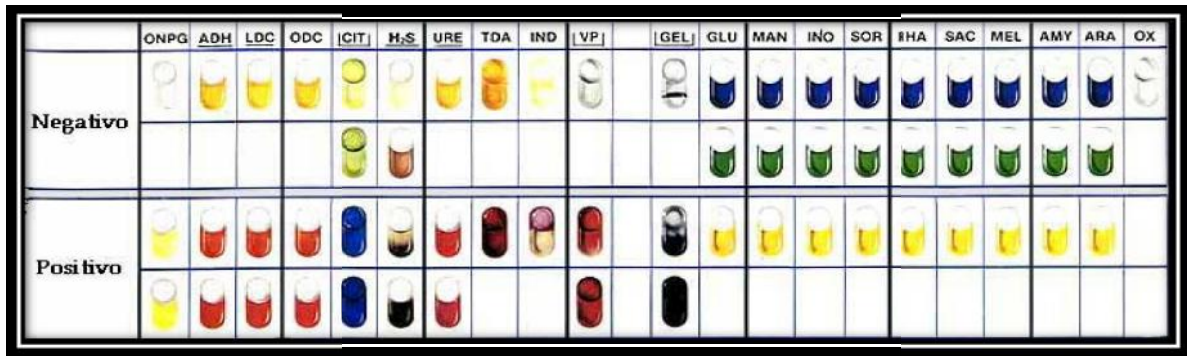


Figura 9. Galerías API 20E.

<http://www.uib.es/depart/dba/microbiologia/seminarios/PerfilLecturaAPI2E.jpg>

2.5.6.2. Galerías API STAPH.

Este sistema permite la identificación de microorganismos pertenecientes al género *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kocuria*. Es una galería conformada por 20 Microtubos. (BIOMERUX).



Figura 10. Galerías API STAPH.

<http://www.pro-analise.com.br/img/uploads/produtos/BM20050.jpg>

2.6. Vegetales.

Las verduras, es decir la parte fresca de la planta, constituyen un grupo muy heterogéneo de estructuras vegetales alimenticias procedentes de organismos muy dispares, que incluye algas, hongos, raíces, tubérculos, tallos, hojas, semillas y frutos. Por esta razón la composición de las verduras varía significativamente, pero constituye en general, una

fuerza imprescindible de vitaminas, minerales y fibra alimenticia al margen de su contenido de carbohidratos y proteínas. (Benites, 2005).



Figura11. Vegetales

http://i.istockimg.com/file_thumbview_approve/6782520/2/stock-photo-6782520-vegetales-sanos.jpg

2.6.1. Microflora de las verduras frescas.

Las bacterias son especialmente frecuentes en las verduras, cuyo pH es neutro mientras que las levaduras prefieren un pH ácido, están con más frecuencia en las frutas. La microflora de las verduras está formada ante todo por las bacterias de los siguientes géneros *Alcaligenes*, *Achrobacter*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus* y *Micrococcus*. Además aparecen numerosos representantes de hongos, por ejemplo especies de los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Sclerotinia* y *Rhizoctonia*. (Müller, 1981).

2.6.2. Alteraciones microbianas de las verduras.

Las lesiones producidas en las verduras por insectos y otros animales, así como los daños originados durante la recolección, transporte y almacenamiento, ofrecen numerosas posibilidades a los gérmenes saprófitos para penetrar y propagarse a los tejidos de las plantas. El resultado es siempre una alteración más o menos grave. Además la pérdida puede deberse no sólo a parásitos dañinos sino también a procesos enzimáticos indeseables. Las enzimas respiratorias de los tejidos de las plantas, que siguen siendo activos después de la recolección de las hortalizas conducen a su autoalteración. Si no se controla la respiración, como en el caso de grandes almacenes, las espinacas, lechuga, coles y otras numerosas especies de verdura sufren pardeamientos y ennegrecimiento. Otras especies de bacterias de vida saprofita causan acidez y mucosidad. . (Müller, 1981).

2.6.3. Ensaladas.

Es una preparación a base de varios alimentos, crudos o cocidos, predominando generalmente las hortalizas y verduras, aderezadas con aceite, vinagre y sal, vinagretas u otras salsas más densas. (Jesús, 2006).



Figura 12. Ensaladas.

http://t1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTBktqYk13mIHye4cTt9bS7abbFQaPeg1PfpibICu_Vbt8s43r6RQ

2.6.4. Producción mundial de vegetales.

La producción mundial de verdura supero en 2004 a los 440 millones de Tm. Siendo los cultivos más importantes, la patata, la mandioca, la batata, el tomate, seguidos de lejo por la col, la cebolla, el ñame, el pepino, la berenjena el pimiento y la zanahoria, y en menor medida, la lechuga, la calabaza, la coliflor, el ajo y la espinaca. (Benites, 2005)

3. ANTECEDENTES DE LA HIPÓTESIS.

Se valoró la calidad bacteriológica de 696 comidas listas para su consumo preparadas desde 1991 a 2009. 454 muestras correspondían a alimentos tratados térmicamente y el resto a alimentos que llevaban ingredientes que no son metidos a cocción. Las muestras se escogieron al final de su elaboración, y antes de distribuirlas, en diferentes establecimientos. Los criterios considerados fueron NMP/g de Coliformes, Coliformes fecales y *Escherichia coli*; y recuentos (UFC/g) de aerobios mesófilos y *Staphylococcus aureus* (coagulasa +), según normas COVENIN y FONDONORMA. Al momento de la captación el promedio de la temperatura de las comidas servidas en frío fue 13,4 °C y el de las cocinadas 32,2 °C. Los menores porcentajes de cumplimiento a todos los requisitos los tuvieron las rebanadas de jamón y queso (28%), rellenos de arepas y empanadas (28%), pastas italianas (23%), postres horneados (13%) y ensaladas con ingredientes crudos (7%). En este tipo de ensaladas sólo cumplieron los requisitos de Coliformes, Coliformes fecales y recuentos de aerobios mesófilos el 19%; 31% y 24% de las muestras respectivamente. (Iriarte R, María M. 2011).

En la actualidad las ensaladas frescas constituyen un alimento esencial en la dieta de las personas, ya que es de todos conocido que las frutas y hortalizas deben estar presentes en la dieta diaria, debido a los diferentes nutrientes que estas aportan, las ensaladas frescas están compuestas en su mayoría por hortalizas como: cebolla, lechuga, tomate, zanahoria, pepino, chile verde. El objetivo del estudio fue determinar los contaminantes microbiológicos en las ensaladas frescas que se comercializan en los establecimientos de comida rápida del distrito, dos de la zona metropolitana de San Salvador en el periodo de abril - septiembre de 2009. Se realizó la identificación y recuento de Bacterias Mesófilas Aeróbias, determinación de Bacterias Coliformes Totales y Fecales, se determinó la presencia de *Escherichia coli*, y se realizó la identificación para *Salmonella*, sembrando en Agar *Salmonella-Shigella*, a partir de caldo tetraciónato, las colonias obtenidas se aislaron en agar TSA para aislar el microorganismo en estudio, de las colonias de agar TSA se realizaron pruebas bioquímicas para comprobar si la colonias sospechosas eran de *Proteus* spp o de *Salmonella*. De acuerdo a los resultados obtenidos en los análisis de las muestras de ensaladas frescas, se encontró la presencia de *Escherichia coli* y *Proteus* spp., Coliformes totales y fecales, los cuales deben estar ausentes en las ensaladas frescas. Para el recuento de Bacterias Mesófilas Aeróbias, se obtuvieron valores altos de UFC/g. Con respecto a los resultados obtenidos, el 100% de las muestras no cumplen con la Norma establecida (NOM-093-SSA-1994), debido a que no se encuentran en los valores límites propuestos por lo que no son aptas para consumo humano. Por lo que se recomienda a las instituciones de salud correspondientes que realicen monitoreos periódicos en los establecimientos de comida rápida que comercializan ensaladas frescas, para verificar que las condiciones en que estas se preparan sean las idóneas y se ofrezca al consumidor un producto de calidad. (Aválos Alas y col 2009)

Se determinó el nivel de coliformes fecales y la frecuencia de *Escherichia coli* en 85 muestras de hortalizas cebolla, rabanito, culantro, lechuga y perejil., obtenidas de manera aleatoria y expandidas en los principales mercados de Cajamarca. El procesamiento, aislamiento e identificación bacteriana se realizó según la Food and Drug Administration (FDA). El 40% de muestras presentaron coliformes fecales, con elevado Número Más Probable por gramo (NMP/g) e importante frecuencia de *Escherichia coli* en perejil y lechuga. El análisis revela un alto nivel de contaminación fecal, un estado sanitario inaceptable y la necesidad de establecer medidas de control frente al riesgo que esto representa para la salud. (Marco Rivera Jacinto y col 2009)

Se analizó la calidad microbiológica de 300 vegetales (100 lechugas, 100 cilantros y 100 perejiles) en dos mercados de la ciudad de Maracaibo. Se determinó coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y *Escherichia coli* por la técnica del número más probable. Los CT oscilaron entre 103-109 NMP/gr en más del 80% de las lechugas adquiridas en ambos mercados; mientras que los CF se ubicaron entre 101-107 NMP/gr en 90% de las muestras del mercado 2. Para 96% de los cilantros los CT estuvieron entre 104-109 NMP/gr. Los CF se ubicaron entre 104-109 NMP/gr en 88% y 84% de las muestras del mercado 1 y 2. Los CT oscilaron entre 104-109 NMP/gr en 90% o más de los perejiles. Se obtuvieron valores de CF entre 103-109 NMP/gr en 82% y 60% de los especímenes recolectados en el mercado 1 y 2, respectivamente. 52% de las muestras de perejil adquiridas en el mercado 1 presentaron recuentos elevados para *E. coli* (104-107 NMP/gr). Según los criterios microbiológicos para *E. coli*, 84,7% de los vegetales fueron satisfactorios y 15,3% insatisfactorios. Debido a la variabilidad de los niveles de coliformes y *E. coli* en los vegetales frescos, es recomendable establecer normas locales para evaluar la calidad microbiológica de estos alimentos. (Gresleida Rincón Villalobos y col 2010)

Los alimentos listos para el consumo, expedidos en locales públicos, son un medio en el que se dan las condiciones para el desarrollo de microorganismos, estos por falta de saneamiento ambiental o por malas prácticas de higiene, pudiendo convertirse en una vía principal de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS), de manipuladores a consumidores. Por eso el objetivo principal de la investigación fue evaluar la calidad microbiológica de alimentos en los establecimientos públicos que se preparan y se sirven en la ciudad de “El Alto”, Los estudios se realizaron en los meses de marzo a mayo del año 2006. Primeramente se tomó muestras y luego se procedió a evaluar la calidad microbiológica de cuarenta (40) alimentos listos para el consumo, los ensayos realizados fueron un recuento de coliformes totales, fecales, e identificación de *Salmonella* y *Escherichia coli*. Los agentes microbiológicos fueron relacionados con los alimentos implicados como ser los tipos de sopas, segundos, y aderezos. En estas pruebas se comprobó que los contaminantes más frecuentes son producidos por gérmenes potencialmente patógenos como *E. coli* 5 % y *Salmonella* en un 7.50% de un total 12.50% alimentos contaminados. En conclusión del 100% (40 muestras) 17.50% presentó contaminación por coliformes y un 82.50% no presentó ningún tipo de contaminación, pero los riesgos predominantes existen en la *Salmonella* y *E. coli* presentes por la deficiencia en la elaboración o refrigeración, y la falta de higiene asociados a la mala manipulación. (Condori Apaza, Amalia. 2009)

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el grado de contaminación fecal en tres verduras de mayor consumo crudo que se expenden en cuatro mercados mayoristas de Lima, Perú: La Parada, Ramón Castilla, Ceres y Caquetá. Se recolectaron 15 muestras de lechuga (*Lactuca sativa*), 15 de col (*Brassica oleracea*) y 15 de espinaca (*Spinacea oleracea*) por mercado en un año (n=180). Las muestras fueron procesadas por el método del Número Más Probable para la detección y recuento de coliformes fecales y *E. coli* Tipo I (Típico), así como por la prueba de Ausencia/Presencia para *Salmonella*. El estudio demostró que el 18.9% del total de verduras y el 22.2% de verduras provenientes del mercado de La Parada presentaron niveles de coli fecales superiores a lo establecido por la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), siendo la espinaca la más contaminada. Además, el 2.2% de verduras del mercado Caquetá presentó niveles elevados de *E. coli* Tipo I (Típico) y el 10% de las verduras presentó contaminación por *Salmonella* spp, especialmente la col. (Silvia Muñoz J y cols 2013)

Tomando en cuenta los estudios que se han realizado en diferentes países y así mismo planteando el problema que se presenta podemos decir que Mérida por ser una ciudad estudiantil, son muy concurridos los locales de comida rápida, entre estos unos de los más predilectos son aquellos donde se venden comida aparentemente saludable como en este caso las ensaladas. Cabe destacar el alto grado de contaminación que estas pueden tener, ocasionando enfermedades que sin un diagnóstico precoz y un tratamiento oportuno pueden ocasionar daños irreversibles.

www.bdigital.ula.ve

4. HIPÓTESIS

En las ensaladas que se expenden en los sitios de comida rápida ubicados en los principales centros comerciales del municipio Libertador del Estado Mérida, se encuentran niveles elevados de los indicadores de calidad sanitaria, así como la presencia de bacterias patógenas como Enterobacterias y *Staphylococcus aureus*.

www.bdigital.ula.ve

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la calidad sanitaria de las ensaladas expendidas en dos Centros Comerciales, ubicados en el Municipio Libertador del Estado Mérida, y la presencia de bacterias patógenas trasmisoras de enfermedades alimentarias.

www.bdigital.ula.ve

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la presencia de *Staphylococcus aureus*.
- Cuantificar la cantidad de *Staphylococcus aureus*
- Enumerar la cantidad de Bacterias Coliformes Totales y Fecales.

www.bdigital.ula.ve

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Población y muestra.

La investigación se estructuró en un enfoque experimental donde se estudió 3 expendio fijos de comida fresca específicamente ensaladas ubicadas dentro de 2 centros comerciales situados en el municipio Libertador.

Se ejecuto la ubicación y la descripción de cada expendio, así como el análisis visual del local y la manipulación de los alimentos, se compro la ensalada en cada local y seguidamente se llevó al Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, donde se procedió el análisis microbiológico.

Materiales.

Materiales biológicos: Muestras de ensaladas frescas recolectadas en distintos locales de los Centros Comerciales.

Agar y caldos a utilizar:

- Agar Baird Parker.
- Agar Manitol Salado.
- Agar Mac Conkey.
- Agar BHI
- Agar O/F. (medio de oxidación/fermentación)
- Agar Indol motilidad
- Agua peptonada 0,1 %
-

Otros:

- Galerías API 20E Galerías y API Staph

7. METODOLOGÍA

I Parte: preparación de los diferentes medios o caldos de cultivos comerciales:

Todos los medios y caldos de cultivos comerciales que se utilizaran serán preparados según los pasos descritos en su respectivo envase.

Se tomó 10 gr de las ensaladas uno de cada uno todas separadas para evitar contaminación y se colocó en un envase de vidrio con 90 ml de agua peptonada al 0,1 % previamente identificados con el nombre de cada expendio de ensaladas, siendo ésta la primera dilución luego se agregó a un segundo tubo con 9 ml de agua peptonada al 0,1 % 1 ml de la primera dilución teniendo como resultado la segunda dilución donde se tomó 1 ml de esta y se agregó finalmente en un tercer tubo con 9 ml de agua peptonada igualmente al 0,1 % para la tercera dilución

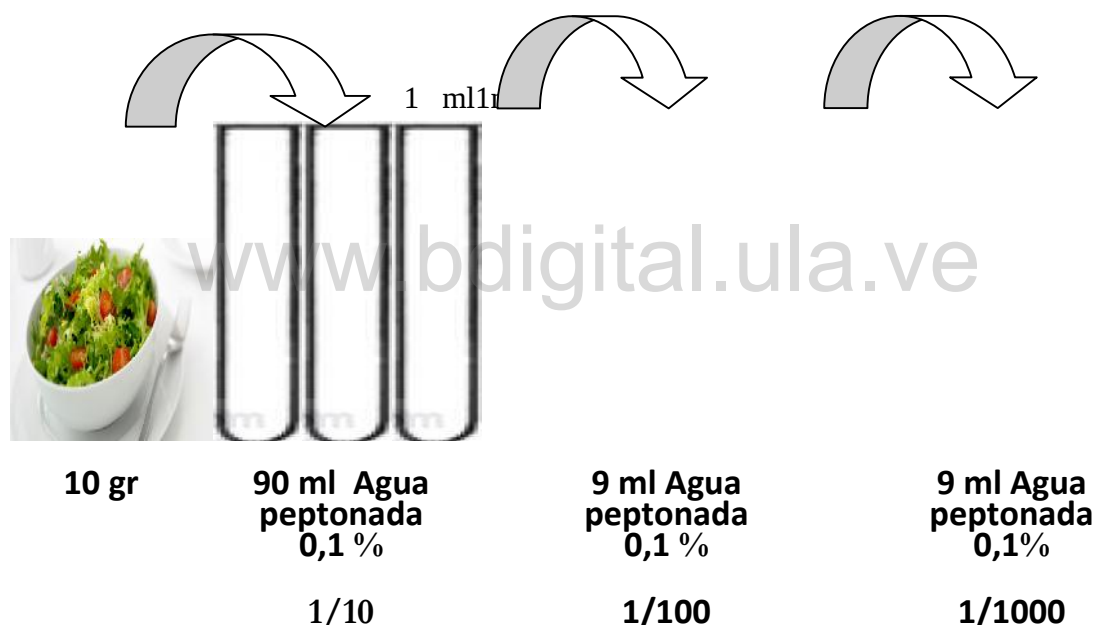


Figura 13. Esquema de Metodología empleada.

II Parte: Siembra en los medios de cultivos.

a) Estudio de la presencia de *Staphylococcus aureus*.

La determinación se realizara siguiendo las normas que establece la norma COVENIN 1292 – 89.

1. Se colocó mediante una pipeta estéril 0,1 ml de la disolución de la muestra en placas de Petri con Agar Baird Parker (BP) distribuyendo la muestra por siembra de superficie.

2. Se incubó a una temperatura de 37 grados centígrados durante 24 o 48 horas.
3. Finalizado el período de incubación se realizó el conteo de las colonias.

b) Determinación de Coliformes Totales (CT) y Coliformes Fecales (CF).

La determinación se realizó siguiendo el procedimiento que establecen las normas COVENIN 1104-1996.

1. Se inoculó 0,1 ml de la disolución en agar Mac Conkey
2. Se incubó a una temperatura de 37 grados centígrados por 24 horas.
3. Finalizado el periodo de incubación se realizó el conteo de colonias

Posteriormente al conteo de colonias se procedió a repicar en agar BHI y se incubó a 37 °C por 24 h.

III parte Identificación Bacteriana.

Luego del crecimiento en agar BHI de las colonias de interés. Se procederá hacer la tinción de Gram a todas aquellas colonias aisladas.

Según la morfología y tinción observada en la tinción de Gram, a las colonias puras se le realizara las pruebas bioquímicas que corresponden.

Para los Cocos Grampositivo se le realizó la prueba de la coagulasa y el crecimiento en agar manitol salado y se usaran las galerías API Staph para la confirmación de *Staphylococcus aureus*.

Para los bacilos Gram negativos se le realizara la prueba de Hugh y Leifson (O/F), la prueba de indol motilidad (IM) y se usaran las galerías API 20E para la confirmación de Enterobacterias.

8. DISEÑO EXPERIMENTAL

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

10GR



90ml Agua peptonada 0,1% 1/10



1ml de la dilución

9 ml Agua peptonada 0,1% 1/100



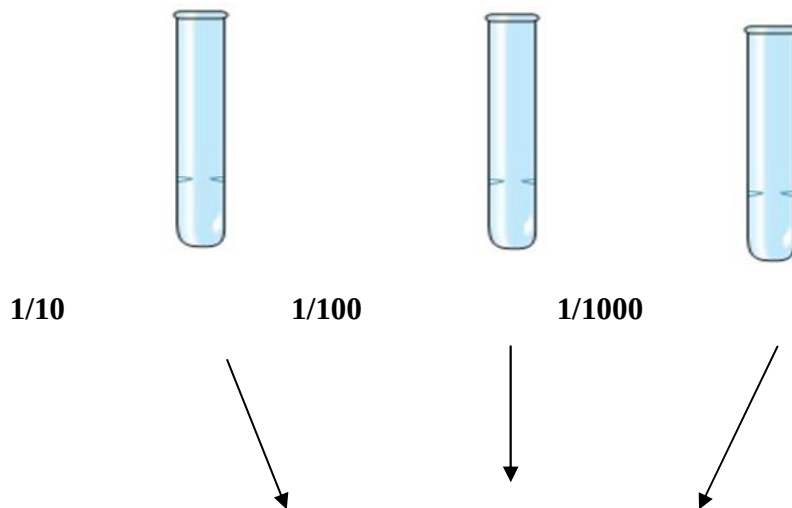
1 ml de la dilución

9ml Agua pepton. 0,1% 1/1000



Figura 14. Esquema de Diseño Experimental.

Conteo de Colonias



Se inocular desde la más diluida hasta la más concentrada

www.bdigital.ula.ve

Agar Baird Parker



de la dilución

Para *Staphylococcus* spp 37°C X 24h

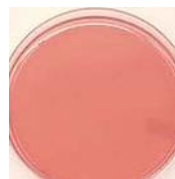


Agar Mac Conkey



de la dilución 37°C X 24h

Para Enterobacterias



Las colonias de interés de estos agares se repicaron en Agar BHI

Figura 15. Conteo de colonias

Identificación Bacteriana

A partir de las colonias del Agar BHI

Se realizo

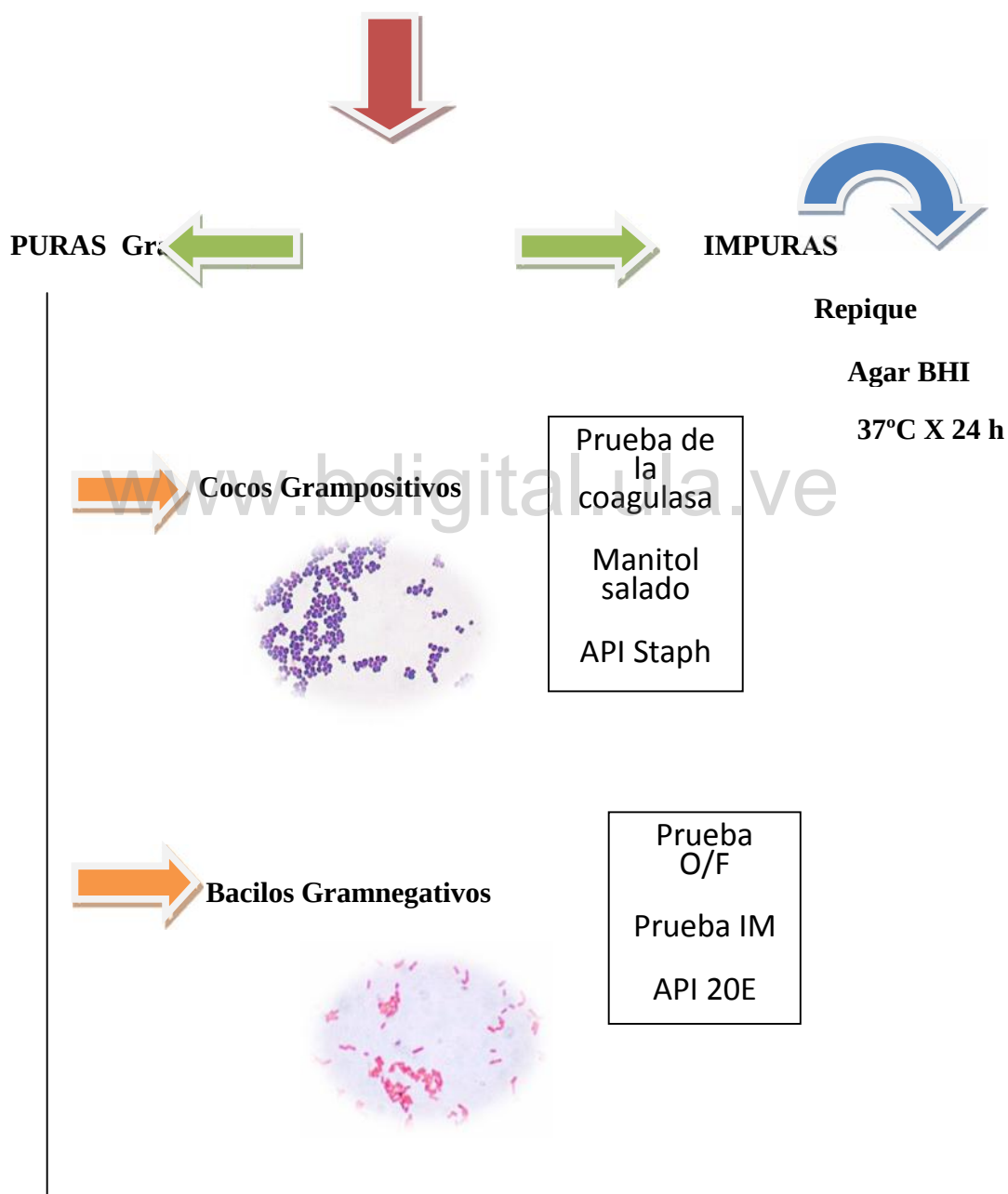


Figura 16. Identificación bacteriana.

9. RESULTADOS

Conteo de colonias

Inoculamos en Mac Conkey, un medio para cada dilución (1/10, 1/100, 1/1000) dejamos 24h para su crecimiento, observamos en la lámpara donde cuantificamos el numero de colonias, en la dilución 1/10 de cada una de las muestras fue donde se observaron el mayor numero de colonias, en la muestra 1 se vio por 5cm² 33 colonias, mientras que en las muestras 2 y 3 fueron incontables, en tanto aumentaba la dilución disminuía el numero de colonias, aun que en la muestra 3 tuvo un número significativo de 149 colonias en la última dilución.

MK

BP

MUESTRA	1/10	1/100	1/1000	1/10	1/100	1/1000
1	4,2x10 ³ Ufc/g	7,5x10 ⁴ Ufc/g	0	1,7x10 ³ Ufc/g	9,0x10 ³ Ufc/g	0
2	Incontables	11,5x10 ⁴ Ufc/g	7,2x10 ⁴ Ufc/g	1,3x10 ² Ufc/g	6,0x10 ³ Ufc/g	4,0x10 ⁴ Ufc/g
3	Incontables	14,2x10 ⁴ Ufc/g	14,9x10 ⁴ Ufc/g	0	0	0

TABLA 1. Contaje de colonias

Identificación Bacteriana

A partir del Agar Mac Conkey para las Enterobacterias, se tomó de cada placa (cada dilución) dos colonias (Lact + y Lact -) a las cuales se le hizo la tinción de Gram. En la muestra n°1 no se encontraron estructuras morfológicas asociadas a Enterobacterias, en la muestra n°2 y 3 se observaron bacilos Gram -.

Se procedió a realizarla identificación de los bacilos con la prueba bioquímica O/F, Se inoculó en el medio a 37°C X 24 h las colonias. Los resultados obtenidos fueron O/F +/+ para los 7 bacilos gramnegativos, dando como evidencia que la bacteria presente puede oxidar y fermentar el carbohidrato presente.

Para la prueba IM para *Escherichiacoli* es ++ y para *Klebsiellapneumoniae* y *Enterobacteraerogenes* -

Para la identificación de *Staphylococcus aureus*. A partir del agar Baird Parker se tomó las colonias de interés (Colonias negras) y se realizó el Gram observándose en la muestra n° 1 y 2 cocos Gram +.

En el manitol salado se observaron colonias amarillas pequeñas puntiforme; Posteriormente realizamos la coagulasa la cual dio positivo por la presencia del coagulo arrojando como resultado *S. aureus*. Para confirmar la presencia de *Staphylococcus aureus* realizamos la galería API Staph lo cual nos identificó con una alta probabilidad de que era *Staphylococcus aureus*.

De igual manera realizamos la prueba API 20 E para las Enterobacterias. Confirmando: *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*.

Bacilos Gramnegativos	
Muestra	Género y Especie
M1	No se encontraron estructuras morfológicas sugestivas a Enterobacterias
M2	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
M3	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Escherichia coli</i>

TABLA 2. Enterobacterias encontradas en las ensaladas

Cocos Grampositivos	
Muestra	Género y Especie
M1 y M2	<i>Staphylococcus aureus</i>
M3	No hubo crecimiento

TABLA 3. Otras bacterias encontradas en las ensaladas.

10. DISCUSION

En los expendios situados en los dos centros comerciales del estado Mérida municipio libertador, se pudo evidenciar que la mayoría de las muestras de ensaladas procedentes de dichos establecimientos presentaron coliformes totales y coliformes fecales además de la presencia de *Staphylococcus aureus*. Lo que demostró una deficiencia en la manipulación e higiene de los alimentos.

Aun cuando las ensaladas elaboradas en estos puestos de comida cuenta con un permiso sanitario, presentan un peligro inminente para la salud de la población en general debido a la presencia de coliformes el cual se expresa como un indicador de la calidad sanitaria de los alimentos.

La presencia de bacterias del género *Klebsiella*, *Enterobacter* y *S. aureus* en los alimentos puede deberse a contaminación del mismo durante la manipulación por los empleados que son portadores de microorganismos a nivel de fosas nasales, faringe o piel, estas bacterias pueden ser introducidas en alimentos por contaminación de las manos y de los utensilios utilizados durante el procesamiento. En muchos de los casos los manipuladores de alimentos no utilizan guantes ni tapabocas o simplemente no lo usan de manera correcta.

La confirmación de *E. coli* presentes en las ensaladas nos indica que los mismos tienen una deficiencia en la higiene, Además del mal lavado de los vegetales ya que no utilizan un antiséptico como el vinagre sino utilizan agua corriente del grifo.

Al recolectar las muestras se observó el estado sanitario de los expendios y se evidencio que en uno de estos establecimientos colocaban la basura junto con las verduras que utilizan para preparar las ensaladas.

Concordamos con los resultados obtenidos en un proyecto realizado en la ciudad de Obregón, Sonora, México en Febrero 1998 a Octubre de 2002. Los parámetros microbiológicos investigados fueron mesofílicos aerobios, coliformes totales, coliformes fecales, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en alimentos altamente consumidos. Se encontró que productos alimenticios de consumo fresco, para microorganismos mesofílicos aerobios el 32 % de las muestras analizadas (n =106) sobrepasaron la especificación microbiológica respectiva, y por arriba del 70% de las muestras analizadas sobrepasaron las especificaciones sanitarias para coliformes totales y fecales.

En otro estudio en la ciudad de Hidalgo se determinó la Calidad sanitaria de ensaladas de verduras crudas listas para su consumo obtenidas en restaurantes con tres niveles aparentes de higiene (Alta, Media y Baja) donde se colectaron en total 20, 30 y 1 muestras de cada tipo para los restaurantes de Ah, Mh y Bh, respectivamente. Las ensaladas fueron transportadas al laboratorio bajo condiciones asépticas y se procesaron dentro de 2 horas. Se cuantificaron coliformes totales y fecales, *Escherichia coli* y la presencia de *Salmonella* de acuerdo a los manuales especializados. Sólo 4 de las 130 muestras examinadas estuvieron libres de coliformes fecales. *E. coli* fue aislada en el 100, 70, 83 % de las ensaladas obtenidas en cada restaurante, respectivamente; y *Salmonella* en el 10, 0, 11% respectivamente para cada tipo de restaurante mencionado. En general, sólo cuatro ensaladas cumplieron con la norma oficial mexicana vigente.

Las altas cargas microbianas de los indicadores de contaminación en estas ensaladas que arrojaron nuestros resultados, pueden considerarse de alto riesgo para la salud del consumidor y esto es muy importante ya que recientemente el consumo de verduras se ha incrementado, ello principalmente a la búsqueda en la población de una vida más sana. Sin embargo, a la par se han incrementado las enfermedades por verduras. Esto debido principalmente a su consumo crudo o con insuficiente tratamiento antimicrobiano. Dando una idea del alto riesgo para los consumidores de contraer alguna enfermedad transmitida por los alimentos.

www.bdigital.ula.ve

11. CONCLUSIÓN

La calidad microbiológica y sanitaria de los sitios evaluados constituye un gran problema de salud pública para la población expuesta día a día a estos alimentos, ya que Mérida es una ciudad donde la mayoría de la población son estudiantes universitarios y además es netamente turística en la cual llega en periodos de vacaciones millares de persona, lo cual recurrir a establecimientos en los centros comerciales es lo más fácil. Lastimosamente los individuos ingieren estos tipos de ensaladas pensando que es un alimento sano lo que es un error ya que al realizar este estudio se desenmascaro la realidad de este tipo de alimento por lo que en vez de alimentarse sanamente las personas están ingiriendo una cantidad incontable de bacterias que quitaran la salud ocasionándole un mal estado físico.

www.bdigital.ula.ve

12. RECOMENDACIONES

- Cumplimiento de las normas sanitarias en los expendios donde se elaboran estos tipos de alimentos.

Limpieza corporal general.

Limpieza y cuidado de manos: Deberá lavárselas con abundante agua caliente y jabón (preferentemente líquido) y secar con toalla de un solo uso, caso contrario la misma deberá estar siempre en perfecto estado de limpieza.

(Lic. Gabin de Sardoy)

- El lavado de manos se realizará:

Antes de comenzar a trabajar y cada vez que se interrumpe por algún motivo.

Antes y después de manipular alimentos crudos y cocidos.

Luego de manipular dinero.

Luego de utilizar el pañuelo para toser, estornudar o limpiarse la nariz.

Luego de manipular basura.

Luego de hacer uso del baño. (Lic. Gabin de Sardoy)

Utilizar gorra, cofia o redecilla en la cabeza (imprescindible porque impide que eventuales suciedades del cabello puedan contaminar los alimentos) y guantes descartables en manos.

Debe abstenerse de fumar, comer, probar los alimentos con el dedo y/o masticar chicle, durante la preparación de los alimentos.

No estornudar ni toser sobre los alimentos, para ello cubrirse la boca con pañuelo. (Lic. Gabin de Sardoy)

- Evitar cocinar en los siguientes casos:

Si presenta alguna lesión en las manos.

Si presenta secreciones anormales por nariz, oídos, ojos.

Si presenta náuseas, vómitos, diarrea, fiebre. (Lic. Gabin de Sardoy)

- Preparación de los alimentos.

Los utensilios utilizados para la preparación y servicio de la comida deben estar siempre en perfecto estado de limpieza. Lavarlos con detergente correctamente diluido y agua caliente, procurando siempre que no queden restos de comida.

Cocer los alimentos a temperatura suficiente (70°C) para asegurar que los microorganismos no se reproduzcan. Comprobar la temperatura de cocción.

Evitar mantener los alimentos a temperaturas entre 10 y 60°C en las cuales se produce la multiplicación rápida y progresiva de los microorganismos.

Evitar la contaminación cruzada (*) (contacto de alimentos crudos con cocidos mediante las manos del manipulador o la utilización de la misma superficie sin previa limpieza y/o utensilios de cocina).

No cortar la cadena de frío de los alimentos (congelados, frizados, refrigerados).

Controlar siempre fecha de vencimiento y estado general de envases y recipientes (latas, frascos, botellas, cajas, bolsas, etc.).

Se deben utilizar guantes de látex ó nitrilo con la certificación correspondiente emitida por las normas locales, solo el Nitrilo podrá tocar aceites y grasas mientras que el látex no podrá manipular dichos productos.

¿Cómo evitar la contaminación cruzada?

Limpiar con agua potable todas las superficies, después que hayan estado en contacto con los alimentos crudos y antes de utilizarlas con alimentos cocinados o que deben consumirse crudos (ej.: frutas y verduras).

De preferencia los elementos como tablas de picar deben ser diferentes para alimentos crudos y cocidos, si esto no es posible, lavarlos correctamente.

Limpiar con abundante agua caliente y detergente los utensilios después de haberlos utilizado con alimentos crudos.

Lavarse las manos después de manipular alimentos crudos aunque haya utilizado guantes. (Lic. Gabin de Sardoy)

- Lavar las verduras con antisépticos que eliminen las bacterias patógenas
- Evaluar periódicamente el establecimiento por parte de las autoridades correspondientes

13. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. Benites, A;(2005) Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas. Editorial. Reverté. S.A. España.
2. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). (1996). Coliformes Fecales y de *E. coli*.
3. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). (2004). Alimentos. Aislamiento en identificación de *Staphylococcus aureus* en alimentos. 1292-04.
4. Ernesto, C. (1957) Tratado de microbiología. Editorial. Porrúa S.A.
5. Iriarte R, María M. (2011) Calidad bacteriológica de comidas listas para su consumo, preparadas y distribuidas en la isla de Margarita (Venezuela), período 1991-2009. N.2 vol. 42 pág. 8-17.
6. George, B; (1982) Microbiología Básica de los alimentos. Editorial
7. Aválos Alas, Cindy Yamileth y Santacruz Martínez, Fátima del Rosario (2009). Determinación de contaminantes microbiológicos en las ensaladas frescas que se comercializan en establecimientos de comida rápida del Distrito dos de la zona Metropolitana de San Salvador. Tesis Licenciatura, Universidad de El Salvador.
8. Idelfonso, J; Larrañaga; (1999) Control de Higiene de los alimentos
9. Marco Rivera Jacinto, Claudia Rodríguez Ulloa, John López Orbegoso (2009). Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. N.1 vol. 26.
10. Jay, M; (1994) Microbiología moderna de los alimentos. Editorial. Acribia, S.A. Zaragoza, (España).
11. Jesús, C; (2006) Manual didáctico de cocina. Editorial. Innovación y calificación, S.C. España.
12. Laura, A. Clever, M. Rafael, O; (2001) Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, *Staphylococcus sp.* Y hongos en ensaladas para perro calientes expendidas en la ciudad de Maracay, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.

13. Luis, M; (2008) Importancia de los vegetales que se consumen crudos en la transmisión de enfermedades de origen alimentario.
14. Messaria Ginestre Pérez, Sonia Romero Añez, Gresleida Rincón Villalobos, Maribel Castellano González, Yeiny Ávila Roo, Gladis Colina López, Armindo Perozo Mena. 2009. Indicadores entéricos en vegetales frescos que se comercializan en mercados populares de Maracaibo. N.1 vol.29.
15. Müller, G; (1981) Microbiología de los alimentos vegetales. Editorial. Acribia. Zaragoza, (España).
16. Carmona O. María, G. Carmen, M. Franklin, M; (1997) Microbiología medica de Divo. Quinta edición. Editorial. Mac Graw, Hill. Interamericana de Venezuela, S.A.
17. Prescott, C. Herley, J. Kein, D; (2004) Microbiologic. Segunda edición en español. Editorial. Mac Graw Hill Interamericana de España, S.A.V. Madrid, España.
18. Pascual A; M. (2005). Enfermedades de origen alimentario. Su prevención. Editorial Díaz de Santos, S.A. Barcelona, España.
19. Platki, K. Krivoshein, Yu. (1981) Microbiología. Segunda edición en español. Editorial. Mir. Moscú.
20. Ramírez, A. García, E. Araque, M. Mosqueda, N; (2006) Manual practico de bacteriología general. Primera edición. Mérida, Venezuela.
21. Paraje, R. Amelia, R (1976) Microbiología clínica. Editorial. Medica Panamericana.
22. Hans, F. (1983) Compendio de Bacteriología general medica. Editorial ACRIBIA.
23. Jaime, A. (1999). Fisiopatología quirúrgica. Editorial Tebar.
24. Freddy A. Blanco Ríos, Gloria Casadiego Ardila y Paola A. Pacheco. 2009. Calidad microbiológica de alimentos remitidos a un laboratorio de salud pública en el año 2009. N.6 vol.13 pág. 953-965.
25. Condori Apaza, Amalia. 2009. Análisis microbiológico para la identificación de coliformes totales, fecales y salmonella en alimentos listos para el consumo, comercializados en locales públicos en la ciudad de El Alto, durante los meses de marzo, abril y mayo del año 2006.

26. S Pedrari (1996) Linfoma, hepatoesplenomegalia, hemiparesia. N.1. Vol. 56 pág. 78- 86.
27. Silvia muños y cols 2013 Frecuencia de enterobacterias en verduras frescas de consumo crudo expendidas en cuatro mercados de Lima, Perú. N.3 vol. 24 pág. 122- 127.
28. Albarado lusmila y cols 2007. N.3 vol. 11 pág. 8- 12.
29. Prescott (1999) Microbiología. Cuarta edición. Editorial. Mac Graw Hill Interamericana de España, S.A.V. Madrid, España.

www.bdigital.ula.ve

14. REFERENCIAS DE PÁGINAS VIRTUALES

<http://www.nutri-salud.com.ar/articulos/manipulaciondealimentos.php>

<https://es.scribd.com/doc/40573006/identificacion-de-bacterias>

<http://www.biomerieux.com.ar/servlet/srt/bio/argentina>

http://t1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTBktqYk13mIHye4cTt9bS7abbFQaPeg1PfpiBICu_Vbt8s43r6RQ

http://i.istockimg.com/file_thumbview_approve/6782520/2/stock-photo-6782520-vegetales-sanos.jpg

<http://www.pro-analise.com.br/img/uploads/produtos/BM20050.jpg>

<http://www.uib.es/depart/dba/microbiologia/seminarios/PerfilLecturaAPI2E.jpg>

http://www.cfkeep.org/html/phpThumb.php?src=/uploads/of_tests_normal_oxidation_fermentation_copy2.jpg&aoe=1&

<http://microbiologiabioanalysis.blogspot.com/2012/06/prueba-de-indol-fundamento-evaluacion-la.htm>

<http://www.telmeds.org/wp-content/uploads/2009/10/coagulase.bmp>

<http://pathmicro.med.sc.edu/fox/gram-st.jpg>

<http://www.educa.madrid.org/web/cc.nsdelasabiduria.madrid/Ejercicios/2b/Biologia/Microbiologia/morfologia/gramnegativa.gif>

<http://www.educa.madrid.org/web/cc.nsdelasabiduria.madrid/Ejercicios/2b/Biologia/Microbiologia/morfologia/grampositiva.gif>

<http://celulabhill.galeon.com/enlaces1218266.htm>