



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



***CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS VEGETALES CRUDOS UTILIZADOS
EN HAMBURGUESAS QUE SE EXPENDEN EN PUESTOS DE COMIDA
RÁPIDA AMBULANTES DEL MUNICIPIO CAMPO ELÍAS,
DEL ESTADO MÉRIDA***

Autor: Silvia Karina Guerrero Rangel

Tutor: Profesora Judith Araque

Mérida, Julio - 2013.



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



***CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS VEGETALES CRUDOS UTILIZADOS
EN HAMBURGUESAS QUE SE EXPENDEN EN PUESTOS DE COMIDA
RÁPIDA AMBULANTES DEL MUNICIPIO CAMPO ELÍAS,
DEL ESTADO MÉRIDA***

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para
optar al Título de Licenciada en Bioanálisis.

***Autor: Silvia Karina Guerrero Rangel
Tutor: Profesora Judith Araque***

Mérida, Julio - 2013.

"Les diré cuál es la sabiduría y cuál es su origen, no les ocultare secreto alguno. Quiero seguirla desde su comienzo y exponerle claramente, Sin apartarme de la verdad todo lo que de ella se pueda saber."

SABIDURIA (6,22)

AGRADECIMIENTO

GRACIAS INFINITAS! A mi Padre Celestial, quien me fortalece y me dirige, todos los días de mi vida.

Con todo mi amor a quien me regalo años de dedicación y de amor, quien me enseñó a juntar la manos para enaltecer al Padre Celestial, a mi Madre hermosa, a ti te debo todo lo que soy, Te amo mami.

A mi padre, gracias por haberme dado un hogar unido por la fortaleza y el amor que muchos años me brindaste, Te quiero papá.

A mis hermanas que siempre han estado junto a mí brindándome su apoyo, a cada una las quiero y las admiro mi más sincero agradecimiento.

A mis dos amores, Mi hijo y mi esposo, que me brindan su amor y me llenan de fuerza para seguir construyendo mis sueños y alcanzar todas mis metas. Los Amo!!

A la profesora Judith Araque y el Profesor Félix Andueza, que con su tutoría y participación ha sido posible la realización de este trabajo, gracias por compartir sus conocimientos y brindarme su apoyo en mi carrera.

A todos los que sembraron en mí, su confianza y su amistad a lo largo de mi carrera, Gracias!

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO.....	<i>i</i>
INDICE DE CONTENIDO.....	<i>ii</i>
INDICE DE TABLA.....	<i>iv</i>
ÍNDICE DE ANEXO.....	<i>v</i>
RESUMEN.....	<i>vi</i>
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPITULO I: MARCO TEORICO

1.1 Breve historia de la microbiología de los alimentos	3
1.2 Alteración microbiana de hortalizas.....	6
1.3 Microflora alterante.....	7
1.4 Enfermedades transmitidas por los alimentos	7
1.5 Indicadores de higiene.....	8
1.6 Bacterias aerobias mesófilas.....	8
1.7 Recuentos en placa de bacterias aerobias mesófilas.....	9
1.8 Organismos coliformes:	
Características generales.....	10
Significado en los alimentos.....	11
1.9 Coliformes Termotolerantes o Fecales:	
Características.....	11
1.10 <i>Escherichia coli</i>.....	12
Incidencias de la <i>E. coli</i> en alimentos.....	12
1.11 <i>Staphylococcus aureus</i>.....	13
1.12 <i>Pseudomonas spp.</i>.....	14

CAPITULO II: ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

2.1 Planteamiento del problema	21
2.2 Hipótesis.....	22

2.3 Objetivos generales.....	23
Objetivos específicos	23

CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS

A.1. Población muestral.....	24
A.2. Muestras.....	24
A.3. Medios de cultivo ..	24
A.4. Reactivos.	25
A.5. Equipo.	25
B.1) Determinación del número de bacterias aerobias mesófilas en UFC/gr.....	26
B.2) Determinación del número de bacterias coliformes totales y fecales NMP/gr	26
B.3) Determinación del número de <i>Staphylococcus aureus</i>	27
B.4) Determinación de la presencia de <i>Pseudomonas spp.</i>	28
B.5) Determinaciones estadísticas.....	28
Diseño de la investigación.....	29
Resultados y discusion	31
Resultados de la encuesta a los establecimientos.....	39
Encuesta.....	48

INDICE DE TABLA

TABLA N° 1 Resultados de la determinación de coliformes totales y coliformes fecales por el método de (NMP/gr) de los vegetales crudos usados en hamburguesas que se expende en los puestos de comida rápida ambulante del Municipio Campo Elías, Estado Mérida	24
TABLA N° 2 Determinación del número de bacterias aerobias mesófilas (UFC/gr) de los vegetales crudos usados en hamburguesas que se expende en los puestos de comida rápida ambulante del Municipio Campo Elías, Estado Mérida 2013.....	25
TABLA N° 3 Resultados de la determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/gr) de los vegetales crudos usados en hamburguesas que se expende en los puestos de comida rápida ambulante del Municipio Campo Elías, Estado Mérida 2013.....	26
TABLA N° 4 Resume los parámetros estadísticos de los diferentes hallazgos de la investigación, reflejando los valores máximos y mínimos, del contaje de colonias bacterianas, coliformes totales, coliforme fecales y <i>Staphylococcus aureus</i> , bacterias aerobias mesòfilas.....	27
TABLA N°5 Norma Sanitaria Que Establece Los Criterios Microbiológicos De Calidad Sanitaria E Inocuidad Para Los Alimentos Y Bebidas De Consumo Humano (Proyecto de Actualización de la Rm N° 615-2003 Sa/Dm).....	28
TABLA N°6 Resultado de la encuesta a cada uno de los establecimiento...39	39

INDICE DE ANEXO

Pruebas presuntivas para determinación de Coliformes totales y fecales.....49

Imagen Del Sistema Api 20 NE, realizado como prueba confirmatoria para Pseudomona sp.....50

Universidad De Los Andes.
Facultad De Farmacia Y Bioanálisis.
Escuela De Bioanálisis.

**CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS VEGETALES CRUDOS UTILIZADOS
EN HAMBURGUESAS QUE SE EXPENDEN EN PUESTOS DE COMIDA
RÁPIDA AMBULANTES DEL MUNICIPIO CAMPO ELÍAS,
DEL ESTADO MÉRIDA**

Autor: Guerrero Rangel Silvia Karina.
Tutora Académica: Prof. Judith Araque.
Año: 2013.

RESUMEN

Se analizó la calidad microbiológica de los vegetales crudos usados en hamburguesas, de 6 establecimientos en el Municipio Campo Elías del Estado Mérida. Se determinó coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y *Escherichia coli* por la técnica del número más probable. Los CT fueron aislados en los 6 establecimientos en un total ($\geq 1,1 \times 10^3$) NMP/gr en 100% de las ensaladas crudas específicamente de repollo y zanahoria adquiridas en los diversos establecimientos; mientras que los CF se ubicaron en diferentes cantidades, las cuales oscilaron entre un valor mínimo de $(1,1 \times 10)$ NMP/gr a un valor máximo de $(1,1 \times 10^3)$ NMP/gr de las muestras. Según los criterios microbiológicos para *E. coli*, 83,3 % de las ensaladas fueron satisfactorios y 16,7 % insatisfactorios para su consumo. Para las Bacterias Aerobias Mesófilas obtuvimos un total de $(6,4 \times 10^6)$ UFC/gr lo cual son inaceptables dentro de los parámetros ubicado en el criterio microbiológico de los alimentos. Posteriormente para la determinación de *Pseudomonas ssp*, obtuvimos como resultado "*Pseudomonas fluorescens*", identificada con el sistema API 20 NE (Identifica bacilos Gram negativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias), Para la determinación de *Staphylococcus aureus*, obtuvimos valores entre un mínimo de $(1,1 \times 10)$ UFC/gr y un máximo de $(6,4 \times 10^4)$ UFC/gr, nos permite señalar que un 66,6%, de las muestras son viables para consumo humano mientras que 33,4% restante son inapropiadas para el consumo. Debido a la variabilidad de los niveles de coliformes y *E. coli* en los vegetales frescos, y su contaminación con *Pseudomonas fluorescens* y *Staphylococcus aureus* es recomendable establecer normas higiénicas que permitan a los establecimientos de baja calidad mejorar sus servicios para los consumidores.

INTRODUCCIÓN

Actualmente en el mundo de la industria de los alimentos y en la comida rápida, el concepto de calidad presenta una vertiente subjetiva, el tanto que está sujeta a los gustos personales, y otra objetiva, en cuanto al producto tiene que ser adecuado para su uso. Por lo cual los alimentos preparados para su consumo debe presentar dos características esenciales: tener unas condiciones mínimas de salubridad, es decir que no produzcan daño en quien lo consuma y que contengan elementos nutritivos en cantidades suficientes; pero estas dos características, básicas no deben bastar para librar ese alimento a su consumo; debe buscarse el nivel de calidad óptimo, por ende es preciso conocer, cuales son los factores que puedan afectar la calidad de los alimentos a los largo de su proceso (Benwar, 1979).

Estos factores pueden producir cambios en la elaboración, producción y suministros de los mismo, dando lugar a los microorganismos, los cuales evolucionan rápidamente permitiéndoles adaptarse a su medio ambiente, presentando nuevos retos microbiológicos para las personas involucradas en su preparación (Benwar, 1979).

Los microorganismos, de los cuales un pequeño porcentaje son patogénicos, están en todas partes y contaminan a los productos agrícolas alimentarios crudos, algunos posiblemente sean capaces de sobrevivir los tratamientos para su conservación. También, los seres humanos pueden introducir patógenos en los alimentos, durante la producción, el procesamiento, la distribución y/o la preparación de los mismos, lo que significa una contaminación cruzada, por lo tanto, cualquier alimento, ya sea crudo o procesado para aumentar su calidad e inocuidad puede presentar algún nivel de riesgo, para poder causar enfermedades transmitidas a través

de los alimentos, si no se maneja apropiadamente antes de su consumo. Todas las personas involucradas en la industria alimentaria, desde el productor hasta la persona que prepara el alimento, deben reconocer la necesidad de vigilancia para controlar los riesgos microbiológicos, a fin de reducir las enfermedades transmitidas a través de los alimentos. Cada uno de ellos juega un papel significativo en el procedimiento sistemático y preventivo de los alimentos, ya sea al adquirirlos, almacenarlos, prepararlos, servirlos o al guardar los sobrantes, tratándose del manejo de alimentos. (Larrañaga, 1999)

El control de calidad microbiológico en la recepción se aplica tanto en los alimentos perecederos como a los no perecederos, con el objetivo de determinar si reúnen las condiciones microbiológicas específicas para su consumo, para ello existe la determinación de microorganismos indicadores como lo son la *Escherichia coli*, y *Salmonella Typhi* siendo estos de gran utilidad, es difícil detectar *S. Typhi* en el agua de consumo. En cambio, la presencia de *E. coli* indica que es posible que haya contaminación por infiltración del aguas residuales y que, por consiguiente, puede ser real la presencia de *Salmonella* u otros patógenos intestinales. Desde entonces los microorganismos indicadores han venido siendo empleados para determinar una condición microbiana inadmisibles en un alimento, sea por contaminación fecal, por la presencia de patógenos potenciales o por la potencia de deterioro de aquel, sea por las condiciones sanitarias del tratamiento, producción o almacenamiento del mismo. (Larrañaga, 1999)

Por tal motivo, en este trabajo se investigó la presencia de algunos microorganismos indicadores de higiene en ensaladas de verduras crudas listas para su consumo, en hamburguesas compradas en diferentes puestos ambulantes del Municipio Campo Elías del estado Mérida.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

La microbiología es la ciencia que estudia los organismos demasiado pequeños para ser percibidos a simple vista, por lo que se denomina microorganismos. En términos generales dentro del amplio dominio de la microbiología se ubican todos los organismos con diámetro de 1mm o inferior (Caballero, 2008).

Sin los organismos sería imposible la vida, existen en la mayoría de los lugares: los suelos, el aire, el agua, los alimentos, en la piel y en la mucosa del hombre y de los animales. Algunos son beneficiosos o al menos no producen algún daño, otros son dañinos y producen enfermedades al hombre, los animales y las plantas. En relación con los alimentos hay microorganismos que ayudan a la elaboración de diferentes tipos de productos: queso, cerveza, vino, existen otros cuya presencia sirve como indicador de la calidad sanitaria a los que alteran características organolépticas y también microorganismos patógenos capaces de producir enfermedades al ser ingerido en los alimentos (Caballero, 2008).

1.1 Breve historia de la microbiología de los alimentos.

El interés por evitar las enfermedades transmitidas por los alimentos surge con la práctica misma de ingestión de los alimentos; esta preocupación se mantiene históricamente de muy diversas maneras. La necesidad de preservar los alimentos contra el deterioro constituyó un medio que de forma indirecta ha contribuido a proteger su inocuidad. Aunque es difícil señalar con precisión los primeros conocimientos acerca de la presencia y el papel de los microorganismos en los alimentos, se tienen evidencia de que su

conocimiento antecede a la consideración de la microbiología como ciencia. (Larrañaga, 1999)

El período de producción de los alimentos se remota desde hace aproximadamente 8000 años. Con la introducción de los alimentos preparados, hacen su aparición los problemas de transmisión de enfermedades por esto y las alteraciones debidas a conservaciones inadecuadas. Entre los años 3000 y 1200 a.C se utilizaron diferentes métodos de la conservación de los alimentos; los judíos utilizaron la sal del Mar Muerto, los chinos y griegos comían pescado salazonado y transmitieron esta práctica a los romanos; también debieron emplearse los aceites de oliva y sésamo para este fin. Al parecer existió una influencia entre el proceso de momificación y la conservación de los alimentos. (Larrañaga, 1999)

Hacia los años 1000 a.C los romanos sobresalieron en la conservación de las carnes y se cree que utilizaron nieve para la conservación de alimentos perecederos. Se supone que en este período apareció el ahumado para la conservación de las carnes, así como la elaboración de quesos y vinos. No se sabe si en esta época se tenía conocimiento del papel de los alimentos y la transmisión d las enfermedades. (Caballero, 2008)

A partir del descubrimiento de microorganismos y de su participación como causa de enfermedades desde finales del siglo XIX, se establecieron las bases para la generación de los principios científicos que permitirán prevenir la contaminación, impedir la proliferación, inactivar de manera segura los agentes patógenos microbianos de los alimentos y desarrollar técnicas que faciliten su detección. (Larrañaga, 1999)

Para tal fin, se estudia el control de calidad microbiológico que forma parte de cualquier programa de control de calidad de los alimentos, tanto la

identificación y el registro de sustancia o contaminantes que, aun sin suponer algún riesgo para la salud, pueden inutilizar el alimento, como otros cuerpos extraños de origen biológico-bacterias, mohos, levaduras, insectos y roedores que en algunos casos son patógenos y constituyen un riesgo para la salud. Cuando no son patógenos, pueden alterar las características organolépticas del alimento color, sabor y textura, haciéndolo incomedible (Larrañaga, 1999).

Los alimentos de origen vegetal varían bastante en composición. Consecuentemente sus tipos de alteración microbiana difieren bastante. Pero a pesar de sus diferencias comparten algunas características fundamentales. Todos son productos hortícolas o agronómicos cuya integridad celular depende de su celulosa y pectina (Documento con acceso en www.monografias.com).

El consumo de vegetales crudos, como la ensaladas de repollo, ha sido asociado a numerosos casos de brotes de enfermedades por microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, y *Vibrio cholerae*. *Escherichia coli* también ha sido relacionada a brotes de infecciones por el consumo de vegetales y ensaladas. (Adams, y Moss, 1997.)

Los patógenos vegetales pueden subdividirse en los que son verdaderamente patógenos de las plantas y los patógenos oportunistas. Los patógenos verdaderos infectan activamente los tejidos de las plantas.

Su capacidad infectante se debe a que producen diversas enzimas degradativas que les permiten atravesar las capas de células protectoras externas. En contraste, los patógenos oportunistas solo infectan los tejidos cuando las defensas normales del vegetal se han debilitado por alguna causa (Documento con acceso en www.monografias.com).

Los productos vegetales muestran tres grandes tipos de alteración. El primero es la alteración activa, debida a microorganismos patógenos de los vegetales, que realmente inician la infección en los productos sanos y no comprometidos cuya calidad sensorial disminuyen. El segundo es la alteración pasiva o inducida por heridas en las que los organismos oportunistas penetran en los tejidos internos. La alteración de los productos vegetales se manifiesta de múltiples formas dependiendo del producto específico, del ambiente y del microorganismo implicado. Tradicionalmente la alteración se ha descrito con los síntomas más característicos de un producto dado. En otros casos, este proceder es inadecuado debido a que más de un tipo de microorganismo presenta los mismos o parecidos síntomas. Por ejemplo, el tipo de alteración mejor conocido de los productos vegetales es la podredumbre blanda que, como es obvio, corrientemente se manifiesta por ablandamiento del tejido vegetal, especialmente alrededor del punto inicial de la infección. No obstante, el termino de podredumbre blanda a menudo no describe por completo la enfermedad o alteración ya que el ablandamiento pueden producirlo diversas especies de bacterias patógenas vegetales. (Fernández, 2000)

1.2 Alteración microbiana de hortalizas.

Aunque las hortalizas, frutas, granos y legumbres son productos de origen vegetal, poseen algunas diferencias inherentes que influyen tanto en el tipo de microorganismo que forman su microflora natural, como en el tipo

de alteración que padecen. Entre los factores intrínsecos de interés que influyen en la microflora que se desarrolla en los productos vegetales, se incluyen el pH y la actividad del agua. (Fernández, 2000)

1.3 Microflora alterante.

Mohos, levaduras y bacterias pueden crecer en hortalizas, pero las bacterias se aíslan más frecuentemente, ya que crecen más rápido que las levaduras y los mohos y por ello compiten con ventaja, especialmente a temperaturas de refrigeración. La alteración post-cosecha de las hortalizas crudas se da abundantemente en ausencia de cualquier tipo de tratamiento. La alteración está influida por los antecedentes de la tierra en la que han crecido las hortalizas. Igualmente, el suelo contaminado con inundaciones o el agua de riego de mala calidad expone las hortalizas a los microorganismos alterantes y a los patógenos humanos (Fernández, 2000).

1.4 Enfermedades transmitidas por los alimentos.

Los alimentos aparte de cumplir una función de satisfacer una necesidad fisiológica el ser humano pueden contener un riesgo inherente de enfermedades. Diferentes agentes patógenos pueden estar presentes dentro de los alimentos; dentro de estos encontramos a los microorganismos. Los alimentos se contaminan con patógenos microbianos debido a la mala práctica higiénica que se aplican durante el almacenamiento, transporte y procesamiento de los alimentos en lugares públicos. Considerando que se estima que existen unas 400 enfermedades distintas que pueden ser transmitidas por los alimentos, estudiaremos las bacterias y patógenos más comunes en las ensaladas crudas (Nohelia, 2004).

La naturaleza y abundancia de la flora contaminante (bacterias, virus, hongos, levaduras y parásitos) es muy variable entre los productos, depende de la cercanía de la tierra, las condiciones de humedad, la proximidad con los animales y el tipo de agua usada en la irrigación. En aquellas que se ofrecen al público los microorganismos pueden provenir de una gran diversidad de fuentes de contaminación (Acevedo col. 2002).

La presencia de bacterias patógenas afecta la inocuidad de frutas y hortalizas frescas y se constituyen en problemas de salud humana. Se ha reportado que la frecuencia de infecciones asociadas al consumo de frutas y hortalizas es mayor en establecimientos de comida rápida que en los hogares, con frecuencia esto es el resultado de la inadecuada manipulación de los productos frescos, además de la contaminación por parte de las superficies donde se preparan los alimentos (Nohelia, 2004).

1.5 Indicadores de higiene.

Los microorganismos indicadores dan una idea de las condiciones higiénicas bajo las cuales se ha elaborado un alimento. La presencia en los alimentos de algunos de cómo *E. coli*, sugiere que el alimento se contaminó con heces. Los coliformes son microorganismos indicadores, ya que su presencia en los alimentos sugiere falta de higiene. Los grupos microbianos indicadores de mayor uso en los alimentos son: bacterias mesófilas aerobias, organismos coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli*, *Enterococos*, y la familia *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, así como hongos y levaduras (Fernández, 2000).

1.6 Bacterias aerobias mesófilas.

Los microorganismos indicadores se han utilizado con varios fines.

El fundamento y la interpretación de su significado en los diversos alimentos, se discuten con los indicadores de uso más universal, pero el orden en que son presentados no refleja necesariamente su valor relativo. El principal objetivo de la utilización de bacterias como indicadores de prácticas no sanitarias es revelar defectos de tratamiento que llevan consigo un peligro potencial, peligro que no está necesariamente presente en la muestra particular examinada, pero que es probable pueda encontrarse en muestras paralelas (Documento con acceso en www.análisis de calidad.com).

1.7 Recuentos en placa de bacterias aerobias mesófilas.

La mayoría de los alimentos industrializados (excepto, por ejemplo, los productos fermentados) deben ser considerados como inadecuados para el consumo cuando contienen un gran número de microorganismos, aun cuando estos microorganismos no sean conocidos como patógenos y no hayan alterado de forma apreciable los caracteres organolépticos del alimento. Pueden, darse varias razones que justifican esta conducta (Documento con acceso en www.análisis de calidad.com).

1. Recuentos altos en alimentos estables a menudo indican materias primas contaminadas o tratamientos no satisfactorios desde el punto de vista sanitario, mientras que en los productos perecederos pueden indicar también condiciones inadecuadas de tiempo/temperatura durante su almacenamiento. La presencia de un número elevado de bacterias aerobias mesófilas que crecen bien a temperatura corporal o próxima a ella, significa que puede haberse dado condiciones favorables o la multiplicación de los microorganismos patógenos de origen humano o animal.
2. Algunas cepas de bacterias mesófilas comunes, no generalmente consideradas como agentes de enfermedades transmitidas por los

alimentos (por ejemplo, *Proteus sp.*, *Enterococos* y *Pseudomonas mesófilas*) han sido señaladas como causa de enfermedad cuando existía un número elevado de células viables en los alimentos. Sin embargo, los datos con que se cuenta acerca de la patogenicidad de estas cepas son conflictivos. No obstante, parece prudente evitar que los alimentos industrializados no fermentados den recuentos en placa elevados.

3. 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.
4. Cuando la alteración de los alimentos es debida al desarrollo en ellos de microorganismos, la causa más frecuente de alteración, deben 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. En el momento en que la descomposición puede ser detectada por el olor, el gusto o el aspecto, la mayoría de los alimentos contienen más de 10^6 microorganismos por gramo (revisado por Elliott y Michener, 1961). Algunos alimentos pueden ya ser inaceptables cuando contienen 10^7 bacterias por gramo, pero un número reducido de ellos se consumen aun cuando la población bacteriana alcance los 10^8 /gramo.

1.8 Organismos Coliformes.

Características generales:

Los organismos coliformes son bacilos gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que producen gas y ácido a

partir de lactosa dentro de 24-48 horas de incubación a 35 °C. Se trata de una definición totalmente convencional que pretende involucrar bacterias de hábitat típicamente intestinal, no obstante existen microorganismos que satisfacen la definición pero que tiene hábitat extraintestinal (APHA, 1992; Fernández,1981).

Significado en los alimentos.

Los organismos son el grupo indicador de mayor tradición en la microbiología sanitaria. Es importante destacar que los organismos coliformes únicamente se relacionan con contaminación fecal reciente cuando se encuentran en agua limpia. Esto se fundamenta en el hecho de encontrarse en el intestino de los animales de sangre caliente en mayor número de las bacterias patógenas, siendo incapaces de multiplicarse en aguas limpias. Sin embargo, su presencia en agua no indica siempre la existencia de un patógeno. La presencia de coliformes en muchos alimentos, especialmente aquella que ha recibido tratamiento térmico, sugiere contacto con materiales sucios y no necesariamente implica un riesgo a la salud (APHA, 1992; Fernández, 1981).

1.9 Coliformes Termotolerantes o Fecales:

Características:

Los coliformes termotolerantes forman un grupo microbiano más reducido que los organismos coliformes totales al cual pertenecen los termotolerantes. Este grupo está formado por aquellos microorganismos con semejantes características que los organismos coliformes totales la única diferencia que los termotolerantes fermentan lactosa con producción de gas

4-45 °C dentro de las 24-48 horas de incubación. Dentro de los coliformes termotolerantes se encuentra *E. coli* (Fernández, 1981).

Los coliformes termotolerantes se aíslan con frecuencia de la materia fecal; un porcentaje considerable de estos pueden llegar al agua, el suelo y las plantas, provenientes del intestino del hombre

1.10 *Escherichia coli*.

La *E. coli* es una bacteria que habita normalmente en el intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, y desempeñan un importante papel en la fisiología del intestino. Por ser habitante regular y normal del intestino se usa desde hace un siglo como el “mejor” indicador de contaminación de los alimentos con materia fecal.

Incidencias de la *E. coli* en alimentos.

Desde principios de la década de los 40, se han ido describiendo cepas de este microorganismo con capacidad enteropatógena, al observar la *E. coli* de determinados serotipos se asociaban a brotes epidémicos de enteritis grave en lactantes y población general. La transmisión de *E. coli* es más común por vía fecal-oral y el vehículo más frecuente de infección humana es la carne de bovino, fundamentalmente las hamburguesas poco cocidas. También se ha documentado la infección asociada al consumo de carne de pavo, salami, yogurt, mayonesa, ensaladas, vegetales crudos y agua. La transmisión de persona a persona también ha sido demostrada *E. coli* O157:H7, fermenta lactosa pero no el sorbitol dentro de 48 horas, es resistente a las temperaturas extremas y a los ácidos débiles. La dosis infectante mínima es baja; entre 10^3 y 10^2 bacteria (Griffin, 1991).

1.11 *Staphylococcus aureus*.

Fue descubierto por Rosenbach. Su potencia patógena para el hombre y los animales se manifiesta de diversa formas. En la microbiología sanitaria tienen especial interés tanto por las enterotoxinas que produce, como por el significado que se deriva de su presencia y cantidad de un alimento (Torres, 2002).

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria que pertenece a la familia Micrococcaceae, consiste en células esféricas (cocos) Gram positivas, termolábiles coagulasa positiva, aerobio facultativo, inmóvil, no esporulado, que resiste concentraciones relativamente alta de sal, producen hemólisis y fermentan manitol, entre otras propiedades. El hombre en casi todos los casos es el reservorio principal y en ocasiones con las ubres infectadas así como los perros y aves de corral. Puede producir una amplia gama de enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsia, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria (Torres, 2002).

La enfermedad se manifiesta como una intoxicación de comienzo repentino y a veces violento los síntomas pueden aparecer entre los 30 minutos y 8 horas de haber consumido el alimento, con una media de 3 a 4 horas, con náuseas, cólico, vómito y debilitamiento, a menudo se acompaña de diarrea e hipotensión arterial. La muerte es rara, por lo general la enfermedad no dura más de 1 o 2 días (Caballero, 2008).

1.12 *Pseudomonas* spp.

El género *Pseudomonas*, pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, que se sitúa en el orden *Pseudomonadales*.

Pseudomonas es un género de especies capaces de utilizar un amplio rango de compuestos, tanto orgánicos como inorgánico, y capaces de vivir bajo muy diversas condiciones ambientales. Debido a estas características, esos microorganismos son muy ubicuos, y podemos encontrarlos tanto en el ecosistema terrestre como acuático y son importantes como patógenos de plantas, animales y humanos (Migula, 1895)

Las especies de *Pseudomonas* son bien conocidas por su versatilidad metabólica y plasticidad genética. Las especies de *Pseudomonas*, en general crecen rápidamente y presentan gran habilidad para metabolizar una amplia variedad de sustratos, incluyendo compuestos orgánicos tóxicos, como hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Las cepas de las especies son frecuentemente resistentes a antibióticos, desinfectantes detergentes, metales pesados y solventes orgánicos (Martínez, 2007)

La habilidad de diferenciar *Pseudomonas* en el sentido estricto, de las bacterias fenotípicamente similares se debe, principalmente, al desarrollo y aplicación de métodos de análisis de los microorganismos a nivel molecular. Por ejemplo se han utilizado métodos de comparación de secuencias del 16S rRNA o hibridación rNA-DNA (De Vos P, 1989). Es actual y generalmente aceptado que el género *Pseudomonas* se limite a las especies relacionadas con *P. aeruginosa* en el grupo de homología DNA-rRNA dentro de la subclase y de las proteobacteria. (Martínez, 2007)

A las especies que comprende este grupo se les conoce como las "verdaderas *Pseudomonas*" o las "*Pseudomonas fluorescentes*" debido que los pigmentos fluorescentes producidos por *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y otras especies del género. Sin embargo no todas las especies del llamado grupo de "*Pseudomonas fluorescentes*" producen realmente pigmento *fluorescentes* (Martínez, 2007)

Las *Pseudomonas sp.* Es un bacilo gramnegativo aerobio, no formador de esporas. Puede presentar de 1.5 a 5 um de largo y un diámetro de 0. A 1.0 um. Las especies de este género son móviles, debido a la presencia de uno a más flagelos polares. La mayoría de las células de *P. aeruginosa* presentan un único flagelo polar, aunque en ocasiones se han observado alguno aislado con dos o tres flagelos (Martínez, 2007).

Tienen la capacidad de producir morfología coloniales distintivas y pigmentadas. Algunas cepas forman una cápsula polisacáridas que hace que las colonias sean mucosas (típico, por ejemplo, de aislados procedentes de enfermos de fibrosis cística). El crecimiento confluyente, a menudo presenta un brillo metálico y olor a frutas. Una característica común de las "*Pseudomonas fluorescens*" es la producción de pigmentos fluorescentes bajo la luz ultravioleta de longitud de onda baja (254 nm). Las cepas no pigmentadas presentan un color gris pálido. Cuando crecen en agar sangre, normalmente presentan hemólisis (Martínez, 2007)

CAPITULO II

ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, (FAO/OMS, 2007) la inocuidad de los alimentos es una prioridad de la salud pública. Cada año enferman millones de personas, muchas de las cuales mueren, por ingerir alimentos insalubres. En el decenio pasado hubo brotes graves de enfermedades transmitidas por los alimentos en todos los continentes, y en muchos países la frecuencia de esas enfermedades está aumentando de forma significativa. Los problemas más preocupantes relacionados con la inocuidad de los alimentos son:

- La propagación de los riesgos microbiológicos (entre ellos bacterias como *Salmonella* o *Escherichia coli*);
- Los contaminantes químicos de los alimentos;
- La evaluación de nuevas tecnologías alimentarias, como los alimentos genéticamente modificados, y la creación en la mayoría de los países de sistemas sólidos que velen por la inocuidad de los alimentos y garanticen la seguridad de la cadena alimentaria mundial.

Al observar el comportamiento de la morbilidad en el país durante la última década, las Enfermedades Infecciosas y Parasitarias representan una de las primeras causas de consulta (variando entre un 15 y 20% del total de consultas por todos los grupos) y dentro de este grupo, entre el 44 y el 58% de consultas se debieron a una enfermedad Transmitida por Alimentos (ETAs). Nos enfrentamos a una serie de desafíos, dentro de los cuales figuran: la creciente carga de las ETAs y la aparición de nuevos peligros de origen alimentario, rápidos cambios en las tecnologías de la producción,

elaboración y comercialización de los alimentos, Comercio internacional, cambios en los estilos de vida (Boletín Epidemiológico, Venezuela 2010)

La Epidemiología de las ETAs está cambiando, nuevos escenarios están entrando en juego y debemos adecuar nuestro Sistema de Vigilancia e intensificar la Investigación de Brotes, a fin de poder hacer frente ante estas nuevas exigencias en el mundo de la inocuidad de alimentos (FAO/OMS, 2007)

En las últimas décadas, se han reconocido la existencia de un incremento en el número y frecuencia de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, tanto en países industrializados como en vía de desarrollo. Se espera que los programas de entrenamiento en manipulación de los alimentos disminuyan las probabilidades de patologías crónicas transmitidas por los alimentos consumidos en lugares de poco aseo (FAO/OMS, 2007).

En el Estado Mérida, se procesaron 35 muestras de lechuga criolla (*Lactuca savita*) donde en ninguna se encontró *Shigella*, un 100% de las muestras presentaron coliformes con una carga microbiana de 10^5 UFC/g del total de las muestras que presentaron el 42,86%, lo que reflejo una elevada contaminación El hecho de no haber encontrado *Shigella*, no descarto la posibilidad de encontrar patógenos intestinales dada la contaminación fecal que presentaron los resultados obtenidos en *E. coli*. Fueron encontradas cepas de especies potencialmente patógenas tales como *Serratia marcescens* y *Serratia liquifaciensm*, *Escherichia vulneris* (Palma y Cerrada, 1998).

Otro análisis realizado, en el Municipio Libertador del Estado Mérida, de 123 kioscos ambulantes, se estudio la calidad sanitaria de la carne de res

de hamburguesas que expande en la ciudad, evaluándose el recuento de Bacteria Aerobias Mesófilas, presencia de *Staphylococcus aureus*, Coliformes totales, *Escherichia coli* y *Salmonella*. La metodología se hizo en base a las normas COVENIN señaladas para estos casos, los resultados se evidenciaron un 8% de las muestras presentaron un recuento alto de bacterias Aerobias Mesófilas, un 25% de muestras con presencia de *Staphylococcus aureus*, no se encontró ningún otro tipo de bacteria patógena (Rebolledo, 2008).

Una investigación realizada, sobre la prevalencia de *Entamoeba histolytica* y otros enteroparásitos de la comida rápida en el Estado Mérida, en la cual obtuvieron muestras de las heces de 53 manipuladores, y la de los vegetales, determinando así, en la primera de ellas un 59.0% de los manipuladores estaban parasitados y de estos, 49% correspondió a *Blastocystis hominis*, en cuanto al análisis de los vegetales los resultados indicaron un 66,7% de contaminación con parásitos intestinales en los cuales *Blastocystis hominis* ocupó el 95% de los casos positivos (Hernández y Lamedo, 2008).

En la ciudad de Maracay, Venezuela fueron analizadas las ensaladas para perros calientes de puestos de comida rápida, se empleó la técnica del Número Más Probable para cuantificar los Coliformes y *Staphylococcus* sp. Se identificaron parcialmente las cepas de Coliformes y de *Staphylococcus* sp. También se cuantificó la presencia de Hongos en dichas ensaladas. Se les determinó el pH y la acidez y su relación con el crecimiento microbiano. El resultado para Coliformes totales fue $1,44 \times 10^5$ NMP/g; Coliformes fecales $4,57 \times 10^4$ NMP/g; no se detectó *E. coli* en las muestras analizadas, sin embargo de 87 cepas aisladas se determinó la presencia de *Citrobacter freundii* variedad I (45,09% de las cepas aisladas), *Citrobacter freundii* variedad II (21,57%), *Enterobacter aerogenes* variedad I (17,65%) y

Enterobacter aerogenes variedad II (15,69%); *Staphylococcus* sp. $3,93 \times 10^6$ NMP/g. Las 52 cepas de presuntos *Staphylococcus* sp. Resultaron coagulosa negativa; Hongos $4,5 \times 10^4$ UFC/g, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. Fueron identificadas parcialmente. Las ensaladas crudas presentaban un pH y una acidez de 5,92 y 0,78 ml NaOH respectivamente. (Acevedo y colaboradores, 2005)

Por su parte, en su revisión abordada en la *Evaluación microbiológica y detección de enterotoxinas estafilococcicas en ensaladas de moluscos y vegetales*. Se analizaron 63 unidades de muestra pertenecientes a 21 muestras. El 47,6% de las unidades superó los 10 NMP/g de *E coli*. El 79,3% tuvo recuentos mayores a 10^4 UFC/g de microorganismos acidúricos y el 57,1% mayor a 10^5 UFC/g de aerobios mesófilos. Se detectaron enterotoxinas estafilococcicas en el 8% de las muestras, (4,8% del tipo A y 3,2% del tipo B). En general, el 64,3% de las muestras no cumplió alguno de los requisitos internos del laboratorio de microbiología. Se halló relación significativa (*r de Pearson*) entre los recuentos de aerobios mesófilos y los de microorganismos acidúricos ($r= 0,52$; $P<0,05$), al igual que entre los coliformes fecales y *S. aureus* ($r= 0,43$; $P<0,05$), sugiriendo el incumplimiento de varias normas higiénicas, establecidas por organismos de la salud pública. Se concluye que estas ensaladas presentan un alto riesgo de generar problemas de salud a quienes las consumen (Torres M. 2005).

Más recientemente, en una Evaluación de la Calidad Sanitaria de Ensaladas de Frutas (Pico de Gallo) Expendidas en Vía Pública en Esperanza Sonora, los resultados arrojaron una cuenta total de mesófilos aerobios, el 97.5% de las muestras se encuentran dentro del rango permisible de menos de 150,000 UFC/g; para el recuento de hongos y levaduras se obtuvieron rangos que van de 90 a 17,600 UFC/g; en lo que respecta al número más probable de coliformes fecales, el 95% de las

muestras cumplen con la especificación de 100 NMP/g. Para coliformes totales el 87,5% y 12,5% de las muestras presentan un rango de 0 a 90 NMP/g y de 150 a 1,100 NMP/g respectivamente. Para *Salmonella*, el 100% de las muestras, fueron negativas. Con los resultados obtenidos se demuestra que la calidad sanitaria de ensaladas de frutas, si es apta para consumo humano, ya que cumplen con los parámetros especificados por la NOM-093-SSA1-1994 (Fuentes, 2008).

Por otro lado, se evaluó la calidad microbiológica de 92 muestras de la sección de Oncología de un Hospital Nacional, San José, Costa Rica durante los meses de febrero a julio, 2002. De éstas, 48 eran ensaladas, refrescos y frutas y 44 provenían de superficies, aire y manos del personal médico. Se determinó, mediante la técnica de recuento total, la presencia de coliformes totales y fecales utilizando Agar Bilis Rojo Violeta, de *Staphylococcus aureus* en Agar Baird-Parker, de *Pseudomonas* en Agar Cetrinida y de *Listeria* en Caldo Universidad de Vermont, Caldo Fraizer y posteriormente aislada en Agar Oxford. El 77% de los alimentos analizados dio positivo por al menos uno de los parámetros evaluados, siendo las frutas el alimento con los mayores porcentajes de contaminación (94%) y las ensaladas cocinadas con los menores porcentajes (13%). De las 16 ensaladas muestreadas, ocho estaban constituidas por ingredientes previamente cocinados y las restantes por ingredientes crudos. Todas las muestras con ingredientes cocinados resultaron negativas (<10 UFC/g) para coliformes totales, fecales, *Pseudomonas* o *Staphylococcus aureus*, en tanto que dos muestras (25%) dieron resultados positivos por *Listeria* sp. El 100% de las ensaladas crudas fueron positivas por coliformes totales y fecales, con un promedio de $8,5 \times 10^3$ UFC/g de coliformes totales y $4,6 \times 10^3$ UFC/g de coliformes fecales. Dos de las muestras (25%) fueron positivas por *S. aureus*, (promedio de $1,5 \times 10^2$ UFC/g) y otras dos muestras (25%) fueron positivas por *Pseudomonas*. En ninguna

de estas muestras se detectó la presencia de *Listeria* sp. (Jiménez y colaboradores, 2004).

2.1 Planteamiento Del Problema

¿Tendrá una adecuada calidad microbiológica los vegetales crudos contenidas en las hamburguesas que se expenden en los puestos ambulantes de comida rápida ubicados en el Municipio Campo Elías de la ciudad de Mérida?

2.2 Hipótesis

Los vegetales crudos contenidos en las hamburguesas que se expenden en los puestos de comida rápida ubicados en el Municipio Campo Elías del Estado Mérida presentaran altos valores en los indicadores de calidad sanitaria, Bacterias aerobias y coliformes totales y fecales así como la presencia bacterias patógenas de los géneros *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas spp.*

2.3 Objetivos Generales

Evaluar la calidad sanitaria de muestras de los vegetales crudos agregados a las hamburguesas mediante la búsqueda de microorganismos, bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.*

Objetivos Específicos

- ❖ Enumerar la cantidad de bacterias aerobias mesófilas en las muestras analizadas.
- ❖ Cuantificar el número de bacterias coliformes totales y fecales en las muestras analizadas.
- ❖ Detecta la presencia de cepa de *Staphylococcus aureus*.
- ❖ Estudiar la presencia de cepas de *Pseudomonas spp.*
- ❖ Identificar las principales colonias bacterianas aisladas.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS.

Materiales

A.1. Población muestral:

Se recolectaron 6 muestras obtenidas de seis establecimientos ambulantes de comida rápida ubicados en el Municipio Campo Elías del Estado Mérida, seleccionado al azar dentro de los establecidos en Municipio, de manera de estudiar la calidad microbiológica de los vegetales crudos usados en las hamburguesas.

A.2 .Muestras

Las ensaladas fueron recolectadas en diferentes establecimientos del Municipio Campo Elías, los vendedores usaban sus utensilios para colocar las ensaladas en unas bolsas ziploc, con sello hermético las cuales estaban selladas y estériles. Una vez en el laboratorio, se pesaron 10 gramos de cada una de las muestras de ensalada de los distintos establecimientos, se le adicionaron 90 ml de agua peptonada al 0.1 %, Cada bolsa de plástico contentiva de la muestra se maceraron y se disgregaron manualmente, al obtener la dilución 1/10, se tomo 1 ml y se añadió en un tubo con 9 ml de agua peptonada al 0,1% obteniéndose la dilución 1/100, y se repitió el mismo procedimiento hasta obtener a la dilución 1/1000.

A.3. Medios de cultivo

1. Agua peptonada 0.1 % o solución amortiguadora de fosfatosa

2. Caldo lauril sulfato de sodio concentración sencilla o caldo lactosado concentración sencilla con tubo de Durham
3. Caldo bilis verde brillante con tubo de Durham
4. Caldo *Escherichia coli* con tubo de Durham
5. Placas Petri con agar para métodos estándar
6. Placas de petri con agar Mac Conkey
7. Caldo triptona con tubo de Durham
8. Caldo de Citrato de KOSER con tubo de Durham

A.4. Reactivos:

Soluciones, reactivos e indicadores:

1. Frascos gotero con reactivo de Erlich o Kova
2. Frascos gotero con indicador rojo de metilo
3. Frascos gotero con reactivo alfa naftol VP
4. Frascos gotero con solución de hidróxido de potasio al 40 % VP
5. Colorantes para tinción de Gram

A.5. Equipo:

- Mechero, propipeta, gradilla, Balanza granataria, portaobjetos
- Lámpara de luz ultravioleta de longitud amplia 4 watts. (366 nm)
- Pipetas de 10.0 ml y 1.0 ml estériles con tapón de algodón
- Pipetas Pasteur estériles, Asa bacteriológica
- Microscopio óptico
- Termómetro calibrado, baño de maría, incubadora, horno para esterilizar material de vidrio, autoclave.

Metodología:

B.1) Para la Determinación del número de Bacterias Aerobias Mesófilas en UFC/gr

A partir de cada una de las diluciones correspondientes, se sembró en cajas de Petri vacías y estériles, un volumen de 1 ml. Seguidamente se le agregó 15 ml de medio agar Plate Count, previamente fundido y mantenido a una temperatura de 48 °C. Las cajas una vez sembradas, se incubaron a una temperatura de 30 °C, por un período de 48 horas. Finalizado el tiempo de incubación se totalizó el número de colonias crecidas. Los resultados se expresaron en Unidades Formadoras de Colonias por gramo de muestra de ensalada examinada (UFC/gr). (APHA, 1992). Los resultados se encuentran en la tabla N° 1.

B.2) Determinación del número de bacterias coliformes totales y fecales NMP/gr

La cuantificación del grupo de bacterias coliformes totales y fecales en las muestras, se realizaron mediante la técnica del “Número Más Probable” (NMP), para la prueba presuntiva se utilizaron 9 tubos con caldo lactosa lauril, por muestra analizada, correspondiendo 3 tubos para la dilución 1/10, 3 para la dilución 1/100 y 3 para la dilución 1/1000, a los cuales se le agregaron un volumen de 1 ml de cada una de las diluciones señaladas. Una vez sembrados, los tubos se incubaron a 37 ° C por 48 horas. Finalizado el tiempo de incubación se examinarán los tubos observando la producción de burbujas de gas atrapadas en los tubos de Durham, indicador de la presencia de células del grupo coliformes (APHA, 1992).

A partir de los tubos positivos (con producción de gas) para la prueba presuntiva, se tomaron volúmenes de 0.1 ml y se inocularon en tubos contentivos de 9 ml de caldo bilis verde brillantes y tubos con caldo *Escherichia coli* (EC), todos con su respectivo tubo Durham. Una vez sembrados los tubos con caldo bilis verde brillante se incubaron a 37 °C por 48 horas, y los tubos con caldo EC se incubo a 44 °C durante 48 horas. Se considera la prueba positiva cuando se observe la producción de gas dentro de los tubos Durham. Seguidamente, teniendo en cuenta el número de tubos positivos confirmados, se determino el Número Más Probable (NMP) de coliformes totales y de coliformes fecales, a partir de las tablas probabilísticas diseñadas para serie de 3 tubos, así como la fórmula de Thomas, ambas reportadas por la APHA (1992). Para expresar los resultados con el método del Número Más Probable de bacterias del grupo coliformes totales y de coliformes fecales por cada 100 gramos de muestra analizada (NMP/100 gr).

B.3) Determinación del número de *Staphylococcus aureus*.

El estudio de la presencia de células de *Staphylococcus aureus* en las muestras analizadas se realizaron por la técnica de siembra por extensión, utilizando cajas de Petri con el medio de cultivo Baird Parker y de acuerdo a lo recomendado por la Norma COVENIN (15).

Se sembró un volumen de 0,1 ml de cada una de las respectivas diluciones por el método de extensión en el agar Baird-Parker, el cual se incubaron a 37° C durante 24-48 horas. Las colonias *Staphylococcus aureus*, negras brillantes, pequeñas y rodeadas de un halo opaco, se aislaron en agar TSA y se les realizo la tinción de Gram, la prueba de la catalasa y la coagulasa los resultados son expresados como UFC de *Staphylococcus aureus* por gramo de muestra de ensalada analizada.

B.4) Determinación de la presencia de *Pseudomonas spp.*

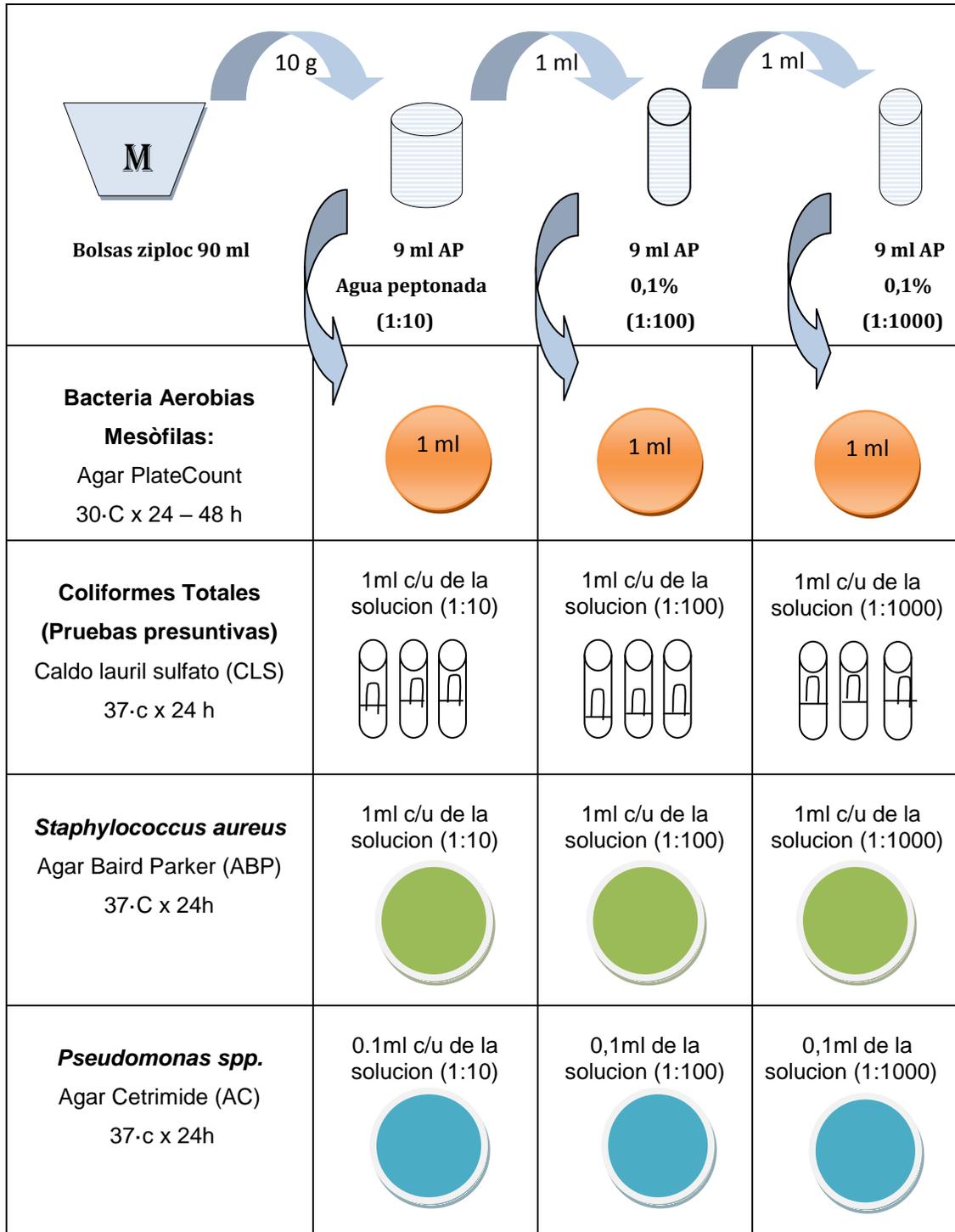
El estudio de la presencia de *Pseudomonas* se realizó por la técnica de siembra por extensión, utilizando cajas de Petri con el medio de cultivo Agar Cetrimide (AC) de acuerdo a lo recomendado por la Norma COVENIN 1292-2004.

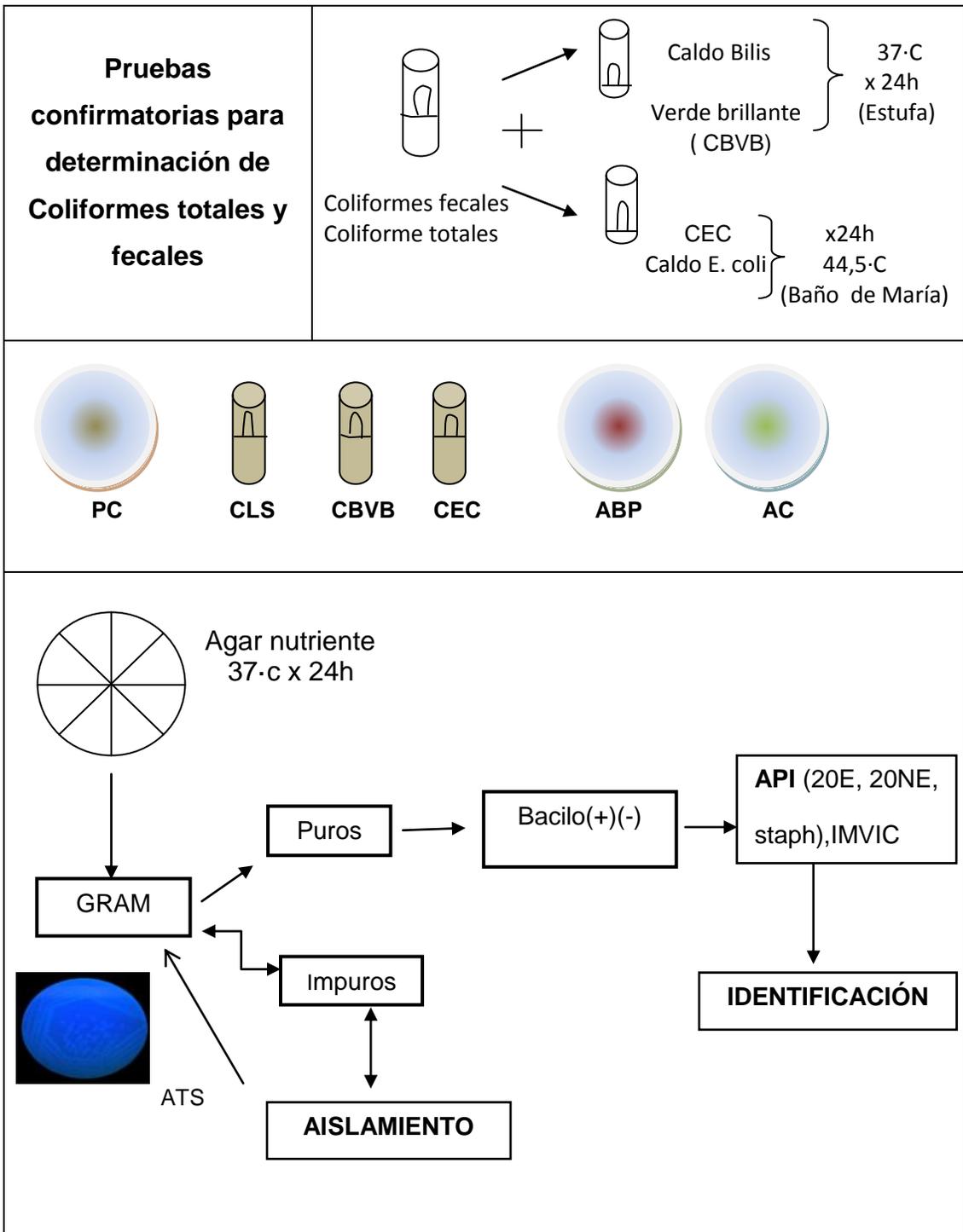
Se sembró un volumen de 0,1 ml de cada una de las respectivas diluciones por el método de extensión en el Agar Cetrimide, el cual se incubó a 37° C durante 24-48 horas. Finalizado el tiempo de incubación se aisló la colonias sospechosas y se le realizó las pruebas bioquímicas de la tiras multisustrato, el sistema API, que es un método rápido de identificación microbiana mediante el empleo de pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas. Cada tira API consta de un número variable de microtubos que contienen los sustratos deshidratados. Existen varios tipos de sistemas API compuestos por diferentes combinaciones de pruebas bioquímicas, con el objeto de identificar correctamente los diversos grupos microbianos (Guión de práctica de Microbiología, 2008).

B.5) Determinaciones estadísticas.

Se utilizó el programa Excel 2003 de Microsoft para la determinación de media aritmética, varianza y error medio de igual forma se realizó un análisis de varianza a valores obtenidos.

Diseño de investigación:





FUENTE: propia

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

El consumo de comida rápida ha incrementado en los últimos años de manera considerable y con ella el consumo de vegetales crudos que contienen estos productos, junto con este incremento aumenta la exposición humana a una variedad amplia de patógenos producidos por los alimentos, que lo convierte en un problema de salud pública, a su vez ha generado mayor atención en el aspecto e inocuidad de los vegetales que son usados para la preparación de hamburguesas, lo que no es tarea fácil, existen alrededor de 50 puestos de hamburguesas en el Municipio Campo Elías y este a su vez se multiplican en las ciudades donde las personas y actividades son mayores. Numerosas son las fuentes de contaminación que entran en contacto con esta verduras desde su cultivo, cosecha, procesamiento, transporte, almacenamiento, y comercialización, por lo que con frecuencia las verduras se contaminan con microorganismos patógenos (Fernández, 2000).

Además, a excepción de la irradiación, en este momento no existe un procedimiento confiable de desinfección que asegure la eliminación o residuos de la concentración de organismos patógeno, dentro de las ensaladas y que no represente un riesgo para la salud del que las consume. Una forma de contribuir la solución del problema de la inocuidad de los alimentos como las verduras, es conocer el tipo y la frecuencia de microorganismos patógenos potencialmente presente en ellas (OPS, 1996).

Normalmente en las hortalizas no debería ser causa de problemas de salud pública, ya que son más resistentes a infecciones microbianas que los productos de origen animal (Adams, 1998). Sin embargo una fuente de contaminación es la manipulación de los alimentos, aspecto que se ha

relacionado con los expendidos de comida rápida. La FAO señala que los alimentos que se venden en la vía pública constituyen una fuente importante de alimentos nutritivos y de bajo costo, especialmente para los sectores de escasos recursos de la población urbana, sin embargo destacan que los mismos han demostrado ser un potencial para causar brotes de infección alimentaria por contaminación microbiológica (FAO, 1990).

En esta investigación se analizaron un total de 6 establecimientos de comida rápida, situados en las calles y avenidas del Municipio Campo Elías del Estado Mérida. De las 6 ensaladas muestreadas, constituidas por ingredientes crudos específicamente de repollo y zanahoria. Se determinó coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y *Escherichia coli* por la técnica del número más probable. Los CT fueron aislados en los 6 establecimientos en un total ($\geq 1,1 \times 10^3$) NMP/gr en 100% de los vegetales. Los CF se ubicaron en diferentes cantidades en cada uno de los establecimientos los resultados se pueden apreciar en la (Tabla N° 1), demuestra según los criterios microbiológicos para *E. coli*, 83,3 % de las ensaladas fueron satisfactorios y 16,7 % insatisfactorios para su consumo. Para las Bacteria Aerobias Mesófilas obtuvimos un total de ($6,4 \times 10^6$) UFC/gr lo cual son inaceptable dentro de los parámetros ubicado en el criterio microbiológico de los alimentos. (Tabla N° 2-4) Posteriormente para la determinación de *Pseudomonas ssp*, obtuvimos como resultado "*Pseudomona fluorescens*", identificada con el sistema API 20 NE (Identifica bacilos Gram negativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias), Para la determinación de *Staphylococcus aureus*, obtuvimos valores entre un mínimo de ($1,1 \times 10$) UFC/gr y un máximo de ($6,4 \times 10^4$) UFC/gr, pueden detallarse en la (Tabla N° 4) esto nos permite señalar que un 66,6%, de las muestras son viables para consumo humano mientras que 33,4% restante son inapropiadas para el consumo.

En nuestro caso, el estudio realizado en los puestos de comida rápida del Municipio Campo Elías, los niveles de coliformes totales encontrados en los vegetales puede ser el resultado de diferentes eventos como; abundante exposición a las fuentes de contaminación durante el transporte, procesamiento y comercialización, podrían haber empleado algunos vegetales que no fueron sometidos a lavado y desinfección o haya quedado una baja contaminación o sobrevivencia de microorganismos. Es recomendable establecer normas higiénicas que permitan a los establecimientos de baja calidad mejorar sus servicios para los consumidores.

En la **tabla1** se muestra la cuantificación de Coliformes totales en las muestras de ensaladas, de los seis muestreos para cada uno de los expendios; en dicha figura se puede apreciar que existe una alta carga de este grupo de microorganismos ($\geq 1,1 \times 10^3$ NMP/g) en los vegetales analizados y que no se presentan diferencias significativas entre los valores obtenidos (entre expendedores y entre muestreos). Otros investigadores han señalado la presencia de Coliformes totales en vegetales frescos, con una incidencia de $1,44 \times 10^5$; y $4,57 \times 10^4$ NMP/g. (Acevedo y colaboradores, 2005)

TABLA N° 1

Resultados de la determinación de coliformes totales y coliformes fecales por el método de (NMP/gr) de los vegetales crudos usados en hamburguesas que se expende en los puestos de comida rápida ambulante del Municipio Campo Elías, Estado Mérida 2013.

N° DE MUESTRA	COLIFORME TOTALES (NMP/gr)	COLIFORME FECALES (NMP/gr)
Establecimiento 1	$\geq 1,1 \times 10^3$	$2,7 \times 10^1$
Establecimiento 2	$\geq 1,1 \times 10^3$	$2,8 \times 10^1$
Establecimiento 3	$\geq 1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
Establecimiento 4	$\geq 1,1 \times 10^3$	$2,0 \times 10^1$
Establecimiento 5	$\geq 1,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^1$
Establecimiento 6	$\geq 1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^1$

FUENTE: Propia

En la **tabla 2** se muestra la cuantificación para las Bacteria Aerobias Mesófilas obtuvimos un total de $(6,4 \times 10^6)$ UFC/gr lo cual son inaceptable dentro de los parámetros ubicado en el criterio microbiológico de los alimentos, en otras evaluaciones se halló mayor a 10^5 UFC/gr entre los recuentos de aerobios mesófilos, sugiriendo el incumplimiento de varias normas higiénicas, establecidas por organismos de la salud pública. Se concluye que estos vegetales presentan un alto riesgo de generar problemas de salud a quienes las consumen (Torres M. 2005).

TABLA N° 2.

Determinación del número de bacterias aerobias mesófilas en (UFC/gr) de los vegetales crudos usados en hamburguesas que se expende en los puestos de comida rápida ambulante del Municipio Campo Elías, Estado Mérida 2013.

Nº de Muestras	10 UFC/gr	10² UFC/gr	10³ UFC/gr
1	6,4x10	6,4x10³	6,4x10⁶
2	6,4x10	6,4x10³	6,4x10⁶
3	6,4x10	6,4x10³	6,4x10⁶
4	6,4x10	6,4x10³	6,4x10⁶
5	6,4x10	6,4x10³	6,4x10⁶
6	6,4x10	6,4x10³	6,4x10⁶

FUENTE: Propia

En la **tabla 3** se muestra la cuantificación de *Staphylococcus aureus* para la cual existe una variación en los resultados en cada uno de los establecimientos, que en porcentaje nos señala que un 66,6%, de las muestras son viables para consumo humano mientras que 33,4% restante son inapropiadas para el consumo.

TABLA N° 3.

Resultados de la determinación de *Staphylococcus aureus* en (UFC/gr) de los vegetales crudos usados en hamburguesas que se expende en los puestos de comida rápida ambulante del Municipio Campo Elías, Estado Mérida 2013.

N° DE MUESTRA	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/gr)
Establecimiento 1	1,1x10 ¹
Establecimiento 2	1,5x10 ¹
Establecimiento 3	≥ 6,4x10 ⁴
Establecimiento 4	2,3x10 ¹
Establecimiento 5	≥ 6,4x10 ⁴
Establecimiento 6	1,3x10 ¹

FUENTE: Propia

La **tabla 4** Resume los parámetros estadísticos de los diferentes hallazgos de la investigación, reflejando los valores máximos y mínimos, del contaje de colonias bacterianas, en coliformes totales, coliforme fecales y *Staphylococcus aureus*, bacterias aerobias mesófilas.

TABLA N^o 4.

Parámetros Estadísticos	BAM UFC/gr	Coliformes totales (NMP/gr)	Coliformes fecales (NMP/gr)	<i>Staphylococcus aureus</i> (NMP/gr)
Valor Máximo (UFC/g)	6,4x10 ⁶	≥ 1,1x10 ⁻³	1,1x10 ³	≥ 6,0x10 ⁴
Valor Mínimo (UFG/g)	6,4x10	≤ 1,1x10 ³	1,1 x10 ¹	1,1x10 ¹

FUENTE: Propia

TABLA N°5 Norma Sanitaria Que Establece Los Criterios Microbiológicos De Calidad Sanitaria E Inocuidad Para Los Alimentos Y Bebidas De Consumo Humano (Proyecto De Actualización De La Rm N° 615-2003 Sa/Dm).

Limites microbiológicos aceptados para comidas preparadas sin tratamiento térmico (Ensaladas crudas, mayonesa y salsa papa huencaima, postres, jugos y otros).

<i>Agente microbiológico</i>	Categoría	Clase	n	c	Limite por gr. o ml.	
					m	M
<i>Aerobia mesófilas</i>	2	3	5	2	10 ⁵	10 ⁵
<i>Coliformes</i>	5	3	5	2	10 ²	10 ³
<i>Staphylococcus aureus.</i>	6	3	5	2	10	10 ²
<i>Escherichia coli</i>	6	3	5	2	10	10 ²
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia/25g	----

Fuente:(Proyecto De Actualización De La Rm N° 615-2003 Sa/Dm).

Resultado de identificación de *Pseudomonas sp.*

Para el análisis confirmatorio de las colonias sospechosas de *Pseudomonas sp.* presentes en los vegetales crudos usados en las hamburguesas, fue usado el sistema API 20 NE que permite la identificación de bacilos Gram negativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias como por ejemplo: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, entre otros, del cual nos dio como resultado la *Pseudomonas fluorescens*. (Observe imagen en anexo)

Resultados de la encuesta a los establecimientos.

En el presente trabajo de investigación fue realizada una encuesta a los seis establecimientos donde fueron recolectadas las muestras, la cual nos afirman tener certificación de salud y permiso sanitario, como también aseguran tener conocimiento sobre la manipulación de alimentos, en su mayoría almacenan agua en recipientes y regularmente se lavan las manos pero coinciden en que no hay un personal diferente que haga el cobro de los productos y ellos manipulan a su vez el alimento y el dinero, se presume que gran parte de estas limitaciones les lleva a generar baja calidad en la preparación de los alimentos y por ende la contaminación es mayor al tener factores de riesgo como la manipulación conjunta del dinero y el alimento (tabla 6). La encuesta realizada puede observarse en los anexos de la investigación.

TABLA N°6 Resultado de la encuesta a cada uno de los establecimiento.

ENCUESTA REALIZADA	SI	NO
¿Posee permiso sanitario?	100%	
¿Poseen los empleados certificados de salud?	100%	
¿Usan pinzas para manipular los alimentos?	70%	30%*
¿Almacenan agua en el establecimiento?	70%	30%
¿Se lavan con frecuencia las manos?	60%	40%
¿Existe una persona que se ocupe de la cobranza de la venta del producto?	40%	60%

*El 30% de los expendedores usaban solo cucharas para servir los vegetales

CONCLUSION

Debido que durante la preparación de ensaladas de vegetales crudos, están suelen someterse a diferentes maniobras que pueden favorecer a la contaminación con microorganismos patógenos, y siendo un factor que predispone a este tipo de ensaldas es que sean consumidas sin ningún tratamiento térmico adicional, es importante que estos vegetales se sometan a un proceso de desinfección para minimizar los peligros microbianos que puedan estar presentes. Los desinfectantes pueden ser aplicados siempre y cuando por si solos no representen un peligro químico para el consumidor del producto. Como se ha mencionado los grupos patógenos y las enfermedades transmitidas por los alimentos sean convertido en un problema grave para la salud pública, es necesario prevenir de manera eficaz las mismas.

Con esta investigación hemos concluido que la hipótesis planteada, es afirmativa ya que los vegetales crudos usados para las hamburguesas vendidas en el Municipio Campo Elías por vendedores ambulantes presentaron irregulares niveles de los valores en los indicadores de calidad sanitaria los recomendados por los parámetros del criterio microbiológico de los alimentos expuestos en la (Tabla 4). Obteniéndose coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y *Escherichia coli* aislados en los 6 establecimientos en un total ($\geq 1,1 \times 10^3$) NMP/gr en 100% de los vegetales, demostrando que para *E. coli*, 83,3 % de las ensaladas fueron satisfactorios y 16,7 % insatisfactorios para su consumo. Para las Bacteria aerobias mesófilas se obtuvo un total de ($6,4 \times 10^6$) UFC/ml lo cual son inaceptable dentro de los parámetros ubicado en el criterio microbiológico de los alimentos, para la determinación de *Pseudomonas ssp*, resultado identificada “*Pseudomona fluorescens*”, y en la determinación de *Staphylococcus aureus*, obtener valores entre ($1,1 \times 10$) UFC/gr y un máximo de ($6,4 \times 10^4$) UFC/gr, nos

permite señalar que un 66,6%, de las muestras son viables para consumo humano mientras que 33,4% restante son inapropiadas para el consumo.

En lo anteriormente expuestos en el trabajo de investigación, se puede considerar desde el punto de vista crítico, que deben ser incluidas una normativa obligatoria que rijan la supervisión permanente y estricta a los expendidos de comida rápida, creando conciencia de la higiene y de la manipulación inadecuada de los alimentos así como el mal almacenamiento que implica la posibilidad de que un patógeno pueda colonizar los alimento.

RECOMENDACIONES

Debido a las múltiples investigaciones realizadas acerca de la contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública, que indica un nivel educacional en los manipuladores de alimentos inferior a lo correspondiente en este tipo de trabajo, el reporte de aislamiento de patógenos y las pocas condiciones higiénicas, nos permite alentar a la población trabajadora de alimentos a que suministren un producto con calidad garantizada, para una adquisición confiable de los compradores, siguiendo estas recomendaciones:

- ❖ Todo trabajador en empresas de alimentos debe tener conocimientos de la manipulación del mismo para garantizar el orden, conciencia y responsabilidad que el oficio amerita.
- ❖ El área debe mantenerse limpia y organizada y libres de restos de basura u otras fuentes de contaminación.
- ❖ Nunca se colocarán los alimentos junto a los productos de limpieza.
- ❖ Los depósitos de los alimentos estarán contruidos de forma que evite el acceso de roedores, insectos y plagas.
- ❖ Las áreas de tratado de los alimentos deben ser bien ventiladas, limpias, secas y organizadas.
- ❖ Los alimentos deben estar en recipientes tapados y separados del piso estos equipos se mantendrán limpios.
- ❖ En la preparación o procesamiento de los alimentos se debe garantizar la higiene de la superficie, utensilios q se usen que tengan contactos con los alimentos.
- ❖ La manipulación y el procesamiento de los productos deben ejecutarse sin contaminarlos, eliminando las formas vegetativas en mal estado para evitar el desarrollo de los microorganismos.

- ❖ Orientar a los manipuladores de alimentos sobre la necesidad de lavarse perfectamente las manos después de defecar.
- ❖ Orientar sobre la necesidad de proteger los abastecimientos de agua potable.
- ❖ Mejorar la supervisión por parte de los organismos de salud, encargados de las prácticas sanitarias, de las personas que preparan y sirven alimentos en sitios públicos.
- ❖ Extender este trabajo hacia otros municipios o estados del país, así como también a los mercados y campos donde provienen las hortalizas.

BIBLIOGRAFIA

Adams, A. y Moss, M., 1997 Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. España.

Acevedo L, Mendoza C, Oyón R. Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, *Staphylococcus* sp y hongos en ensaladas para perro calientes expandidas en la ciudad de Maracay, Venezuela. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 51 (4), 2005.

Ana Hernández, Noret Lamedo. Prevalencia de Entamoeba histolytica y otros ectoparásitos, en expendedores de comida rápida de la parroquia el Llano de la Ciudad de Mérida. Tesis de grado. Facultad de Farmacia/ Universidad de los Andes.2008

Ana María Rebolledo. Calidad sanitaria de las hamburguesas de carne de res expandidas en locales ambulantes del municipio libertador del estado Mérida. Tesis de grado. Facultad de Farmacia/ Universidad de los Andes; 2008

Anacleto Félix-Fuentes, Olga Nydia Campas-Baypoli y Mercedes Meza-Montenegro. Preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos, especificaciones sanitarias. Revista Latinoamericana de Microbiología, S.A. Vol. 49, Nos 1-2.

Caballero Torres, Ángel E. 2008. Higiene de los Alimentos. [et. al] La Habana. Editorial Ciencias Médicas.

Carlos J. Palma, Lisbeth C. Cerrada. *Shiguella* y su relación con los coliformes en lechuga criolla (*Lactuca sativa*). Trabajo de Grado. Facultad de Farmacia/ Universidad de los Andes; 1998.

Eva Castellano. Calidad Microbiológica de las Carnes de res que se consume en el estado Mérida. Trabajo de Ascenso Universidad de los Andes; 1976.

Organización Mundial de la Salud (OMS) Organización de las Naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO). Análisis de riesgos relativos a la inocuidad de los alimentos. Guía para las autoridades Nacionales de inocuidad de los alimentos. Roma, 2007

Fernández, E. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, México. 2000

Frazier, W. C. 1972. Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia, 2ª ed. Zaragoza, España.

George J. Benwar. Microbiología Básica de los Alimentos. España. Editorial Bellaterra S.A.; 1979. Facultad de farmacia/Universidad de los Andes.

Griffin PM, Tauxe RV. La epidemiología de infecciones causadas por *Escherichia coli* O157: H7, otra enterohemorrágica *E. coli*, y el síndrome urémico hemolítico asociado. Epidemiología Rev. 1991; 13:60-98.

<http://www.monografias.com/trabajos85/microorganismos-patogenos-hortalizas-frutas/microorganismos-patogenos-hortalizas-frutas>.

<http://www.analizacalidad.com/docftp/fi168arf2005-1.pdf>

Idelfonso J. Larrañaga Coll. Control e Higiene de los Alimentos. España. Editorial Printeol; 1999. Facultad de Farmacia /Universidad de los Andes.

Brackett, R. Microbiología de los alimentos, frutas, hortalizas y granos. 1989.

Jay, J. Microbiología Moderna de los Alimentos. 2da Edición. España. Editorial Acribia; 1981

Jiménez F. y colaboradores. Evaluación de la presencia de bacterias en alimentos y en el ambiente de una sección de oncología de un hospital nacional, San José, Costa Rica.2004 [Revista en la Internet].Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/scielo>

Lidia R. Martínez. *Pseudomona aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis Doctoral; Barcelona, 2007.

María R Torres. Agentes patógenos transmitidos por alimentos.1ra Edición. Vol. I. (Ed.). Universidad de Guadalajara, México.2002.

Migula W. Uebere innuessystem der Bacterirn Arb. Bacteriol Inst. technisch Hochsch.karlsruhe 1895; 1:235-238.

Nohelia C. y Colaboradores. Sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutos mínimamente procesados. Revista Cubana Salud Pública 2004; 30(1)

Organización Panamericana de Salud/Organización Mundial de la Salud. 2000. Evaluación del riesgo microbiológico de los alimentos vendidos en la vía pública en ciudades de América Latina. Guía Técnica para el estudio.

(Proyecto De Actualización De La Rm N° 615-2003 Sa/Dm), Norma Sanitaria Que Establece Los Criterios Microbiológicos De Calidad Sanitaria E Inocuidad Para Los Alimentos y Bebidas de consumo Humano.

Se puede Observar en:

http://www.digesa.sld.pe/norma_consulta/Proy_RM615-2003.pdf

Torres M., Evaluación microbiológica y detección de enterotoxinas estafilococcicas en ensaladas de moluscos y vegetales. Fundación La Salle de Ciencias Naturales. Estación de Investigaciones Marinas de Margarita, Porlamar. Estado Nueva Esparta, Venezuela, 6301.

ANEXO



ENCUESTA



Nombre del establecimiento:
Nombre del responsable:
Número de empleados:

DATOS CORRESPONDIENTES AL ESTABLECIMIENTO

Responda con una X según sea el caso.	SI	NO
¿Posee permiso sanitario?		
¿Poseen los empleados certificados de salud?		
¿Usan pinzas para manipular los alimentos?		
¿Almacenan agua en el establecimiento?		
¿Se lavan con frecuencia las manos?		
¿Existe una persona que se ocupe de la cobranza de la venta del producto?		

DATOS DEL PRODUCTO

- ¿Las ensaladas crudas para las hamburguesas son preparadas de forma casera o compradas ya preparadas? _____
- ¿Dónde compran las hortalizas? _____
- ¿Dónde las lavan en la casa o en el expendio? _____
- ¿Dónde guardan las ensaladas? Bolsas o Recipientes plásticos

Anexo

Pruebas presuntivas para determinación de Coliformes totales y fecales



Caldo lauril sulfato (CLS) 37-c x 24 h



Fuente: Propia

Anexo

Imagen Del Sistema Api 20 NE Realizado Como Prueba Confirmatoria Para *Pseudomona sp.*



Imagen tomada del SISTEMAS MINIATURIZADOS API®

