



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.

INGENIERIA BIOQUIMICA

“EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR.”

PROYECTO DE RESIDENCIA PROFECONAL.

“ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS APLICADOS EN FRUTAS Y HORTALIZAS EN SAN CRISTÓBAL DE LAS CASAS, CHIAPAS.”

ASESOR EXTERNO:

ING. JESÚS CARMONA DE LA TORRE.

Q.F.B. MARÍA GUADALUPE PÉREZ ESCOBAR.

ASESOR INTERNO:

ING. MARGARITA MARCELIN MADRIGAL.

REVISORES:

Q.B.P AURA FLORES PEREZ.

DRA. PATRICIA SANCHEZ ITURBE.

PRESENTA:

ANGEL ALEJANDRO REYES VAZQUEZ.

NUMERO DE CONTROL:

08270371

SAN CRISTÓBAL DE LAS CASAS, CHIAPAS. ENERO DEL 2014.

ÍNDICE.

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 6 |
| OBJETIVOS: | |
| GENERAL Y ESPECÍFICOS..... | 8 |
| CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE SE PARTICIPO..... | 9 |
| ALCANCES Y LIMITACIONES..... | 12 |
| FUNDAMENTO TEÓRICO..... | 13 |
| METODOLOGÍA..... | 53 |
| RESULTADOS..... | 57 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 67 |
| ANEXOS..... | 69 |
| FUENTES DE INFORMACIÓN..... | 87 |

1. INTRODUCCIÓN.

El empleo de métodos normalizados para la realización de análisis microbiológicos es una herramienta mediante la cual los laboratorios disponen de métodos de ensayo reconocidos internacionalmente, aportando de este modo a la obtención de resultados comparables, sin descartar a que el resultado sea confiable de forma que se garantiza la calidad y seguridad de los alimentos sometidos a e análisis microbiológico.

En el periodo actual contamos con diversos procedimientos y métodos analíticos por lo cual es necesario crear énfasis en el análisis de los resultados obtenidos, así bien es preciso enfatizar en las buenas prácticas de laboratorio (BPL) y el aseguramiento de la calidad, lo cual rige el seguimiento de normas establecidas para disminuir los riesgos de error en el laboratorio.

Normalmente los análisis microbiológicos aplicados a productos frescos comercializados en mercados de México no se utilizan para la prevención de la salud y San Cristóbal de las Casas, Chiapas no es excepción. La aplicación de métodos microbiológicos requiere de cuidados especiales ya que los microorganismos son seres vivos que requieren de ciertas condiciones para su cultivo y cuantificación en el laboratorio, desde la toma de muestras hasta la incubación requieren de buenas prácticas y control de calidad.

La normalización de un método de laboratorio requiere de estudios en una demostración científica, que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Así como la comisión de normalización y Acreditación (CNA) y la (EPA) United States Environmenta Protection Agency son métodos oficiales para la normalización de técnicas y acreditación de laboratorios.

De acuerdo con el Instituto de Fomento a la Agricultura Tropical (IFAT), son aproximadamente 100 hectáreas de hortalizas las que se riegan con aguas negras, en unas siete comunidades del municipio. Son unas 200 familias de las comunidades de Pozo Colorado, Guadalupe el Túnel, La Lagunita, El Aguacate, Sacualpa, Duraznal y Matasano, las que, por carecer de agua potable o entubada, riegan sus hortalizas con las aguas negras de la ciudad.

En esas 100 hectáreas se cultiva papa, acelga, zanahoria, ajo, betabel, calabacita, cebolla, cilantro, coliflor, brócoli, tomate de cáscara, chayote, chícharo, chile, frijol ejotero, haba, jitomate, lechuga y rábano. Información del IFAT señala que el principal cultivo es la papa, con unas 30 hectáreas y una producción aproximada de 450 toneladas por ciclo agrícola.

El análisis microbiano en alimentos como son frutas y hortalizas dentro de esta ciudad, es caracterizado por el impacto de cargas microbianas patógenas para el ser humano, por lo consiguiente el análisis, con métodos rápidos junto con la aplicación de este método, son un sustento que se estandarizara para el mejor manejo de las técnicas microbiológicas, las cuales posteriormente nos ayudara a la identificación de microorganismos patógenos que pueden causar enfermedades, y por lo tanto prevenir este tipo de cargas microbianas patógenas.

Actualmente se han desarrollado métodos microbiológicos rápidos para cuantificar microorganismos Coliformes totales, fecales y organismos específicos tales como E.coli, a través de medios selectivos.

El análisis microbiológico en alimentos para consumo humano en donde no se concentran en un carácter preventivo, si no en analizar la carga microbiana proveniente de un alimento común, y que a su vez se considera determinar los puntos de riesgo de contaminación o multiplicación microbiana (“puntos críticos de proceso”) y evitarlos siguiendo buenas prácticas de elaboración y producción del alimento.

En el campo del análisis microbiano en productos inocuos a sus consumidores, se ve en la necesidad de realizar análisis microbiológicos que resultan ser dispendiosos y demorados, por lo cual actualmente se hace necesario contar con productos que permitan desarrollar estos análisis de manera rápida aumentando la productividad de los laboratorios y más importante aún que proporcionen resultados confiables y seguros.

Las técnicas microbiológicas convencionales de detección de microorganismos como la técnica del NMP, filtración por membrana, siembra en profundidad o vertido en placa, lo cual implica su preparación esterilización de material, mano de obra suficiente, periodos de incubación relativamente largos, el empleo de cultivos de enriquecimientos o de recuperación y se debe disponer de equipos necesarios como incubadoras, neveras, autoclaves, etc.

Ahora bien considerando que los procedimientos tradicionales son laboriosos y requieren de mucho tiempo, para evitarlo se ha desarrollado numerosas técnicas de recuento rápido y efectivo en las cuales se busca utilizar el menor número de procedimientos y ensayos posibles.

Las placas PETRIFILM 3M son una familia de placas listas para usarse, que están diseñadas para obtener el menor tiempo posible de respuesta a los resultados, incrementa la productividad, brinda sustentabilidad y factibilidad para la eficiencia en los procesos.

El crecimiento exponencial de los métodos rápidos aplicados a la microbiología de los alimentos puede evidenciarse en la gran cantidad de equipos comerciales que se ofrecen en la actualidad con el objetivo de tener resultados rápidos, en tiempo real, exactos y de bajo costo.

2. JUSTIFICACIÓN.

El siguiente estudio fue realizado en el centro “El Colegio de la Frontera Sur” (ECOSUR), que tiene Unidades en las ciudades de Tapachula, San Cristóbal, Villahermosa, Campeche y Chetumal en los cuatro estados de la Frontera Sur Chiapas, Tabasco, Campeche y Quintana Roo.

El Colegio de la Frontera Sur es un centro público de investigación científica, que busca contribuir al desarrollo sustentable de la frontera sur de México, Centroamérica y el Caribe a través de la generación de conocimientos, la formación de recursos humanos y la vinculación desde las ciencias sociales y naturales.

San Cristóbal de Las Casas, situado en las montañas centrales de Chiapas, México, es un centro cultural y económico de la región. El futuro de los recursos hidráulicos de San Cristóbal está en peligro debido al rápido crecimiento de la población, el cambio del uso del suelo, afortunadamente a la fecha no hay sobre extracción de agua, toda proviene de 9 manantiales naturales, una carencia de servicios de saneamiento y tratamiento de aguas residuales, y la degradación de la calidad del agua superficial y subterránea.

El uso de aguas residuales sin un previo saneamiento para su utilización en riego de frutas y hortalizas, resulta en efecto un problema para el consumo de estos alimentos, por lo regular en el estado de Chiapas y Tabasco, las familias marginadas que se dedican al cultivo de estos no cuentan con agua potable para su riego, por lo tanto estas familias no buscan alguna otra alternativa de riego y optan por regar con aguas residuales.

Estas aguas residuales contienen cargas microbianas muy altas que en su caso contienen patógenos que se encuentran en el grupo de las Enterobacterias pertenecientes a Coliformes fecales, provenientes de aguas negras con contenido fecal en una proporción alta.

Se plantea un análisis más detallado en el impacto que tienen estas frutas y hortalizas contaminadas a nivel salud y el impacto económico que las enfermedades probables puedan lograr como consecuencia a enfermedades por consumir alimentos frescos.

Lo anterior justifica ampliamente la necesidad de aplicar métodos microbiológicos rápidos para emprender acciones preventivas, ofrecer este tipo de servicios especializados a través de los Laboratorios Institucionales de ECOSUR.

Dicha infraestructura solo saca el agua negra del centro de la ciudad y la deposita sin tratamiento alguno en los ríos que atraviesan la ciudad. Estos ríos se han convertido en los receptores de la descarga de aguas negras, y por lo tanto se han contaminado de manera que ya no cumplen con los estándares nacionales de calidad de agua.

De acuerdo a los antecedentes descritos se propone el siguiente tema de estudio: “ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS APLICADOS EN FRUTAS Y HORTALIZAS EN SAN CRISTÓBAL DE LAS CASAS, CHIAPAS”.

3. OBJETIVO GENERAL.

- Aplicar métodos microbiológicos rápidos en fresas, lechugas y acelgas producidas y comercializadas en los mercados de san Cristóbal de las casas Chiapas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Elaborar un análisis de los resultados obtenidos de fresas, lechugas y acelgas analizadas por el método microbiológico rápido de cada mercado de san Cristóbal de las casas.

- Describir las ventajas y desventajas del método microbiológico utilizado en la investigación.

- Realizar un análisis costo-beneficio de los métodos microbiológicos rápidos en comparación a los métodos convencionales.

4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA.

4.1 LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA

El proyecto se realizará en las instalaciones de El Colegio de la Frontera Sur en Los laboratorios institucionales y específicamente en el laboratorio de bromatología.

Principales actividades.

Analizar fresa, acelga, lechuga, con el objetivo de verificar el objetivo de verificar el grado de contaminación por microorganismos fecales (Enterobacterias), Coliformes totales, hongos y levaduras.

4.2 FUNCIONES.

Ofrecer servicios de laboratorio y de capacitación inherentes al área para investigadores y usuarios externos asegurando la calidad de los resultados.

4.3 DESARROLLO DE LOS LIS

Desde 1998 se contrata personal técnico para la operación de laboratorios temáticos, en 2003 el entonces director general toma la decisión de hacer uso eficiente de la infraestructura y equipamiento para atender las necesidades de los proyectos de investigación y se conforma el área de laboratorios con cuatro laboratorios, en el área se generan dos laboratorios más el de análisis instrumental, bromatología que se incorporan al grupo Lis donde ya estaban los laboratorios de suelos y plantas, química, diagnósticos fitosanitarios, microscopio electrónico de barrido, en 2006 se incorpora al grupo el laboratorio de genética para un total de siete laboratorios que operan bajo el nombre de Lis. También en 2006 se diseña e inicia la documentación para la implementación del SGC- Lis.

A continuación se presenta el organigrama operativo del área de los Lis.

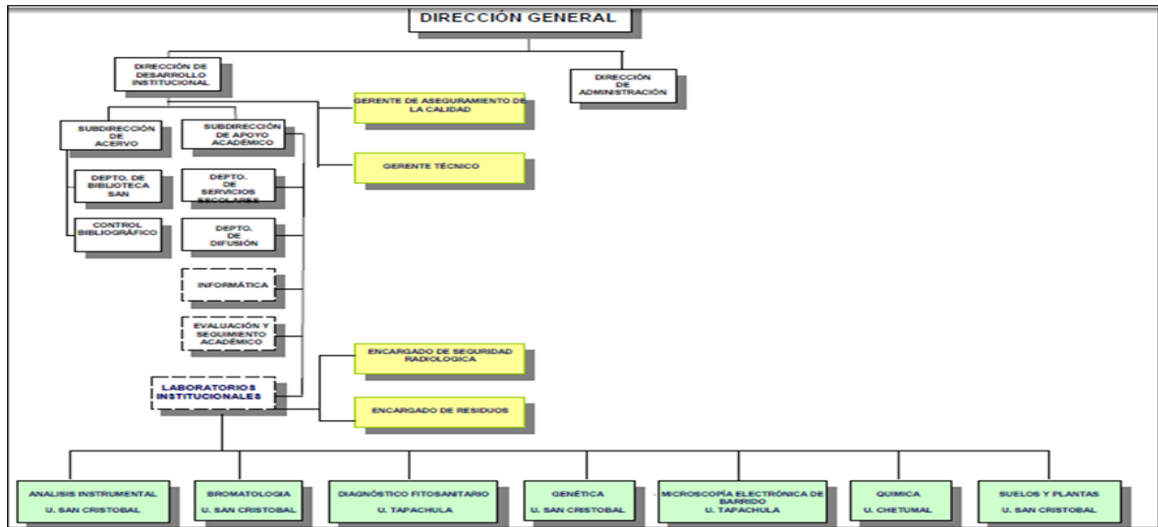


Figura 1. Organigrama de ECOSUR.

Funciones:

- Proporcionar un servicio de calidad en los resultados de los análisis establecidos.
- Brindar cursos teórico-práctico en las técnicas de laboratorio aplicadas al análisis de alimentos, forrajes y balanceados.
- Colaborar en proyectos de investigación.
- Colaborar en las vistas guiadas.

Misión.

- Apoyar a la investigación y contribuir al desarrollo sustentable de la frontera sur de México, Centroamérica y el Caribe.

Objetivo

- Cubrir las necesidades de los proyectos de investigación de ECOSUR a través de los servicios de los Laboratorios Institucionales y atender a la demanda de usuarios externos.

4.4 POLÍTICA DE CALIDAD

- Es Política de Calidad de los Laboratorios Institucionales de ECOSUR realizar nuestro trabajo en forma objetiva e imparcial; con responsabilidad, ética y transparencia, garantizando la confiabilidad y confidencialidad de los resultados para satisfacer las necesidades del cliente en cumplimiento a la Norma ISO/IEC 17025-2005 en México NMX-EC-17025_IMNC en su versión vigente

5. ALCANCES Y LIMITACIONES.

Aplicar métodos microbiológicos rápidos a los siguientes tres hortalizas y frutas frescas de fresa, lechuga y acelga cuyas muestras serán tomadas en las zonas comerciales de MERPOSUR y JOSÉ CASTILLO THIELEMANS considerando estudios de prospección para temporada de estiaje. Consideramos que el alcance de nuestra investigación será aplicar y estimar los costos de apreciación de los métodos microbiológicos aplicados a frutas y hortalizas en san Cristóbal de las casas, así como la identificación de patógenos en estos alimentos de consumo humano en los diferentes comercializadoras existentes en la ciudad.

Se toma en cuenta el presente estudio para disponibilidad de estudios posteriores y su referencia para nuevos proyectos, también se desea que sea el sustento de comprobar la problemática descrita de aguas residuales para riego en san Cristóbal.

6. FUNDAMENTO TEÓRICO.

La Microbiología se puede definir, sobre la base de su etimología, como la ciencia que trata de los seres vivos muy pequeños, concretamente de aquellos cuyo tamaño se encuentra por debajo del poder resolutivo del ojo humano.

Esto hace que el objeto de esta disciplina venga determinado por la metodología apropiada para poner en evidencia, y poder estudiar, a los microorganismos.

6.1 LOS MICROORGANISMOS COMO AGENTES DE DETERIORO DE ALIMENTOS.

La microbiología de los alimentos trata de los procesos en los que los microorganismos influyen en las características de los productos de consumo alimenticio humano o animal.

- Alimento deteriorado: aquel dañado por agentes microbianos, químicos o físicos de forma que es inaceptable para el consumo humano.

- Aproximadamente el 20% de las frutas y verduras recolectadas se pierden por deterioro microbiano producido por alguna de las 250 contaminaciones de mercado. (Salmonelosis, gastroenteritis por E. coli Enteropatógena, Enteritis producidas por Bacillaceae, botulismo).

6.2 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.

6.2.1 Transmisión:

Hay que diferenciar entre infecciones e intoxicaciones y entre infecciones con DMI (dosis mínima infectiva) o DI 50 (dosis infectiva que produce la

enfermedad en el 50 % de la población) bajas o altas. En muchos casos no está totalmente claro si el proceso es intoxicativo o infeccioso.

La DMI varía entre las personas dependiendo de su estado general de salud y de la forma como se ingieren las bacterias (en ciertas condiciones las DMI pueden ser muy baja por lo que es muy necesaria la higiene).

En general las enfermedades tienen un tiempo de incubación corto (2-10 h.) y suelen cursar con síndromes gastrointestinales

6.2.2 Morbilidad:

Solo se declara un 10 % de las toxiinfecciones (aprox.) por lo que la incidencia real de estas enfermedades no está clara.

6.3 INFECCIONES ALIMENTARIAS TRANSMITIDAS POR BACTERIAS.

(www.unavarra.es)

6.3.1 Salmonelosis:

- Producidas por algunos serotipos. Su incidencia va en aumento asociada al incremento de animales portadores.
- El origen de las salmonellas puede ser endógeno (animales portadores asintomáticos) o exógeno; las prácticas ganaderas favorecen la infección a través de los piensos que pueden generar portadores asintomáticos y del manejo de los animales en el matadero (aves, cerdos, terneros).
- En cualquier caso, los números iniciales suele ser pequeños y la contaminación aparece si el alimento no es tratado correctamente desde el punto de vista térmico.

- Las medidas profilácticas se dirigen al control de animales portadores, procesamiento de alimentos (pasteurización) y reducción de las posibilidades de contaminación exógena. Puede ser invasiva o toxigénica.

6.3.2 Gastroenteritis por Escherichia Coli Enteropatógeno:

- La mayoría de los serotipos de E. Coli son inocuos; pero hay algunos Enteropatógenos (Enterotoxigénicos no invasivos productores de una Enterotoxina termolábil de alto peso molecular, TS; y Enteroinvasivos que penetran en la mucosa intestinal) productores de enfermedades en niños, adultos y animales.
- Para los adultos las vías de contagio son alimentos y agua.
- No está clara la patogenia de las cepas Enteropatógenas de animales para el hombre y se supone que la principal vía de contaminación es la exógena.
- Las medidas profilácticas se dirigen a la eliminación de animales enfermos, control de la contaminación por manipulación humana y refrigeración adecuada para evitar el crecimiento de las bacterias presentes.

6.3.3 Enteritis producidas por Bacillaceae:

- Producidas por Clostridium Perfringens o por Bacillus Cereus. Se requieren altos números de bacterias (10^5 bact gr⁻¹) y pueden producirse en alimentos tratados térmicamente e, incluso, protegidos frente a la recontaminación.

- En *C. Perfringens* los alimentos vehículo son carnes frías o recalentadas y platos a base de carne; en *B. Cereus* arroz y pastas.
- Las esporas de *C. Perfringens* son ubicuas y pueden producir problemas en todo tipo de alimentos, sobre todo carnes, piezas grandes y alimentos precocinados.
- La prevención pasa por enfriar rápidamente el alimento cocinado que no vaya a ser consumido para evitar el desarrollo de las formas vegetativas de la bacteria.

6.3.4 Intoxicación por *Bacillus cereus*.

- *Bacillus Cereus* como *Clostridium Perfringens* una bacteria ubicua y su ingestión en bajas cantidades es inocua.
- Produce dos tipos de síndromes: intoxicación diarreica (asociada a una toxina termo sensible similar a la de *C. Perfringens* que se produce durante el crecimiento exponencial y que está asociada a alimentos como sopas de ave, carne, salsas, pudding...) y una forma emética (asociada a una toxina termo resistente similar a la de *S. Aureus* y asociada a arroz, y otros alimentos ricos en almidón cocinados).
- Profilaxis: dada la termo rresistencia de las esporas hay que procurar enfriar muy rápidamente los alimentos cocinados ricos en almidón, y conservarlos a baja temperatura, para evitar el crecimiento de las formas vegetativas.

6.4 INTOXICACIONES ALIMENTARIAS CRÓNICAS:

- Micotoxicosis provocadas por mohos productores de toxinas activas por vía oral.
- Muchos mohos son productores de sustancias proteicas de bajo peso molecular y acción tóxica conocidas como micotoxinas. Elevadas ingestiones de micotoxinas pueden producir cuadros agudos fácilmente detectables; pero estos casos son raros, es más frecuente la intoxicación por bajas dosis de micotoxinas que pueden producir intoxicaciones crónicas con efectos oncogénicos o inhabilitación en diferentes órganos (hígado, riñón, cerebro).
- Las micotoxinas pueden ingerirse por contaminación con mohos de alimentos de baja actividad de agua (queso, mermelada, alimentos curados, cereales) o por piensos, en el caso de animales con intoxicaciones crónicas pueden transmitir las toxinas a través de sus productos (huevos, leche).
- Las profilaxis se centran en evitar la contaminación por hongos de los alimentos y piensos (quesos, pan, harinas, cereales, frutas y mermeladas) no solo por razones estéticas sino también sanitarias.

6.5 PARÁMETROS QUE INFLUYEN EL DESARROLLO DE MICROORGANISMOS. (Hernández-García J. J. (2006).)

Es importante prevenir o detectar la presencia de microorganismos en los alimentos, toda vez que pueden causar intoxicaciones e infecciones alimentarias que en algunas ocasiones puedan ser graves y aun mortales.

Existen ciertas normas que establecen un número máximo permisible de microorganismos que pueden estar presentes en el producto, este hecho da más confianza al consumidor, además de promover una vida de anaquel más larga para el mismo.

Las bacterias no pueden desarrollarse ni sobrevenir en los alimentos si no encuentran las condiciones adecuadas. Algunos de los factores que influyen su desarrollo son:

a) Parámetros Intrínsecos: El Potencial de Hidrógeno (pH), la actividad del agua (A_w) en el alimento, potencial de óxido-reducción, contenido de sustancias inhibitoras, composición de alimentos, fuente de carbono (carbohidratos), de nitrógeno (proteína, peptonas, tristonas, proteasas) y de energía (sales minerales).

b) Parámetros Extrínsecos: temperatura de almacenamiento, humedad relativa del medio ambiente, presencia o ausencia de gases tales como bióxido de carbono.

6.5.1 Temperatura

En función de la temperatura a la cual se desarrollan las bacterias, estas se clasifican como lo muestra la Tabla 1.

Tabla 1. Intervalos de Crecimiento de las Bacterias.

| OPTIMAS | INTERVALOS DE CRECIMIENTO (°C) | TEMPERATURA PROMEDIO (°C) |
|------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Psicrófilas | 5 - 10 | 7 |
| Termófilias | 35 -58 | 55 |
| Mesófilas | 15 -40 | 37 |
| Termoresistentes | Hasta 80 | ----- |

6.5.2 PH

Es importante para mantener la presión osmótica y para conservar la integridad de los sistemas nutritivos. La mayoría de los microorganismos, crecen a un pH neutro (6.8 -7.2) aunque hay algunos que necesitan pH ácidos (por ejemplo: los hongos).

6.5.3 Potencial de Oxido Reducción

De acuerdo a la necesidad de oxígeno presente para el desarrollo de las bacterias, estas se pueden clasificar en función de cómo crecen:

- Aerobias: En presencia de oxígeno.
- Anaerobias: En ausencia de oxígeno.
- Microaerofílicas: En presencia de pequeñas cantidades de oxígeno.
- Facultativas. Indistintamente.

6.5.4 Humedad Relativa (HR)

Todas las bacterias necesitan de una cantidad de HR para que su desarrollo sea favorable. La mayoría de las bacterias necesitan un 99%, en tanto que los hongos pueden crecer en medio que contenga hasta un 85% de HR

La posibilidad de hacer determinaciones rápidas y precisas de la cantidad de microorganismos en la materia prima y en el equipo utilizado. La mayor parte de estas determinaciones se basa en la capacidad que tienen los microorganismos para formar colonias en un medio de cultivo adecuado. Para garantizar en lo posible que un alimento se encuentre libre de microorganismos patógenos y sus toxinas, es necesario investigar la presencia de microorganismos comúnmente llamados “indicadores”, como

son los organismos Coliformes y Mesofílicos aerobios. Esta última determinación refleja las condiciones de manipulación, el estado de alteración, el grado de frescura, en general, la calidad sanitaria de alimentos.

La determinación de Coliformes da una idea de la contaminación fecal, provocada por una calidad pobre de agua utilizada durante el proceso, y/o de descuidos en la sanidad del personal que trabaja directamente con el producto así como una mala conservación del mismo. (Hernández-García J. J. (2006).)

6.6 FUENTES DE CONTAMINACIÓN EN AGUA.

6.6.1 Análisis de Agua

El agua es una “materia prima” extensamente usada por la industria alimentaria. La aplicación principal en la industria es:

1. Limpieza de los equipos.

2. Limpieza de la materia prima. Durante jornadas de cosecha larga algunas personas desarrollan hábitos de golpear, presionar y frotar el producto. Otras se cansan y comienzan a lanzar o a dejar caer el producto en los receptáculos. Tales prácticas pueden ocasionar un daño irreversible, causando alguna contaminación por contacto a superficie, y pueden controlarse vigilando el trabajo y proporcionando buenas condiciones de trabajo.

Los productos que no se van a comercializar no deben dejarse en el terreno, donde se van a pudrir y a contaminar los cultivos sanos. La recolección rutinaria de los desperdicios es un aspecto importante de la operación de

cosecha y todos los trabajadores deben contribuir a ella. La limpieza, esterilización o reemplazo de los recipientes de recolección debe realizarse regularmente con el fin de prevenir que se desarrollen las infecciones. La higiene del personal de campo es un punto igualmente vital si se desean evitar los peligros de contaminación bacteriana de los productos recolectados a mano. (Hernández-García J. J. (2006).)

3. Dilución de las materias primas concentradas en polvo.

La utilización de agua contaminada, puede representar un peligro para la salud pública. Las bacterias encontradas en el agua se dividen en:

a) Bacterias del agua natural.

1. Fluorescente: *Pseudomonas*.

2. Cromógenas: *Chromobacterium*.

3. No cromógenas: *Achromobacter*.

4. Cocos: *Micrococcus* y *Sarcina*.

b) Bacterias que no habitan en el agua (por contaminación del agua con la tierra)

1. *Bacillus: Subtilis, Megaterium, Mycoides*.

2. *Streptomyces*

3. *Enterobacter aerogenes* y *A. cloacae*

c) Bacterias de Aguas Negras.

1. Bacterias intestinales: *Escherichia coli*, *Streptococcus fecalis*, *Clostridium welchii*, *Salmonella* y *Vibrio*.
2. Bacterias Propias de las aguas negras: *Proteus vulgaris* y *Clostridium sporogenes*.

6.6.2 Factores que Determinan el Tipo y Numero de Bacterias en el Agua

6.6.2.1 Tipo de agua.

1. Aguas de Superficie. Se encuentra a nivel superficial de la tierra, esta agua están contaminadas por desechos industriales o materia orgánica descompuesta.
2. Aguas Profundas. Generalmente son puras, toda vez que la mayor parte de los contaminantes de la superficie se han eliminado al filtrarse el agua por las capas de la tierra.

Cantidad de Nutrientes Disponibles en el Agua. Cuando las materias orgánicas abundan se desarrollan rápidamente las bacterias.

Temperatura. Un aumento de temperatura en agua rica en nutrientes provoca multiplicación rápida de las bacterias, las temperaturas muy bajas propician la sobrevivencia de los microorganismos aunque no la multiplicación. (Hernández-García J. J. (2006).)

Existen normas que establecen un número máximo permisible de microorganismos que pueden estar presentes en el producto, este hecho da más confianza al consumidor (NOM-093-SSA1-1994).

Algunas normas aplicables al Análisis de Control de Calidad Sanitario son:

- ▶ **NOM-109-SSA1-1994.-** Procedimientos para la toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
- ▶ **NOM-110-SSA1-1994.-**Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- ▶ **NOM-112-SSA1-1994.**Determinación de la presencia en alimentos de Coliformes totales.
- ▶ **NMX-F-308-1992.**Identificación en alimentos de Coliformes fecales.
- ▶ **NOM-111-SSA1-1994.** Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. (www.economia-noms.gob.mx)

6.7 COLIFORMES TOTALES Y FECALES.

La definición generalmente aceptada para el término “Coliformes” describe a estos microorganismos como bacilos (0,5 μm por 3 μm), Gram-negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas en un lapso máximo de 48 h. a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, aunque algunos pueden ser fermentadores tardíos o no fermentadores, como *Citrobacter* y *Serratia*, respectivamente.

La mayoría de los Coliformes pueden encontrarse en la flora normal del tracto digestivo del hombre o animales, por lo cual son expulsados

especialmente en las heces, por ejemplo *Escherichia Coli*. Por esta razón, su presencia constante en la materia fecal, los Coliformes son el grupo más ampliamente utilizado en la microbiología de alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas. Como los Coliformes también pueden vivir en otros ambientes, se distingue entre Coliformes totales y Coliformes fecales.

6.7.1 El uso de los Coliformes como indicador sanitario puede aplicarse para:

- La detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos.
- La evaluación de la calidad microbiológica de un producto, aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario, cuando los Coliformes son de origen no-fecal.
- Evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas en el equipo.
- La calidad sanitaria del hielo y los distintos tipos de agua utilizados en las diferentes áreas del procesamiento de alimentos. La demostración y la cuenta de microorganismos Coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivos líquidos o sólidos con características selectivas o diferenciales. Para la cuenta en placa se usa el agar-lactosa-bilis-rojo violeta (ABRV).

Tabla No 2. Clasificación de los Coliformes

| | | |
|---------------------------------|---------------------|------------------------------|
| Clasificación de los Coliformes | | |
| Familia de las Enterobacterias | | |
| No-Coliformes | Coliformes | |
| <i>Shigella</i> | Totales | Fecales |
| <i>Yersinia</i> | <i>Escherichia</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>Vibrio</i> | <i>Citrobacter</i> | <i>Citrobacter freundil</i> |
| <i>Salmonella</i> | <i>Krebsiella</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>Serratia</i> | <i>Enterobacter</i> | |
| <i>Proteus</i> | | |

6.7.2 Géneros de Coliformes.

Este grupo está conformado por 4 géneros principalmente: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Klebsiella*. El grupo de Coliformes fecales, está constituido por bacterias Gram-negativas capaces de fermentar la lactosa con producción de gas a las 48 h. de incubación a $44.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$. Este grupo no incluye una especie determinada, sin embargo la más prominente es *Escherichia coli*. La demostración y el recuento de organismos Coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivo líquidos y sólidos con características selectivas y diferenciales.

Escherichia Coli un bacilo corto Gram-negativo que se encuentra clasificado dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (bacterias entéricas), existe como comensal en el intestino delgado de humanos y animales. Sin embargo, hay algunas cepas de *E. Coli* patógenas que provocan enfermedades diarreicas. Estas *E. Coli* se clasifican con base en las características que presentan sus factores de virulencia únicos, cada grupo provoca la enfermedad por un mecanismo diferente. Las propiedades de adherencia a las células epiteliales

de los intestinos grueso y delgado son codificadas por genes situados en plásmidos. De manera similar las toxinas son mediadas por plásmidos o fagos.

Este grupo de bacterias se encuentra constituido por las siguientes cepas:

- *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)
- *E. coli* enteropatógena (EPEC)
- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)
- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)
- *E. coli* enteroagregativa (EAEC)
- *E. coli* enteroadherente difusa (DAEC)

Existen otras cepas que no han sido perfectamente caracterizadas; de las cepas anteriores, las 4 primeras están implicadas en intoxicaciones causadas por el consumo de agua y alimentos contaminados.

- *Escherichia coli* enterotoxigénica ETECes reconocida como el agente causal de la diarrea del viajero, la cual se caracteriza por diarreas acuosas con o sin fiebre. Este tipo de infecciones es muy frecuente en países subdesarrollados y afecta principalmente a los niños.

Patogénesis: El microorganismo es capaz de producir dos tipos de toxina. Una toxina termolábil de aproximadamente 89 kDa cuya secuencia, antigenicidad y función es similar a la toxina del cólera, la otra toxina que produce es termoestable y es de bajo peso molecular (4 kDa) y es capaz de resistir temperaturas de ebullición hasta por 30 minutos.

La infección puede ser adquirida por el consumo de alimentos como vegetales frescos (lechuga en ensaladas) y agua. La dosis infectiva para adultos ha sido calculada en aproximadamente 10⁸ bacterias, por otra parte en jóvenes y ancianos la dosis infectiva puede ser más baja.

- *Escherichia coli* Enteropatógena ECEP. Es causa importante de diarrea en los lactantes particularmente en los países en vías de desarrollo. La ECEP se adhiere a las células de la mucosa del intestino delgado. Sus factores de virulencia favorecen la adhesión y en ocasiones penetra a las células mucosas. La infección por ECEP provoca diarrea acuosa generalmente auto limitada aunque en ocasiones puede ser crónica.

Patogénesis. El microorganismo produce dos proteínas: la intimina que es codificada por el gen EAE y un factor de adherencia que es codificado por un plásmido, ambas proteínas permite su unión a los enterocitos y la destrucción de las micro vellosidades intestinales.

Las epidemias causadas por este microorganismo se deben al consumo de agua contaminada y productos cárnicos. En estudios con voluntarios se encontró que la dosis infectiva es de 10⁶ microorganismos. La diarrea por ECEP se ha vinculado con múltiples serotipos específicos de *E. coli* los cuales pueden ser identificados mediante la tipificación del antígeno O (somático) y en ocasiones del antígeno H (flagelar).

- *Escherichia coli* entero invasiva EIEC. Este microorganismo se encuentra estrechamente relacionado con el género *Shigella*, produce una enfermedad similar a la shigelosis. La enfermedad se presenta comúnmente en niños de países subdesarrollados y en personas que

viajan a dichos lugares. La EIEC provoca la enfermedad (diarrea disentérica invasiva) al invadir las células epiteliales de la mucosa intestinal.

A pesar de que la dosis infectiva para *Shigella* es de 10 a 100 microorganismos, en el caso de EIEC la dosis infectiva es de aproximadamente 10^6 bacterias. Algunas características importantes de este microorganismo que permiten diferenciarlo de la cepa típica de *E. coli* son: No utiliza la lactosa como fuente de Carbono, no descarboxilan la lisina, es inmóvil y anaerogenicos.

La patogenicidad de este organismo se debe a su capacidad para invadir y destruir el epitelio del colon debido a que es capaz de evadir la lisis en los fagolisosomas.

- *Escherichia coli* Entero hemorrágica EHEC produce verotoxina, denominada así por su efecto cito tóxico sobre las células Vero, una línea de células renales de Mono verde africano. Existen al menos dos variantes antigénicas de la toxina. La ECEH se ha asociado con colitis hemorrágica, una variedad grave de diarrea; y con el síndrome urémico hemolítico, enfermedad capaz de producir insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia. La verotoxina tiene muchas propiedades similares a la toxina Shiga producida por algunas cepas de *Shigella dysenteriae* tipo 1.

La causa más común de esta infección es el consumo de carne sin cocinar o poco cocinada, particularmente carne picada procesada en grandes cantidades. Los casos de colitis hemorrágica y sus complicaciones asociadas pueden prevenirse mediante la cocción completa de la carne.

En la siguiente tabla se resumen algunas propiedades y síntomas causados por las cepas de *Escherichia coli* antes descritas.

Tabla No 3. Propiedades y síntomas causados por algunas cepas de *Escherichia coli* patógenas.

| Propiedades y síntomas causados por algunas cepas de <i>Escherichia coli</i> patógenas | | | | |
|--|-------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | ETEC | EPEC | EHEC | EIEC |
| Toxina | Lábil/ estable | - | Shiga o vero | - |
| Invasiva | - | - | - | + |
| Intiminas | - | + | + | - |
| Enterohemolisina | - | - | + | - |
| Aspectos de las heces | Aguadas | Aguadas sanguinolentas | Aguadas muy sanguinolentas | Mucoides y sanguinolentas |
| Presencia de leucocitos en heces | - | - | - | + |
| Fiebre | Baja | + | - | + |
| Intestino involucrado | Delgado | Delgado | Colon | Colon y parte baja del delgado |
| Dosis infectiva | Alta | Alta | Baja | Alta |

6.8 COLIFORMES FECALES Y *ESCHERICHIA COLI*

Los Coliformes fecales y *Escherichia coli* en particular, se han seleccionado como indicador de contaminación fecal debido a su relación con el grupo tifoidea, paratifoidea y a su alta concentración en diferentes tipos de muestra.

Los Coliformes fecales son un subgrupo de Coliformes totales, capaz de fermentar la lactosa a 44.5C.

Aproximadamente el 95% del grupo de los Coliformes presentes en las heces fecales están formados por *Escherichia coli* y ciertas especies de *Klebsiella*. Ya que los Coliformes fecales se encuentran casi exclusivamente en las heces de animales de sangre caliente se consideran que refleja mejor la presencia de contaminación fecal.

Los Coliformes para ser utilizados como indicadores deben poseer las siguientes propiedades.

1. especificidad: solo se deben encontrar en el medio intestinal.
2. se hallaran en grandes cantidades de tal manera que puedan ser detectadas en altas diluciones.
3. ser muy resistentes a las condiciones ambientales, extra intestinales.
4. aunque se encuentren en una baja proporción puedan ser detectadas de forma fácil y completa.
5. su tiempo de supervivencia debe ser igual o un poco superior al de las bacterias patógenas.
6. debe ser fácil de aislar y cuantificar.
7. no debe ser patógeno.

6.8.1 Condiciones fisiologicas para su crecimiento.

Estos microorganismos crecen a 20°C y tambien a temperatura proximas a 50°C el crecimiento en los alimentos es pobre a temperatura de 5°C aunque ciertos autores afirman que los coliformes crecen entre 3-6°C, con respecto al pH se ha señalado que crecen dentro de un amplio margen; con valores comprendidos entre 4.4 a 9.

A diferencia de la mayoria de las bacterias, fermentan la lactosa con produccion de gas y estas caracteristicas son suficientes para efectuar determinadas presuntivas de coliformes.

La incorporacion a los medios de cultivos de lactosa y sales biliares como Mac Conkey. Hace posible la diferenciacion entre estos organismos y otros muchos que pueden encontrarse en los alimentos.

6.8.2 Enfermedades transmitidas por contaminación fecal.

Las enfermedades infecciosas se transmiten principalmente a través de las excretas de los seres humanos y animales en particular de las heces.

Si existen casos activos o portadores en la comunidad, la contaminación fecal de las fuentes de alimentos hará que los organismos causantes estén presentes en esta.

6.9 HONGOS Y LEVADURAS.

Los hongos y las levaduras se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, pueden encontrarse como flora normal de un alimento, o como contaminantes en equipos mal sanitizados. Ciertas especies de hongos y levaduras son útiles en la elaboración de algunos alimentos, sin embargo también pueden ser causantes de la descomposición de otros alimentos. Debido a su crecimiento lento y a su baja competitividad, los hongos y levaduras se manifiestan en los alimentos donde el crecimiento bacteriano es menos favorable. Estas condiciones pueden ser bajos niveles de pH, baja humedad, alto contenido en sales o carbohidratos, baja temperatura de almacenamiento, la presencia de antibióticos, o la exposición del alimento a la irradiación. Por lo tanto pueden ser un problema potencial en alimentos lácteos fermentados, frutas, bebidas de frutas, especias, oleaginosas, granos, cereales y sus derivados y alimentos de humedad intermedia como las mermeladas, cajetas, especias, etc. (Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez. 2009)

Los hongos y levaduras pueden utilizar ciertos sustratos como pectinas, carbohidratos como polisacáridos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos. También pueden causar problemas a través de: (a) síntesis de metabolitos tóxicos (micotoxinas), (b) resistencia al calor, congelamiento, antibióticos o irradiación y (c) habilidad para alterar sustratos no favorables permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas. Pueden también causar malos olores y sabores y la decoloración de las superficies de alimentos.

El término *mohose* suele aplicar para designar a ciertos hongos filamentosos multicelulares cuyo crecimiento en la superficie de los alimentos se suele

reconocer fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso, a veces pigmentado.

Generalmente todo alimento enmohecido se considera no apto para el consumo. La identificación y clasificación de los mohos se basa en observaciones macroscópicas y microscópicas.

6.9.1 Propiedades fisiológicas.

En comparación con la mayoría de las levaduras y de las bacterias, la mayoría de los mohos necesitan menor cantidad de humedad disponible. Un porcentaje total de humedad por debajo del 14 al 15 por ciento en la harina o en algunos frutos secos impedirá o retardará mucho el crecimiento de los mohos. Los mohos podrían considerarse mesófilos, es decir, que son capaces de crecer bien a temperaturas normales. La temperatura óptima de la mayoría se encuentra alrededor de los 25 a 30°C, aunque algunos son psicrótrofos y algunos son termófilos. Son aerobios, esto es cierto por lo menos en los mohos que crecen en la superficie de los alimentos. Casi todos los mohos son capaces de crecer dentro de un amplio intervalo de pH (pH comprendido entre 2 y 8.5), aunque la mayoría crece mejor a pH ácido. Son capaces de utilizar muchos tipos de alimentos, que van desde sencillos a complejos. Poseen enzimas hidrolíticas, y de aquí que algunos se utilicen para la producción industrial de las amilasas, pectinasas, proteasas y lipasas.

6.9.2 Algunos géneros de *mohos* importantes en alimentos.

Mucor. Intervienen en la alteración de algunos alimentos y se utilizan en la fabricación de otros. *M. rouxii* se utiliza para la sacarificación del almidón, para la maduración de quesos y para la fabricación de algunos alimentos orientales. (Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez. 2009)

Rhizopus. La especie *R. stolonifer*, o moho del pan, es muy común e interviene en la alteración de algunos alimentos: bayas, frutas, hortalizas, pan, etc.

Aspergillus. Los aspergilos son mohos muy abundantes. Algunas especies intervienen en las alteraciones que experimentan los alimentos, mientras que otros son de utilidad para preparar determinados alimentos. *A. niger* se utiliza para la producción industrial de ácido cítrico y glucónico y de algunas enzimas.

Penicillium. Es otro género de mohos de frecuente incidencia y de importancia en los alimentos, *P. expansum* produce la podredumbre blanda de las frutas; *P. digitatum* y *P. italicum* producen la podredumbre de frutas cítricas. Las especies *P. camemberti*, *P. roqueforti* se utilizan en la maduración de quesos. Se han reportado más de 80 especies de *Penicillium* como productores de micotoxinas.

Estas micotoxinas pueden dividirse en dos grupos: las que afectan la función hepática o renal, y las neurotoxinas. Las principales micotoxinas producidas por *Penicillium* son, ocratoxina A, citrinina, patulina, ácido ciclopiazónico, citreoviridina, penitremo A, toxina PR y roquefortina y el ácido secalónico.

6.9.3 Levaduras y hongos levaduriformes.

El término levadura se refiere a aquellos hongos que generalmente no son filamentosos, sino unicelulares y de forma ovoide o esferoide, y que se reproducen por gemación o por fisión. Las levaduras que se encuentran en los alimentos pueden ser benéficas o perjudiciales.

Las levaduras se utilizan en la elaboración de alimentos como el pan, la cerveza, vinos, vinagre y quesos, también se utilizan en la obtención de enzimas y alimentos fermentados. Las levaduras son perjudiciales cuando producen la alteración de los zumos de frutas, de los jarabes, de la melaza, de la miel, de las carnes, del vino, de la cerveza y de otros alimentos.

Los caracteres morfológicos de las levaduras se determinan mediante su observación microscópica. Su forma puede ser desde esférica a ovoide, alimonada, piriforme, cilíndrica, triangular e incluso alargada. La mayoría se reproducen asexualmente por gemación multicelular o por gemación polar.

Unas pocas especies se reproducen por fisión.

En los cultivos en placas de agar es difícil diferenciar las colonias de levaduras de las colonias bacterianas; la observación microscópica de los microorganismos es la única forma segura de diferenciarlas. La mayoría de las colonias jóvenes de levaduras son húmedas y algo mucosas; la mayoría de las colonias son blancuzcas, aunque algunas tienen un color crema o rosado. Son oxidativas, fermentativas, o bien su actividad metabólica es a la vez de ambos tipos. La mayoría de las levaduras crecen mejor con un alto contenido de humedad. No obstante, crecen mejor que la mayoría de las bacterias en sustratos que contienen elevadas concentraciones de solutos (por ejemplo carbohidratos o cloruro de sodio), es decir son osmotolerantes. Sin embargo la mayoría de las levaduras necesitan mayor humedad que los mohos. Para la mayoría de las levaduras la A_w mínima de crecimiento oscila entre 0.88 y 0.94. El intervalo de temperaturas de crecimiento es parecido al de los mohos, con una temperatura óptima en torno a los 25 a 30°C y una temperatura máxima en torno a los 35 a 47°C. Crecen mejor en aerobiosis, aunque las especies de tipo fermentativo son capaces de crecer, aunque lentamente, en anaerobiosis. Los azúcares son la fuente energética más

apropiada para las levaduras, aunque las oxidativas, pueden oxidar los ácidos orgánicos y el alcohol.

6.9.4 Algunos géneros de importancia en alimentos son:

Schizosaccharomyces. Levaduras de este género se han encontrado en frutas tropicales, en la melaza y en la miel.

Saccharomyces. La especie *S. cerevisiae* se emplea en la industria alimentaria, como en la fermentación del pan, fermentación de la cerveza, fermentación de los vinos, en la producción de alcohol, glicerol e invertasa.

Kluyveromyces. *K. marxianus* (antes *Saccharomyces fragilis*) se utiliza en la obtención de productos lácteos por su capacidad de fermentar la lactosa.

Zygosaccharomyces. Las levaduras de este género son importantes por su capacidad para crecer en medios con elevadas concentraciones de azúcar (osmófilas), intervienen en la alteración de la miel, jarabes y melazas, y también en la fermentación de la salsa de soya y de algunos vinos.

Pichia. Crecen en la superficie de los líquidos formando una película. *P. membranifaciens* produce una película en la superficie de las cervezas y vinos.

Debaromyces. Forman película en la superficie de las salmueras. *D. kloeckeri* crece en la superficie de los quesos y de los embutidos.

La Norma Oficial Mexicana utiliza únicamente el agar papa dextrosa para la detección y cuantificación de estos grupos de microorganismos. Sin embargo se sugiere para la cuantificación de las levaduras, la utilización del agar

extracto de malta acidificado ya que es un medio más rico en nutrientes y adecuado para el desarrollo de este grupo microbiano. (Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez. 2009)

6.10 MÉTODOS RÁPIDOS PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS.

Se define como “método rápido” a cualquier método destinado a la detección, el recuento, la caracterización y la subtipificación de microorganismos (patógenos y del deterioro) mediante el cual se obtienen resultados de manera sencilla, fiable y en menor tiempo que con los métodos convencionales. El desarrollo de métodos rápidos y automatizados constituye un área de la microbiología aplicada muy dinámica y en continua evolución. En las últimas cuatro décadas hubo numerosos avances en el desarrollo de métodos rápidos y desde hace 15 años este campo cobró gran importancia en investigación y en la industria alimentaria.

Los métodos rápidos se basan en técnicas físico-químicas (películas de medios de cultivos deshidratados generales o selectivos, sistemas para determinar el número más probable, medios cromogénicos y fluorogénicos), bioquímicas (galerías miniaturizadas y automatizadas), inmunológicas (precipitación, aglutinación, inmunofluorescencia, citometría, radioinmunoensayo, enzimoimmunoensayo, inmunocromatografía, nefelometría, inmunomicroscopía) y moleculares (hibridación, PCR de punto final, PCR en tiempo real, ribotipificación, microarrays, biochips).

Desde la década de los 70'S, el desarrollo y la implementación de los métodos rápidos para la identificación de microorganismos evolucionaron en paralelo con los adelantos en otras áreas de la investigación científica, en

particular con la generalización del uso de galerías de pruebas bioquímicas miniaturizadas. (GERARDO A. LEOTTA, 2009)

A partir de la década de los 80'S, el avance en la producción de anticuerpos monoclonales hizo posible el desarrollo de pruebas inmunológicas de identificación, como el ELISA o la inmunocromatografía. En 1990, con el advenimiento de las técnicas de biología molecular comenzaron a utilizarse técnicas como la PCR, tanto para tamizaje como para la identificación de microorganismos y sus factores de virulencia.

El crecimiento exponencial de los métodos rápidos aplicados a la microbiología de los alimentos puede evidenciarse en la gran cantidad de equipos comerciales que se ofrecen en la actualidad con el objetivo de tener resultados rápidos, en tiempo real, exactos y de bajo costo. Por ejemplo, como consecuencia de la automatización, el estudio de genotipos bacterianos pasó de ser un proceso tedioso y lento a un método práctico que se puede aplicar en los ensayos microbiológicos cotidianos.

Los factores que justifican la utilización de métodos rápidos e impulsan su desarrollo son numerosos, entre ellos se pueden mencionar las presiones regulatorias, las modernas prácticas de producción y la complejidad analítica. Para hacer frente a las presiones regulatorias, la industria alimentaria debe utilizar métodos oficiales de referencia, como los recomendados por la ISO (International Standards Organization) y AOAC (International Association of Official Analytical Chemists), entre otras. Actualmente, algunos métodos rápidos son recomendados como técnicas de tamizaje por agencias regulatorias internacionales (6). En consecuencia, la oferta de métodos rápidos es cuantiosa. Sin embargo, se debe considerar que antes de la adopción de nuevos métodos por parte de la industria, estos deben tener

constancia del proceso de estandarización y validación ante entidades internacionales, o bien en instancias inter e intralaboratorio.

Algunos métodos para la detección de patógenos evolucionaron desde los análisis estándar realizados en el laboratorio, hacia análisis efectuados en tiempo real en la línea de producción. Esta tendencia hacia las pruebas en tiempo real, que surgió debido a la necesidad de ofrecer información de utilidad durante la operación de producción de alimentos, se trata de un esfuerzo para superar en parte las deficiencias de los métodos convencionales cuyos resultados no se pueden utilizar para controlar el proceso in situ. En el presente, la industria de alimentos basa la seguridad y calidad de sus productos en pruebas o medidas fuera de la línea de producción. Sin embargo, las nuevas tendencias hacen cada vez más necesaria la implementación de un sistema de medición continua y en tiempo real, que haga posible la intervención in-line u on-line. Las medidas de intervención in-line son aquellas que se efectúan directamente en la línea del proceso y las medidas de intervención on-line son aquellas que pueden efectuarse en un asa by-pass de la línea principal del proceso y que luego de la medida se retorna a la línea principal.

En la mayoría de instituciones e industrias que se familiarizan con más frecuencia con análisis microbianos, es importante mencionar algunos puntos importantes en métodos rápidos. (GERARDO A. LEOTTA, 2009)

- Contaminación microbiana: principales problemas de alimentos asociados al consumo.
- Las toxiinfecciones alimentarias conllevan un elevado impacto económico (patógenos)
- Las alteraciones de alimentos también preocupan a las industrias alimentaria (indicadores de calidad)
- Sistemas APPCC es la herramienta de seguridad alimentaria más reconocida
- Requiere de un gran número de análisis y obtención rápida de resultados

Ventajas:

- Métodos cada vez más rápidos (industrias, laboratorios)
- Métodos sencillos
- Métodos fiables
- Métodos reconocidos
- Métodos trazables
- Métodos sensibles
- Métodos económicos

- Disminuyen uno o varios días frente a los protocolos tradicionales
Métodos automatizados.

- Utilización de un equipo que realiza una o varias tareas que habitualmente realiza un técnico. (VIGO, 2011)

6.11 TIPOS DE MATERIAL EN MÉTODOS RÁPIDOS MICROBIOLÓGICOS.

6.11.1 PLACAS PETRIFILM.

Método microbiológico que consiste en una familia de placas listas para usarse diseñadas para ofrecer ahorro de tiempo, incremento de productividad, fiabilidad y eficiencia. Su diseño tiene una película rehidratable cubierta con nutrientes y agentes gelificantes. Proporciona resultados en tres pasos: inoculación, incubación y recuento. Las placas petrifilm están disponibles para la mayoría de las necesidades de pruebas microbiológicas incluyendo: recuento de aerobios, recuento de Coliformes, recuento de e. coli/coliformes, recuento de Enterobacterias, recuento de alta sensibilidad de Coliformes, recuento rápido de coliformes, recuento de Staphylococcus Aureus, recuento de mohos y levaduras y listeria en ambientes. (NORE LINA & SANCHES JEIMY, 2008)

6.11.2 PLACA PETRIFILM PARA EL RECUESTO DE COLIFORMES. (Coliform count, cc)

Contienen nutrientes de bilis rojo-violeta, (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, y un indicador tetrazolium, que facilita el recuento de las colonias. La película superior atrapa el gas producido por los Coliformes fermentadores de lactosa.

La AOAC internacional y el manual de análisis bacteriológico (BAM) de la FDA de los estados unidos definen los Coliformes como colonias de bastoncillos Gram negativos que producen ácido y durante la fermentación metabólica de la lactosa. Las colonias de Coliformes crecen en la placa de PETRIFILM CC y producen un ácido que causa el oscurecimiento del gel por el indicador de pH. El gas atrapado alrededor de las colonias rojas de Coliformes confirma su presencia. (NORE LINA & SANCHES JEIMY, 2008)

6.11.3 PLACA PETRIFILM PARA EL RECUESTO DE COLIFORMES.

La placa PETRIFILM de recuento rápido de Coliformes es un medio de cultivo listo para usar que contiene nutrientes bilis rojo violeta con lactosa (VRBL), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de pH para la detección de ácidos y un indicador de tetrazolio que facilita el recuento de las colonias. Los primeros resultados de Coliformes pueden empezar a aparecer en tan solo seis horas de incubación y se manifiestan como zonas acidas amarillas discretas con o sin colonias. El recuento total de Coliformes se determina a las 24 horas. (NORE LINA & SANCHES JEIMY, 2008)

6.11.4 PLACA PETRIFILM PARARECUESTO DE E. COLI / COLIFORMES.

La placa PETRIFILM para recuento de E. coli y Coliformes está compuesta por una lámina de papel con una cuadrícula impresa recubierta de polipropileno conteniendo nutrientes del medio VRBG, el indicador 5-bromo-4-cloro-indolil-beta-D-glucuronido (BCIG) y un agente gelificante soluble en agua fría (el área donde se desarrollaran os microorganismos está definida por una película intermedia de espuma). Se complementa en la parte

superior con otra lámina de polipropileno que contiene gel soluble en agua fría y tricloruro de trifenil tetrazolio (o TTC) como indicador.

La mayoría de las E. coli (cerca del 97%) produce beta-glucuronidasa, la que a su vez produce un precipitado azul asociado con la colonia. la película superior atrapa el gas producido por la lactosa que fermentan E. coli y Coliformes. cerca del 95 % de E. coli produce gas, representado por colonias entre azules y rojo -azules asociado al gas atrapado, mientras que los Coliformes son colonias rojas asociadas con burbujas de gas.

Estas placas se incuban por 24 horas a 35 c para cuantificar Coliformes y E. coli en carne, aves y mariscos y 48 horas a 35 c para cuantificar E. coli en lácteos. Las placas PETRIFILM para E. coli y Coliformes pueden ser usadas para la enumeración de estos organismos en alimentos diversos así como para el monitoreo ambiental y superficial en áreas de procesamiento y manipuladores. (NORE LINA & SANCHES JEIMY, 2008)

6.11.5 PLACA PETRIFILM PARA RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS.

La placa PETRIFILM de recuento de mohos y levaduras es un medio de cultivo listo para usar que contiene nutrientes enriquecidos con antibióticos, un gelificante soluble en agua fría y un indicador para proporcionar contraste facilitar el recuento. Las levaduras son colonias típicamente pequeñas, con relieve, de color verde azulado y con bordes delimitado. Los mohos son, a menudo, colonias planas más grandes, de diversos colores, con bordes no definidos y focos centrales.

Estas placas determinan la población de mohos y levaduras en un periodo de 3 a 5 días y necesitas una temperatura de incubación de 25 a 27 c pueden ser usadas para la enumeración de estos microorganismos en diversos

alimentos y materias primas así como para el monitoreo ambiental y superficial en reas de procesamiento. (NORE LINA & SANCHES JEIMY, 2008)

6.11.6 PLACA PETRIFILM PARA EL RECuento DE ENTEROBACTERIAS.

La placa PETRIFILM para el recuento de Enterobacterias, como nutrientes del medio VRBG modificado que facilita la enumeración de colonias, las cuales son indicadores de condiciones higiénicas después del procesamiento de alimentos. Un colorante indicador en la placa tiñe las colonias de rojo y la capa superior atrapa el gas producido por algunas bacterias. Las bacterias que producen gas y/o ácido se considera presuntivamente como Enterobacterias y al crecer en la placa presentan una de las siguientes características: 1) colonias asociadas a burbujas de gas y sin zonas ácidas, 2) colonias con zonas amarillas de ácido y sin producción de gas, 3) colonias que producen gas y ácido.

Las Enterobacterias son de gran importancia, ya que estos microorganismos están involucrados con la descomposición de alimentos, son indicadores de contaminación fecal y algunas de ellas son consideradas patógenas. Las placas PETRIFILM para recuento de Enterobacterias enumeran a todos los organismos Coliformes además de patógenos potenciales como salmonella, Shigella y Yersinia, entregando de esta manera un panorama más inclusivo de potencial contaminación. (NORE LINA & SANCHES JEIMY, 2008)

6.11.7 RIDA COUNT

Es una prueba de lámina con medio listas para usar, diseñadas para la detección cuantitativa de microorganismos en alimentos y ambientes que consisten en una película deshidratada de medios generales o selectivos en las cuales se depositan 1ml de muestra, la cual rehidrata el medio, posee una cubierta transparente que evita la contaminación indeseada. Este producto está diseñado para el recuento de Mesófilos aerobios, Coliformes totales, Enterobacterias, Staphylococcus aureus, E. coli, Salmonella y Hongos y Levaduras. (R-Biopharm, 2006)

6.11.7.1 RIDA COUNT PARA RECuento DE COLIFORMES TOTALES.

La base de la detección de Coliformes consiste en la hidrólisis del 5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-galactopiranosido o x-Gal por la enzima B-galactosidasa de las bacterias Coliformes y la producción de un color azul. Consiste en una lámina que contiene nutrientes del medio cultivo VRB (bilis rojo violeta) y un indicador cromógeno X-Gal para la detección de Coliformes totales. Necesitan 1 ml de muestra para la hidratación del medio. Estas placas se incuban por 24 horas a 35 c, para poder observar las colonias, las cuales aparecen de un color azul correspondientes a Coliformes o color verde indicando la presencia de Coliformes con alto metabolismo (producción de ácido) o baja actividad de enzima (células lesionadas). (R-Biopharm, 2006)

6.11.8 RIDA COUNT PARA RECuento DE ESCHERICHIA COLI.

La lámina Rida count para la enumeración de E. coli, consiste en una película de con medio VRBA deshidratado, contiene como indicador X-Glucoronido, el cual es degradado por E. coli que contiene esta capacidad debido a su enzima B-D-glucuronidasa. Estas placas se incuban por un

periodo de 24 a 48 horas a 35 c. las colonias de E. coli se observan de un color azul. (R-Biopharm, 2006).

6.11.9 RIDA COUNT PARA RECUESTO DE HONGOS Y LEVADURAS.

La lamina Rida count para la enumeración de mohos y levaduras consiste en una película que contiene nutrientes enriquecidos, YGC modificado y como agente indicador estearasa. Estas placas requieren de un periodo de incubación de 3 a 5 días a 25 c, para poder observar colonias azul verdosas, se diferencian por la morfología típica. (R-Biopharm, 2006).

6.11.10 MEDIOS CROMOGENICOS

Son medios diseñado a partir de sustratos cromógenos para la identificación de diferentes microorganismos en alimentos. Estos medios están fundamentados en la actividad enzimática sobre los sustratos, los cuales al ser degradados generan una coloración especial en la colonia. Actualmente se encuentran el mercado de diferentes medios disponibles como: chromocult merk, cromogenico oxid, coli ID de Biomeraux, BioPro Premium de 3M.

6.11.11 CHROMOCULT E.COLI/COLIFORMES MERK.

El agar chromocult es un medio de cultivo selectivo para la detección simultánea de Coliformes totales y Escherichia coli en agua potable y muestras alimentos procesados. El sustrato cromógeno contenido en chromocult da un color claramente distinguible a cada tipo de colonia separada, permitiendo una clara identificación y evitando así errores de recuento. (Merk, 2002).

En primera instancia, la interacción de las peptonas, piruvato, sorbitol y el buffer fosfato garantizan un crecimiento rápido de las colonias. El crecimiento de las bacterias Gram positivas así como el de algunas Gram negativas se ve inhibido por el contenido de tergitol 7, el cual no presenta efecto negativo sobre el crecimiento de las bacterias Coliformes.

Para la segunda etapa, Merk ha desarrollado una nueva combinación de dos sustratos cromogénicos que permiten la detección simultánea de Coliformes totales y *Escherichia coli*. El sustrato salmón GAL es empleado para la detección de Coliformes totales por la producción de β galactosidasa, las colonias se observan de color rojo Salmon. (Merk, 2002).

El sustrato X-Glucoronido es usado para la identificación de β -glucuronidasa, la cual es característica de *E. coli*, quien es capaz de transportar ambos sustratos, a fin de que sus colonias tomen un color de azul oscuro a violeta. Como parte de una confirmación adicional de *E. coli*, la inclusión del triptófano permite detectar la producción de Indol, lo que aumenta la fiabilidad de detección cuando se emplea la combinación de Salmon-GAL y X-Glucoronido. (Merk, 2002).

6.11.12 MEDIO CROMOGENICO E. COLI/COLIFORMES OXOID.

Medio cromogenico que ayuda a la diferenciación entre las colonias de *Escherichia coli* y otros Coliformes presentes en alimentos y muestras ambientales. La base de este medio está en el uso de dos enzimas sustrato para diferencias entre *E. coli* y Coliformes. Uno de los sustratos para diferencias entre *E. coli* y Coliformes. Uno de los sustratos cromogénicos es transportado por la enzima glucuronidasa que es específica para *Escherichia coli* y producida por aproximadamente por el 97% de las cepas. el segundo sustrato cromogenico es transportado por la galactosidasa, una enzima

producida por la mayoría de los Coliformes. Esto se traduce en colonias purpuras correspondientes a *Escherichia coli*, ya que son capaces de tomar ambos sustratos cromogénicos y las colonias rosa corresponden a Coliformes, ya que solo están en condiciones de la toma del cromógeno galactosidasa. (OXOID, 2004)

6.11.13 COLI ID BIOMERIEUX.

Medio cromogenico selectivo para la detección y recuento de *E. Coli* B D glucuronidasa positivo a 44c, y recuento simultaneo de *E. coli* y otros Coliformes a 37 c, a partir de muestras alimentarias.

Contienen dos sustratos cromogénicos: uno para la detección de B D glucuronidasa (*E. coli*) produciendo colonias rosas y otro para la detección de galactosidasa (otros Coliformes) dando colonias azules. La combinación de estos dos sustratos optimiza la detección de *E. Coli* y Coliformes. La mayoría de las bacterias Gram positivas son inhibidas. (Biomerieux, 2008)

6.12 SAN CRISTÓBAL DE LAS CASAS CHIAPAS Y SU DESARROLLO AGRÍCOLA EN FRUTAS Y HORTALIZAS.

San Cristóbal de Las Casas, situado en las montañas centrales de Chiapas, México, es un centro cultural y económico de la región. El futuro de los recursos hidráulicos de San Cristóbal está en peligro debido al rápido crecimiento de la población, el cambio del uso del suelo, la sobre-extracción del agua subterránea, una carencia de servicios de saneamiento y tratamiento de aguas residuales, y la degradación de la calidad del agua superficial y subterránea.

La región es también una de las áreas más pobres de México, tanto en calidad de vida como en indicadores económicos. Durante estas dos últimas décadas, la ciudad ha visto un rápido crecimiento en su población, dado a diversos problemas políticos que han forzado a la población campesina a emigrar a la ciudad. Se estima que este rápido crecimiento demográfico continúe en el futuro. Este crecimiento ha creado una presión adicional a la infraestructura que la ciudad tiene.

Existe drenaje solo en la zona urbana de la ciudad, pero dicha infraestructura solo saca el agua negra del centro de la ciudad y la deposita sin tratamiento alguno en los ríos que atraviesan la ciudad. Estos ríos se han convertido en los receptores de la descarga de aguas negras, y por lo tanto se han contaminado de manera que ya no cumplen con los estándares nacionales de calidad de agua. (Faruqui, N.I. and Raschid, L. (eds) (2004)

Históricamente, el agua pluvial salía de la cuenca a través de una serie de cavernas naturales localizadas en la base de las montañas meridionales. Las inundaciones frecuentes durante la estación de lluvias causadas por el drenaje lento a través de estas cavernas se convirtieron en un serio problema al crecer la población urbana. Finalmente en 1973 una gran tormenta bloqueó la salida natural con árboles y otros materiales, y se inundó

la ciudad por varios días. Para resolver este problema la ciudad construyó un túnel de concreto, de 6 kilómetros de longitud, a través de las montañas meridionales de la cuenca, permitiendo un drenaje mucho más rápido. Este túnel, conocido localmente como El Sumidero es ahora la salida de la cuenca.

El cultivo de subsistencia ha sido una forma de vida importante dentro de la cuenca. La mayoría de las tierras de cultivo consisten en campos de maíz, legumbres, y producciones diversas de café. Además, los pastizales abarcan un porcentaje significativo del uso del suelo.

Aguas residuales, con frecuencia no tratadas, son utilizadas para el riego del 10% de los cultivos del mundo, de acuerdo con una primera evaluación mundial sobre riego con aguas residuales, esta es una práctica en gran parte oculta y sancionada en un gran número de países. Sin embargo, muchos agricultores, especialmente aquellos ubicados en las áreas urbanas, utilizan las aguas residuales porque no tienen ningún costo y son abundantes, aún durante la época de sequías, y además son ricas en nitratos y fosfatos, lo que las convierten en fertilizantes efectivos. En zonas de México, las aguas residuales son tratadas para remover patógenos, haciéndola segura para el riego. Pero en la zona sur de México y zonas de escasos recursos el tratamiento es poco frecuente, exponiendo los cultivos a patógenos causantes de enfermedades y a residuos tóxicos industriales.

Cada año se producen, en distintas comunidades de este municipio de los Altos de Chiapas, unas 2 mil toneladas de hortalizas regadas con aguas negras. Esa producción se distribuye y consume no sólo en este municipio, sino en la capital del estado, Tuxtla Gutiérrez, y en ciudades como Comitán y Tapachula, e, incluso, fuera del estado.

De acuerdo con el Instituto de Fomento a la Agricultura Tropical (IFAT), son aproximadamente 100 hectáreas de hortalizas las que se riegan con aguas negras, en unas siete comunidades del municipio. Son unas 200 familias de las comunidades de Pozo Colorado, Guadalupe el Túnel, La Lagunita, El Aguacate, Sacualpa, Duraznal y Matasano, las que, por carecer de agua potable o entubada, riegan sus hortalizas con las aguas negras de la ciudad.

En esas 100 hectáreas se cultiva papa, acelga, zanahoria, ajo, betabel, calabacita, cebolla, cilantro, coliflor, brócoli, tomate de cáscara, chayote, chícharo, chile, frijol ejotero, haba, jitomate, lechuga y rábano. Información del IFAT señala que el principal cultivo es la papa, con unas 30 hectáreas y una producción aproximada de 450 toneladas por ciclo agrícola.

Los otros cultivos con mayor superficie son el repollo (15 hectáreas, con unas 180 toneladas por ciclo), el brócoli (10 hectáreas, con unas 100 toneladas por ciclo), y la lechuga (10 hectáreas, con unas 80 toneladas por ciclo). En total, calcula el IFAT, en las 100 hectáreas regadas con aguas negras a través de rústicos canales, mangueras y aspersores, se producen unas mil 170 toneladas de hortalizas dos veces al año. Los destinos de esa producción son inciertos, porque buena parte de la misma sale de las comunidades a través de los llamados "coyotes", que la distribuyen a todo el estado.

Otros municipios de la zona Altos, como Zinacantán, San Juan Chamula, Chenalhó, Teopisca y Mitontic, también son productores de hortalizas, pero se limitan al agua de lluvia para su cultivo. En toda esta zona, incluyendo a San Cristóbal de las Casas, hay 3 mil productores y mil 22 hectáreas sembradas.

Sin embargo, San Cristóbal es el único municipio donde los cultivos se riegan con aguas negras. La utilización de aguas negras para el cultivo de alimentos constituye un grave problema de salud. Hay tres descargas de aguas negras

importantes y muchas pequeñas. Las aguas negras se van por el túnel, lo cruzan, aparecen en la ladera sur de San Cristóbal y ahí se canalizan para el riego. Es una de las actividades agrícolas más desarrolladas en el estado. La dispersión de esas verduras regadas con aguas negras tiene un impacto regional. El problema es el volumen de enfermedades gastrointestinales en la región.

Gran parte del agua residual corre por los cuerpos de agua de San Cristóbal de las Casas. 35, 000,000 de litros de aguas negras van a parar diario a los ríos, arroyos y colectores. 44, 514,000 litros de agua se distribuyen diariamente a través de siete sistemas de bombeo. 80% de ese volumen se convierte en aguas residuales. Las aguas negras llegan a los cuerpos de agua a razón de 400 litros por segundo. (WWW.INFORURAL.COM.MX).

7. METODOLOGIA.

Esta investigación se realizó en las instalaciones del centro de investigación “el colegio de la frontera sur” (ECOSUR), laboratorio de bromatología, ubicado en la ciudad de san Cristóbal de las casas, Chiapas.

Se realizó el análisis de 3 muestras en frutas y hortalizas (fresa, acelga, lechuga) que fueron adquiridas en los 2 mercados respectivamente como una muestra representativa de san Cristóbal de las casas, se realizó el recuento de microorganismos de Coliformes totales, Coliformes fecales y hongos y levaduras.

El acontecimiento de esta problemática también es debido a la importancia que ha tenido la presencia de enfermedades gastrointestinales, la principal causa de esta problemática es la clase social en donde la mayoría de estas familias que se dedican a la siembra y cosecha de hortalizas son muy pobres y no se encuentran familiarizados con un sustento intelectual para tener la mejora de calidad de los productos.

Por lo tanto queremos priorizar los daños que estos alimentos que son para la comercialización y consumo humano, en sentido a la identificación de patógenos en ellos, proponiendo en si también los gastos económicos que estos métodos tienen para la elaboración de dicho análisis.

La población total de SAN CRISTOBAL DE LAS CASAS oscila dentro de los 185, 917 habitantes según cifras del INEGI en el 2010, se consideran los mercados de JOSE CASTILLO THIELEMANS Y MERPOSUR ya que estas zonas comerciales son las que reciben las cargas de frutas y hortalizas provenientes de las parcelas que son regadas con aguas residuales.

Toma de muestra según la **NOM -109-SSA1-1994**, Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

7.1 DILUCIÓN Y HOMOGENIZACIÓN DE LA MUESTRA.

En la dilución de la muestra se toma en consideración la **NOM-110-SSA1-1994.-Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.**

Se toma en cuenta las soluciones bouffer de 10^{-2} , 10^{-4} , las soluciones bouffer son sales hidrolíticamente activos, la cual tienen la función de mantener estable el PH de una solución frente la adición de muestras acidas o bases fuertes.

7.2 APLICACIÓN DE LA METODOLOGIA.

Se llevo a cabo la metodología según la guía de metodología e interpretación de PLACAS PETRIFILM 3M, para cada una de los métodos citados, en cada método encontramos guías diferentes para su interpretación en general se llevan los siguientes pasos de elaboración para la aplicación de la metodología que son los siguientes:

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se colocó la placa PETRIFILM en una superficie plana y nivelada y se levantó la película superior.
- Con la pipeta perpendicular a la placa se colocó por duplicado 1 ml de cada una de las diluciones en el centro de la película.
- Se dejó caer la película superior sobre la muestra cuidando que no se formen burbujas.
- Se colocó suavemente el dispersor plástico por el lado liso sobre la lámina superior. Cubriendo el inóculo.

- Se incubaron las placas boca arriba a 35°C durante el tiempo correspondiente en cada metodología.
- Posteriormente se realizó el recuento de unidades de colonias que presentaron un viraje de color según la guía de interpretación.
- Se realizó el reporte en unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro teniendo en cuenta el factor de dilución. (solutions.3m.com.mx)

7.3 MATERIAL Y EQUIPO.

7.3.1 AGUA PEPTONADA.

Para las tres diferentes metodologías a realizar se llevara a cabo tres diluciones para cada una de las metodologías a estandarizar, en la siguiente descripción solo tomaremos en cuenta las cantidades optimas para una metodología, se repetirá en todas las metodologías citadas. Según la norma **NOM-110-SSA1-1994**.-Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOTA: se considera la preparación de 1l de agua peptonada utilizada para una sola muestra, se considero triplicarlo ya que serán 3 muestras recolectadas por cada mercado comercial en san Cristóbal de las casas.

7.3.2 COLIFORMES TOTALES PLACA PETRIFILM.

Se considera 3 muestras, fresa lechuga y acelga en 2 números de mercados con diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} , por duplicado por lo consiguiente se consideran los materiales para el muestreo, PLACAS PETRIFILM PARA COLIFORMES TOTALES. (Ver anexo B).

7.3.3 COLIFORMES FECALES PLACA PETRIFILM.

Se considera 3 muestras fresa lechuga y acelga en 2 números de mercados con diluciones de 10^{-2} , 10^{-4} , por duplicado por lo consiguiente se consideran

los materiales para el muestreo, PLACAS PETRIFILM PARA COLIFORMES TOTALES. (Ver anexo B).

Nota: se toma en cuenta que las mismas placas de PETRIFILM utilizadas en Coliformes totales es la misma que consideraremos para fecales con la diferencia de conteo que se lleva acabo atraveS del viraje de color en diferentes determinaciones.

7.3.4 ENTEROBACTERIAS PLACA PETRIFILM.

Se considera 3 muestras fresa lechuga y acelga en 2 números de mercados con diluciones de 10^{-2} , 10^{-4} , por duplicado por lo consiguiente se consideran los materiales para el muestreo, PLACAS PETRILM PARA ENTEROBACTERIAS. (Ver anexo B).

7.3.5 MOHOS Y LEVADURAS PLACAS PETRIFILM.

Se considera 3 muestras fresa lechuga y acelga en 2 números de mercados con diluciones de 10^{-2} , 10^{-4} , por duplicado por lo consiguiente se consideran los materiales para el muestreo, PLCAS PETRIFILM PARA HONGOS Y LEVADURAS. (Ver anexo B).

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

En la presente investigación se realiza una evaluación detallada de los productos en su análisis microbiológico con los métodos actuales como lo son las placas PETRIFILM 3M, se determinó la presencia de microorganismos patógenos en estos alimentos así como la importancia que representa los alimentos contaminados en los mercados, provenientes de parcelas con riego de aguas residuales y la importancia de contar con certificaciones sanitarias.

8.1 RESULTADOS TÉCNICOS.

Se analiza 3 muestras en dos mercados importantes de la ciudad, entre los alimentos que muestreamos fueron: Acelga, Fresa, Lechuga.

Estas muestras fueron tomados en tres diferentes puntos del mercado para obtener una muestra cuantiosa, representativa y factible para su análisis de microorganismos, aplicando el análisis de Coliformes Totales, E. coli, Enterobacterias y Hongos y Levaduras por la técnica rápida de PETRIFILM 3M.

Las muestras recolectadas a base de un formato para su recolección (**ver anexo E**) Se obtuvieron en dos mercados de mayor importancia para la ciudad de San Cristóbal de las Casas Chiapas el primero llamado mercado THIELEMANS ubicado en la zona centro de la ciudad y MERPOSUR ubicado en la zona sur, las muestras fueron trasladadas al laboratorio en bolsas Ziploc y puestas en un recipiente con hielos, para mantener las condiciones adecuadas de su almacenamiento, los cual se expresan en las Tabla N° 4 y Tabla N°5. (**Ver anexo A**)

Así como otras frutas y hortalizas frescas para su manejo a consumo en mercados también son importantes en la dieta diaria del ser humano, las fresas en particular están propensas a contaminaciones de mercado que en si las más graves son la Salmonella, Hepatitis A y en su especificidad E. coli 0157:H7.

Los resultados obtenidos en esta investigación, comparados con investigaciones previas se identifican entre otras Enterobacterias, la E. coli que fue la más abundante en el análisis de fresas en los dos mercados. (Peggy van Laanen y Amanda Scott profesora del programa de extensión de alimentos y nutrición, asociada al Sistema Univeristario Texas A&M).

Por otro lado la aplicación del análisis microbiano, también arrojó altos resultados positivos en cuanto a su carga microbiana. La lechuga siendo una hortaliza que se consume fresca sin ninguna previa cocción, es la verdura de consumo humano que más contaminada se encuentra, comparado con trabajos realizados en el extranjero hubo menor abundancia de microorganismos. Investigaciones previas muestran que no solo son susceptibles a la contaminación por Enterobacterias sino también por Enteroparasitos que son dañinos a la salud, un estudio realizado en la universidad de Venezuela por Luis Traviezo-Valles y colaboradores, (2004). Otorgan resultados positivos de contaminación de lechuga fresca a partir de ser mal cultivadas o estar en contacto con la contaminación de mercado y mal manejo de productos a su venta. Posteriormente se recomienda un análisis de identificación de microorganismos que pueden ser patógenos y corroborar una infección grave al ser humano. (Contaminación Enteroparasitaria de lechugas del estado Lara. Venezuela - L. Traviezo et al).

La acelga perteneciente a "hortalizas de hojas" muestreada en San Cristóbal esta cultivada de manera convencional la cual también son regadas con aguas residuales, las cuales no se encuentran exentas de la contaminación proveniente de este tipo de riego, contaminadas así también por Enterobacterias y Coliformes totales. (BIOFARBO, vol. 18, diciembre 2008).

Se concluye que es necesario aumentar las medidas preventivas tales como el doble lavado con abundante agua, antes y después de picar la lechuga y la desinfección con hipoclorito de sodio (1-5%), para disminuir la infección por vía oral. Se propone así un desarrollo de estudios en el análisis parasitológico de alimentos frescos, para proponer soluciones adecuadas a este mal hábito de cultivo en esta ciudad, es conveniente seguir las normas adecuadas de cosecha y postcosecha de riego y cultivo para alimentos frescos.

Las siguientes dos tablas expresan los resultados obtenidos en la aplicación de las metodologías, se realiza el conteo de colonias y se aplica el factor solución para obtener el resultado de Unidades Formadoras de Colonias por ml.

| | Mercado Jose Castillo Thilemans, primer muestreo de microorganismos en alimentos para consumo humano. | | | | | | | |
|------------------|---|--------|--------------------|--------|----------|--------|--------------------------------|--------|
| | ENTEROBACTERIAS | | COLIFORMES TOTALES | | E.COLI | | HONGOS Y LEVADURAS EN EL 5 DIA | |
| | Colonias | UFC/ml | Colonias | UFC/ml | Colonias | UFC/ml | Colonias | UFC/ml |
| CONTROL (+) | 46 | 4600 | 45 | 4500 | 8 | 800 | 6 levaduras | 600 |
| CONTROL (-) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| FRESA 10-2 (1) | 1 | 100 | 2 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| FRESA 10-2 (2) | 5 | 500 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ACELGA 10-2 (1) | 32 | 3200 | 26 | 2600 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ACELGA 10-2 (2) | 26 | 2600 | 27 | 2700 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LECHUGA 10-2 (1) | 7 | 700 | 7 | 700 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LECHUGA 10-2 (2) | 6 | 600 | 4 | 400 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabla N° 4: Se optimiza un rango de 25 a 350 colonias para su lectura confirmada de microorganismo. El mercado JOSE CASTILLO THIELEMANS se encuentra ubicado en la calle GENERAL MIGUEL UTRILLA S/N colonia centro en SAN CRISTOBAL DE LAS CASAS CHIAPAS

| | Mercado Popular del Sur segundo mercado para su muestreo de microorganismos en alimentos para su consumo humano. | | | | | | | |
|------------------|--|--------|--------------------|--------|----------|--------|--------------------|--------|
| | ENTEROBACTERIAS | | COLIFORMES TOTALES | | E.COLI | | HONGOS Y LEVADURAS | |
| | Colonias | UFC/ml | Colonias | UFC/ml | Colonias | UFC/ml | Colonias | UFC/ml |
| FRESA 10-2 (1) | 7 | 700 | 6 | 600 | 12 | 1200 | 1 | 100 |
| FRESA 10-2 (2) | 3 | 300 | 5 | 500 | 5 | 500 | 0 | 0 |
| ACELGA 10-2 (1) | 88 | 8800 | 80 | 8000 | 0 | 0 | 1 | 100 |
| ACELGA 10-2 (2) | 82 | 8200 | 75 | 7500 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LECHUGA 10-2 (1) | 180 | 18000 | 240 | 24000 | 1 | 100 | 6 | 600 |
| LECHUGA 10-2 (2) | 300 | 30000 | 380 | 38000 | 2 | 200 | 6 | 600 |
| FRESA 10-4 (1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| FRESA 10-4 (2) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ACELGA 10-4 (1) | 4 | 400 | 2 | 200 | 2 | 200 | 0 | 0 |
| ACELGA 10-4 (2) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LECHUGA 10-4 (1) | 1 | 100 | 3 | 300 | 3 | 300 | 1 | 100 |
| LECHUGA 10-4 (2) | 2 | 200 | 2 | 200 | 1 | 100 | 2 | 200 |

Tabla N° 5: Se toma en cuenta dos diluciones ya que en esta zona se encuentra con mayor posibilidad de contaminación por parte de aguas residuales por estar encontrada en la zona sur de la ciudad ubicado en la primera calle de los pinos colonia valle del sur en san Cristóbal de las casas Chiapas.

TIELEMANS ENTEROBACTERIAS

Control (+)

Un indicador rojo en placa colorea todas las colonias, el film superior atrapa el gas producido por algunas bacterias fermentadoras de lactosa y las bacterias acidificantes se muestran rodeadas por un color amarillo a causa de un indicador de pH en el medio.

Fresa

En este producto alimenticio nos muestra pocas colonias de Enterobacterias formadoras de gas y acidificadas.

Acelga

La acelga por ser un alimento perecedero nos muestra una cantidad más alta de Enterobacterias así como bacterias gran negativas al no presentar gas ni acidificación no es muy preciso observarlas en la imagen por la resolución.

Lechuga

La lechuga como la fresa presento poca presencia de Enterobacterias formadora de gases y bacterias acidificadas por ser rodeadas de un color amarillo.

TIELEMANS COLIFORMES FECALES

CONTROL (+)

Las placas PETRIFILM para Coliformes contienen nutrientes del violeta rojo bilis, un agente gelificante y un indicador de tetrofolio que facilita el conteo de colonias el film superior atrapa el gas producido.

FRESA

Es difícil apreciar las colonias ya que las colonias formadas se encuentran muy pequeñas y son capaces de crecer en medios muy selectivos y específicos.

ACELGA

Las colonias formadas se define por su tamaño y la producción de gas en VRBL

LECHUGA

Las colonias asociadas a gas por la producción de lactosa pueden mostrarse como colonias rojas con o sin gas.

**TIELEMANS
HONGOS Y LEVADURAS**

CONTROL (+)

Se logra observar pocas colonias y pequeñas de levaduras gracias al indicador que son azul verdosas con bordes lisos y no contienen un foco céntrico color negro en los demás productos alimenticios los análisis de hongos y levaduras resultaron negativas y es por eso que no se reportan resultados del análisis en la fresa, acelga y lechuga.

**MERPOSUR
ENTEROBACTERIAS**

FRESA

Pocas colonias muy pequeñas no asociadas a producción de gas ni a indicador amarillo por acidificación.

ACELGA

Se pueden considerar las colonias fermentadoras de lactosa identificadas por su producción de gas e indicador amarillo por acidificación así como las colonias en el borde de la placa no son contados ya que no se encuentran bajo el efecto de los nutrientes del medio.

LECHUGA

Las colonias formadas en este PETRIFILM son muchas pero aún se pudieron contar algunas están asociadas a gas y otras solo se observan como puntos pequeños de color rojo teñidos por el colorante la mayoría de las Enterobacterias observadas en este alimento son bacterias acidificadas se pueden observar a causa del indicador amarillo que rodea la mayoría del PETRIFILM.

**MERPOSUR
COLIFORMES FECALES**

FRESA

en este análisis se forman colonias muy pequeñas color rojas no asociadas a gas también se pueden observar colonias azules correspondientes a bacterias E. coli

ACELGA

En este análisis solo se observan colonias pequeñas no fermentadoras de lactosa y con poca presencia de E. coli identificadas por el indicador azul no asociada a gas.

LECHUGA

se identificaron colonias predominantes puntiformes color rojo no asociadas a gas no se tomaron en cuenta en la numeración de colonias las que crecieron en la orilla del PETRIFILM por no estar influenciado por los nutrientes de la placa así como también fueron observado colonias azules identificadas como E. coli.

| |
|--|
| MERPOSUR HONGOS Y LEVADURAS |
|--|

| |
|----------------|
| LECHUGA |
|----------------|

| |
|--|
| Solo se toma en cuenta el análisis de levaduras en la lechuga por ser el único alimento que dio como resultado positivo a levaduras se observó que la población fue poca observadas como puntos verdes sin bordes. |
|--|

8.2 ANÁLISIS DE COSTOS.

Se recomienda que la opción tradicional en el análisis microbiológico sea la más económica presente en lo que se refiere a los reactivos, pero no cabe duda que la mano de obra, espacios y tiempo de análisis resulta con altos costos, mientras que las placas PETRIFILM proporciona el ahorro en mano de obra y optimización en costos, ya que se omiten los pasos de preparación de soluciones, esterilización, pesaje, entre otros dentro de la metodología tradicional.

Lo cual para empresas con manejo de alimentos y certificaciones sanitarias concibe la factibilidad de este método, con gran beneficio para la obtención de resultados de manera rápida y eficaz, el utilizar estos métodos rápidos otorga beneficios como el ahorro de espacio, tiempo y trabajo así como nos brinda más exactitud precisión y consistencia en los resultados, y la fácil interpretación microbiológica tanto como gastos económicos generales en la operación.

En la siguiente tabla mostramos el desglose del análisis obtenido en laboratorio:

| ANALISIS | TECNICA | COSTO TOTOAL POR PLACA (POR DUPLICADO) | COSTO TOTAL POR UNIDAD |
|--------------------|-----------|--|------------------------|
| Coliformes Totales | PETRIFILM | \$46.80 MN. | \$1170.00 MN. |
| Enterobacterias | PETRIFILM | \$26.88 MN. | \$672.00 MN. |
| Hongos y levaduras | PETRIFILM | \$26.88 MN. | \$672.00 MN. |

En esta tabla solo se toma en cuenta los precios netos sin contar los impuestos y costos de envío. **(Ver anexo D).**

8.3 PRESENTACIÓN DEL EMPAQUE.

Las placas PETRIFILM 3M se presentan empacadas en bolsas de foil de aluminio que los protegen de la humedad y de la luz, estas bolsas en algunos casos contienen 25 unidades y otras de 50 unidades según su presentación las placas miden 7.5 cm de ancho por 9.5 cm de largo.

Las bolsas de placas PETRIFILM sin abrir se deben conservar a una temperatura $> 8^{\circ}\text{C}$, las bolsas no se deben exponer a la humedad y se deben sellar bien después de cerrarlas en un ambiente seco y fresco. La exposición de las placas PETRIFILM a temperaturas de $>25^{\circ}\text{C}$ y/o humedad relativa a $>50\%$ pueden afectar su funcionamiento.

La fecha de caducidad de las placas es de aprox. 18 meses a partir de la fecha de manufactura, siempre y cuando se almacenen y conserven en las condiciones adecuadas. Una vez abiertas las bolsas cuentan con una vida útil de 30 días a temperatura ambiente.

Cada paquete tiene impreso la fecha de caducidad, número de lote, temperatura de almacenamiento y número de unidades. Igualmente tiene la información impresa con letra de color diferente para cada microorganismo

respectivamente y viene en 8 diferentes idiomas. Viene con un certificado de conformidad que garantiza que las placas han sido aprobadas y cumplen con los estándares de funcionamiento de cada una de las placas. Toda la información más detallada y guías de interpretación están disponibles y encontrarse en la página web de 3M. **(VER ANEXO B)**

8.4 VENTAJAS DE LAS PLACAS PETRIFILM 3M.

- No se preparan medios de cultivo excepto agua peptonada.
- No se necesita esterilizar las placas antes de su utilidad excepto al desecharlas.
- Son muy selectivos por el indicador que contienen y de manera eficaz otorga mayor precisión en los resultados.
- Son más fácil de manejar y ocupan un espacio mínimo en la cámara de incubación.
- En la placa de Coliformes cuenta con la disponibilidad simultanea de identificar E. coli tanto como Coliformes totales.
- En las placas de E. coli y Coliformes nos permite identificar con la producción de gas a partir de la fermentación de lactosa por medio de burbujas alrededor de la colonia, lo cual nos permite evidenciarla más fácilmente de otros microorganismos que puedan crecer en este medio.
- La placa de Mohos y Levaduras cuenta con dos antibióticos que inhiben completamente el crecimiento de bacterias, y así no confundir las lecturas entre levaduras y bacterias que puedan surgir.
- Se reducen riesgos de recontaminacion que se generan al preparar un medio de cultivo.
- Reducen tiempo y costos de mano de obra.

- El tiempo de los resultados es de bacterias de 24 a 48 horas para coliformes, Enterobacterias y E. coli y para Hongos y Levaduras es de 3-5 días.
- Se puede conservar mayor tiempo las placas PETRIFILM inoculadas sin ser contaminadas.
- Mejor recuento de colonias puntiformes, mejorando la calidad de análisis.
- Es un método rápido estandarizado lo cual solo pueden generarse errores a causa del analista.
- No constituye un volumen demasiado de desperdicio.

8.4.1 DESVENTAJAS DEL MÉTODO RÁPIDO PLACAS PETRIFIL 3M.

- Se utiliza un dispersor diferente para cada placa inoculada.
- Precaución en el momento de inocular para evitar el derrame en la placa.
- Se genera burbujas de aire al dejar caer la película superior del film.
- Es necesario ajustar el PH antes de su inoculación.
- Las placas son muy costosas.

9. CONCLUSIONES.

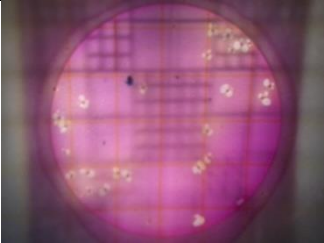
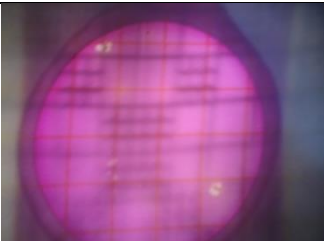
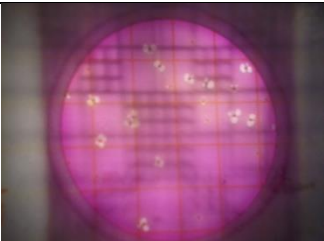
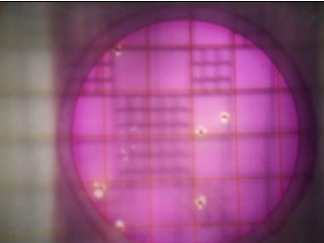
- La aplicación del método rápido PETRIFILM 3M resulto con factibilidad y rapidez en el desarrollo de la investigación dando en su mayoría positivo a Enterobacterias y Coliformes Totales mientras que en Hongos y Levaduras los resultados fueron minimos.
- Se desarrolla el análisis de resultados de fresa, lechuga y acelga de manera detallada para la comprensión de los resultados obtenidos mediante el análisis de los productos frescos que se encuentran contaminados.
- Se realizo una investigación considerable para el uso de esta técnica de método rápido de placas PETRIFILM 3M determinando microorganismos dañinos para la salud, se proporciona datos sobre esta técnica a si como sus ventajas y desventajas que tienen el uso de estas.
- Se determino los gastos del análisis en las muestras constituyendo solo el precio de placas por duplicado, recalcando que no fue considerado el costo total de la mano de obra, agua desionizada, el uso de equipo, la electricidad respectiva, y equipo de trabajo como gorros, cubrebocas, benzal, caldo peptona y esterilizado de material con tapones de algodones, aluminio y cinta testigo, entre otros.
- Las placas PETRIFILM siendo una de cuantos métodos rápidos para el análisis microbiano hace constar que cuenta con un gran número de aprobaciones y certificaciones otorgadas por muchos países, considerando que las placas PETRIFILM son el mejor método en comparación a otras, a nivel mundial el primero en análisis de muestras de alimentos, lo cual hace constar la confianza, factibilidad y credibilidad ante quienes lo utilizan.

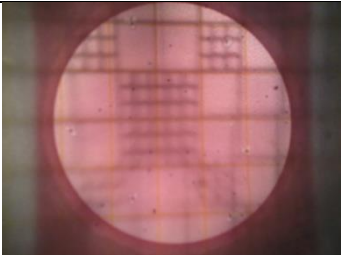
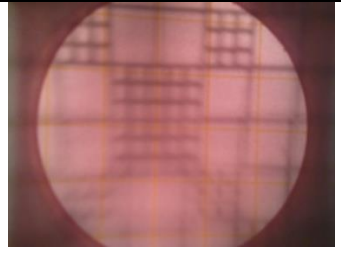
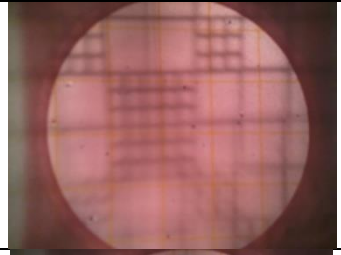
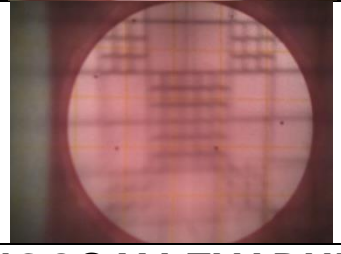

- Se reduce los posibles errores que en la preparación de medios de cultivo se puedan generar y se reduce la variación en los resultados y generan una mayor exactitud y consistencia de los resultados, lo cual a su vez aumenta el ahorro de trabajo, tiempo, espacio, aumenta la exactitud precisión y consistencia de los resultados y su fácil interpretación microbiológica y reducción de gastos de operación.

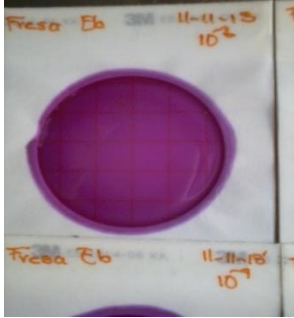
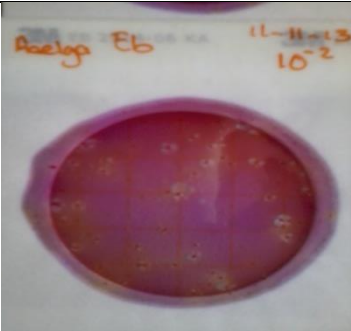
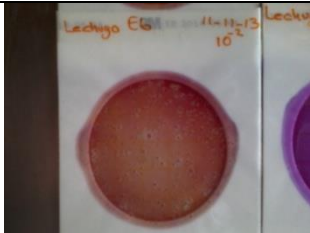

9.1 RECOMENDACIONES

- Confirmar análisis en posteriores fases climáticas para confirmar efectos en contaminación de frutas y hortalizas.
- Determinar la factibilidad de utilizar este método en otros sectores de salud como en agua potable y/o consumo.
- Considerar espacios específicos para el análisis microbiológico así como la accesibilidad de contemplar reactivos para su uso.
- Realizar el posible análisis metódico de parásitos en frutas y hortalizas provenientes de los mercados de san Cristóbal de las casas, Chiapas

ANEXO A

| <p style="text-align: center;">TIELEMANS</p> | <p style="text-align: center;">ENTEROBACTERIAS</p> |
|--|--|
| <p>Control (+) Un indicador rojo en placa colorea todas las colonias, el film superior atrapa el gas producido por algunas bacterias fermentadoras de lactosa y las bacterias acidificantes se muestran rodeadas por un color amarillo a causa de un indicador de pH en el medio.</p> |  |
| <p>Fresa En este producto alimenticio nos muestra pocas colonias de Enterobacterias formadoras de gas y acidificadas.</p> |  |
| <p>Acelga La acelga por ser un alimento perecedero nos muestra una cantidad más alta de Enterobacterias así como bacterias gran negativas al no presentar gas ni acidificación no es muy preciso observarlas en la imagen por la resolución.</p> |  |
| <p>Lechuga La lechuga como la fresa presento poca presencia de Enterobacterias formadora de gases y bacterias acidificadas por ser rodeadas de un color amarillo.</p> |  |

| TIELEMANS | COLIFORMES TOTALES |
|---|--|
| <p>CONTROL (+) Las placas PETRIFILM para Coliformes contienen nutrientes del violeta rojo bilis, un agente gelificante y un indicador de tetrofolio que facilita el conteo de colonias el film superior atrapa el gas producido.</p> |  |
| <p>FRESA Es difícil apreciar las colonias por la resolución de la foto ya que las colonias formadas se encuentran muy pequeñas y son capaces de crecer en medios muy selectivos y específicos.</p> |  |
| <p>ACELGA Las colonias formadas se define por su tamaño y la producción de gas en VRBL</p> |  |
| <p>LECHUGA Las colonias asociadas a gas por la producción de lactosa pueden mostrarse como colonias rojas con o sin gas.</p> |  |
| TIELEMANS | HONGOS Y LEVADURAS |
| <p>CONTROL (+) Se logra observar pocas colonias y pequeñas de levaduras gracias al indicador que son azul verdosas con bordes lisos y no contienen un foco céntrico color negro en los demás productos alimenticios los análisis de hongos y levaduras resultaron negativas y es por eso que no se reportan resultados del análisis en la fresa, acelga y lechuga.</p> |  |

| MERPOSUR | ENTEROBACTERIAS |
|--|--|
| <p>FRESA Pocas colonias muy pequeñas no asociadas a producción de gas ni a indicador amarillo por acidificación.</p> |  |
| <p>ACELGA Se pueden observar las colonias fermentadoras de lactosa identificadas por su producción de gas e indicador amarillo por acidificación así como las colonias en el borde de la placa no son contados ya que no se encuentran bajo el efecto de los nutrientes del medio.</p> |  |
| <p>LECHUGA Las colonias formadas en este PETRIFILM son muchas pero aun se pudieron contar algunas están asociadas a gas y otras solo se observan como puntos pequeños de color rojo teñidos por el colorante la mayoría de las Enterobacterias observadas en este alimento son bacterias acidificadas se pueden observar a causa del indicador amarillo que rodea la mayoría del PETRIFILM.</p> |  |
| MERPOSUR | COLIFORMES TOTALES |
| <p>FRESA en este análisis se forman colonias muy pequeñas color rojas no asociadas a gas también se pueden observar colonias azules correspondientes a bacterias E. coli</p> |  |

| | |
|--|---|
| <p>ACELGA En este análisis solo se observan colonias pequeñas no fermentadoras de lactosa y con poca presencia de E. coli identificadas por el indicador azul no asociada a gas.</p> |  |
| <p>LECHUGA se identificaron colonias predominantes puntiformes color rojo no asociadas a gas no se toaron en cuenta en la numeración de colonias las que crecieron en la orilla del PETRIFILM por no estar influenciado por los nutrientes de la placa así como también fueron observado colonias azules identificadas como E. coli.</p> |  |
| <p>MERPOSUR</p> | <p>HONGOS Y LEVADURAS</p> |
| <p>LECHUGA Solo se toma en cuenta el análisis de levaduras en la lechuga por ser el único alimento que dio como resultado positivo a levaduras, la población fue poca observada como puntos verdes sin bordes.</p> |  |

ANEXO B



ANEXO C

NOM-109-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS, PROCEDIMIENTOS PARA LA TOMA DE MANEJO Y TRANSPORTES DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANALISIS MICROBIOLÓGICO.

PREPARACIÓN DEL MATERIAL PARA LA TOMA DE MUESTRA

Todo el material que se utilicen para la toma, estar limpio y estéril y libre de sustancias que pudieran afectar la vialidad de los microorganismos.



Se envolverá el material de forma individual, con papel estroza antes de esterilizarlo.



El material que se utilice para la toma de muestra debe ser esterilizado en autoclave a 121°C, durante 15 minutos

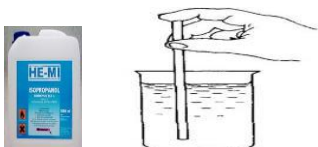


Una vez esterilizado el material, debe ser protegido para evitar contaminantes

De ser necesario si se requiere mayor numero de utensilios, lavarlos



Sumerjirlos en benzal al 70%.

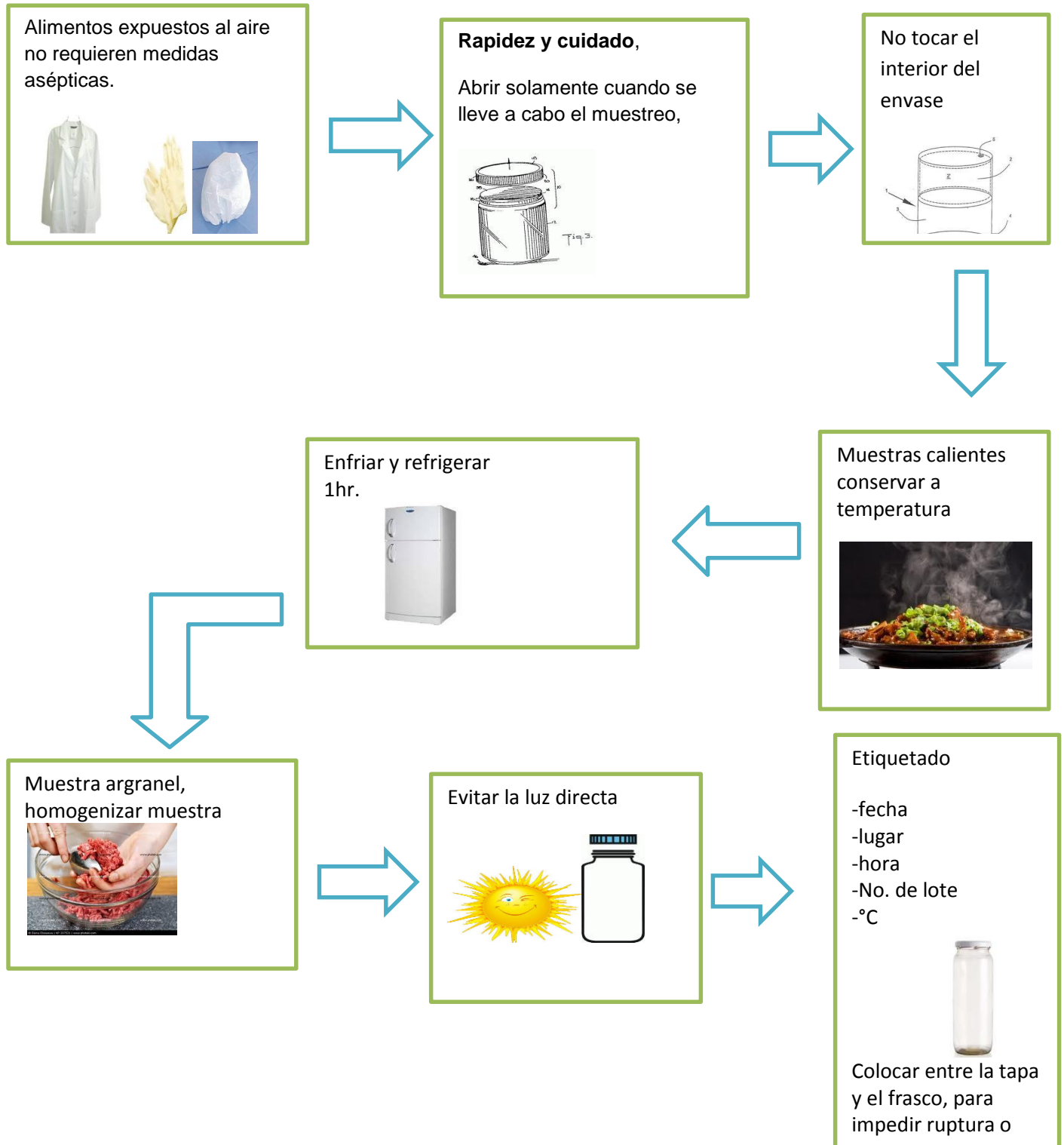


Flamear los materiales anteriormente sumergidos en etanol, y colocarlos en recipiente esteril.

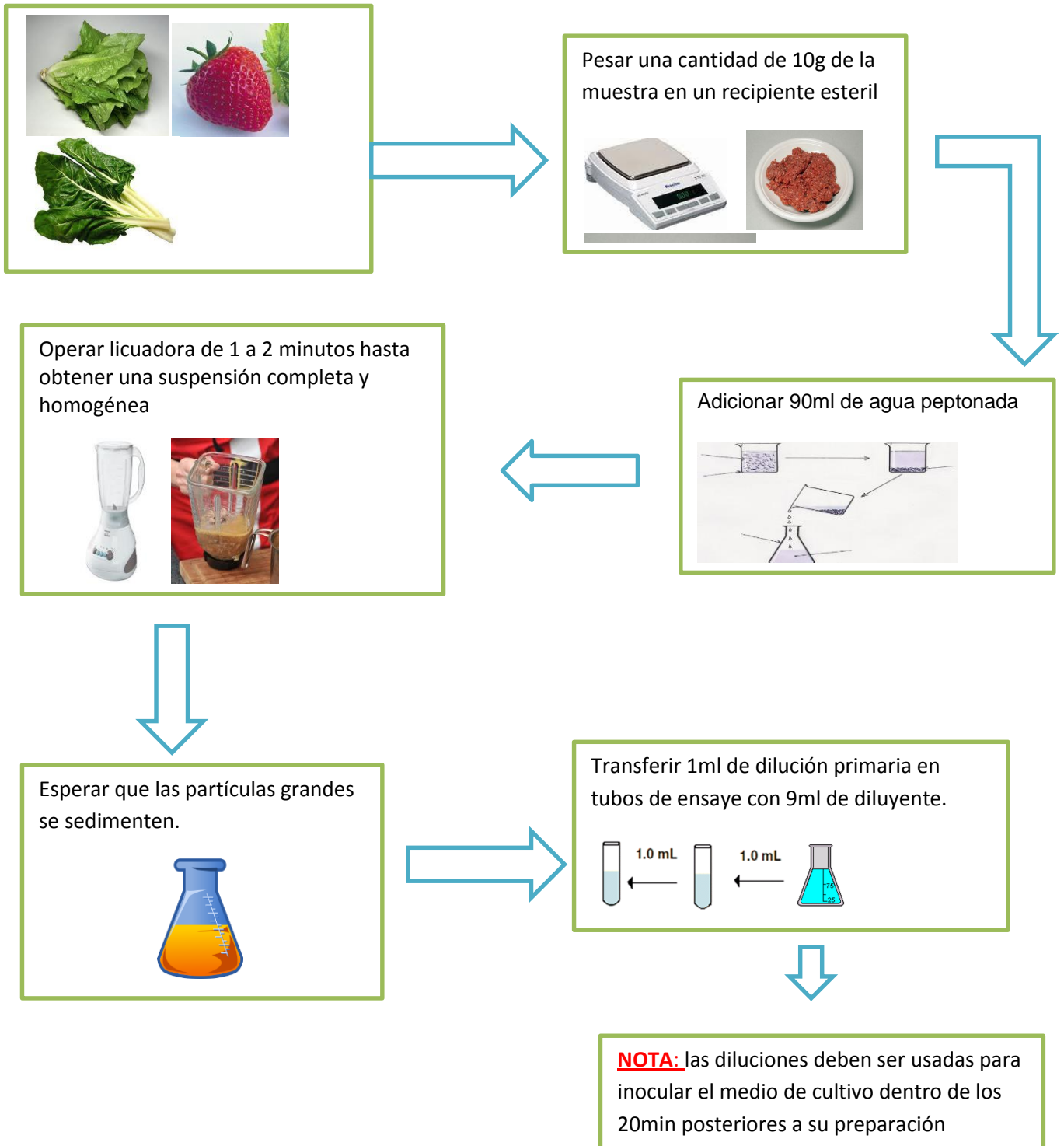


NOM-109-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS, PROCEDIMIENTOS PARA LA TOMA DE MANEJO Y TRANSPORTES DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANALISIS MICROBIOLÓGICO.

PROCEDIMIENTO



NORMA OFICIAL MEXICANA NOM -110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS, PREPARACION Y DILUCIONES DE MESTRAS DE ALIMENTOS PARA ANALISIS MICROBIOLÓGICO,



METODO DE CULTIVO EN METODOS RAPIDOS DE COLIFORMES TOTALES PARA SU CONTEO UFC/ML.

Colocar las placas petrifilm en una superficie plana previamente desinfectada con benzal guantes, cofia, cubre bocas y bata para el manejo aséptico del material, trabajar cerca de mecheros o campana con UV.



Tener el cuidado necesario para el manejo de las placas después de abrir el paquete

Colocar el dispersor y presionar suavemente para que la muestra sea totalmente dispersa en la placa.



Descubrir la película de la superficie para inocular con 1 ml de muestra diluida posteriormente bajar esa película.



Esperar 1 min. Para que el gel del petrifilm solidifique.



Incubación. Incubar las placas a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas y observar si hay formación de gas, en caso contrario prolongar la incubación hasta 48 ± 2 horas. Pueden incubarse cara arriba en grupos de no más de 20 placas.



NOTA: se considera el duplicado de cada una de las diluciones a utilizar que es la dilución 10^{-3} y 10^{-4} .

METODO DE CULTIVO EN METODOS RAPIDOS PETRIFILM DE HONGOS Y LEVADURAS PARA SU CONTEO UFC/ML.

Colocar las placas petrifilm en una superficie plana previamente desinfectada con benzal guantes, cofia, cubre bocas y bata para el manejo aséptico del material, trabajar cerca de mecheros o campana con UV.



Tener el cuidado necesario para el manejo de las placas después de abrir el paquete

Colocar el dispensador y presionar suavemente para que la muestra sea totalmente dispersa en la placa.



Descubrir la película de la superficie para inocular con 1 ml de muestra diluida posteriormente bajar esa película.



Esperar 1 min. Para que el gel del petrifilm solidifique.



Incubación. Incubar las placas a $35 \pm 0,5$ °C por tiempo de 3 a 5 días Pueden incubarse cara arriba en grupos de no más de 20 placas.



NOTA: se considera el duplicado de cada una de las diluciones a utilizar que es la dilución 10^{-3} y 10^{-4} .

METODO DE CULTIVO EN METODOS RAPIDOS PETRIFILM DE ENTEROBACTERIAS.

Colocar las placas petrifilm en una superficie plana previamente desinfectada con benzal guantes, cofia, cubre bocas y bata para el manejo aséptico del material, trabajar cerca de mecheros o campana con UV.



Tener el cuidado necesario para el manejo de las placas después de abrir el paquete

Colocar el dispensador y presionar suavemente para que la muestra sea totalmente dispersa en la placa.



Descubrir la película de la superficie para inocular con 1 ml de muestra diluida posteriormente bajar esa película.



Esperar 1 min. Para que el gel del petrifilm solidifique.



Incubación. Incubar los tubos a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas y observar si hay formación de colonias. Pueden incubarse cara arriba en grupos de no más de 20 placas.



NOTA: se considera el duplicado de cada una de las diluciones a utilizar que es la dilución 10^{-3} y 10^{-4} .

ANEXO D



| | | | |
|----------|---|------------|------------|
| EMPRESA: | COLEGIO DE LAFRONTERA SUR | FECHA: | 22/10/2013 |
| AT'N. A: | Q.F.B. MA. GUADALUPE PEREZ ESCOBAR | COTIZACION | 3658 |
| | Laboratorio institucional de bromatología | | |
| TELEFONO | 01967-674-90-00 FAX 01967-678-23-22 | EXT. | 1801 |

Carretera Panamericana y Periferico Sur s/n
San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México
gperez@ecosur.mx

Por medio de la presente le envié la cotización de los productos de su interés.

| MARCA | 3M PETRIFILM: MICROBIOLOGIA | PRESENTACION | PRECIO |
|-------|------------------------------------|--------------|-------------|
| 6421 | PLACA ENTEROBACTERIAS | 50 PZAS. | \$ 672.00 |
| 6414 | PLACA E. COLI - COLIFORMES | 50 PZAS. | \$ 1,170.00 |
| 6417 | PLACA PETRIFILM HONGOS Y LEVADURAS | 50 PZAS. | \$ 672.00 |
| 1ZZZ | GASTOS DE ENVIO | | \$ 200.00 |
| | | | \$ 2,714.00 |
| | | | \$ 434.24 |
| | | | \$ 3,148.24 |

FORMA DE PAGO:
TIEMPO DE ENTREGA:

| |
|---------|
| CONTADO |
| 2 DIAS |

Despues de recibir su orden de compra

*Los precios anteriores estan en Pesos mexicanos

VIGENCIA DE LA COTIZACIÓN:

Hasta 8 dias despues de entregada la cotizacion.
sin otro particular y en espera de su pronta respuesta, estoy a sus ordenes

ATENTAMENTE

ENRIQUETA JIMÉNEZ NAVARRETE

E-mail at08@metodosrapidos.com

TEL. LADA SIN COSTO 01800-727-43-07



ANEXO E

| | | | |
|---|-----------|--|---|
| DATOS GENERALES. | | | |
| Comunidad: | | | |
| Estado y municipio: | | | |
| Ubicación geográfica: | Longitud: | Latitud: | Altura SNM: |
| Referencias para ubicación del sitio de muestreo: | | | |
| Lugar de muestreo: | | | |
| Ubicación de la parcela a muestrear: | | | |
| Nombre del agricultor: | | | |
| MUESTREO EN CAMPO | | | N° de muestra: |
| Tipo de muestra: | | <input type="checkbox"/> compuesta. | <input type="checkbox"/> Simple. |
| Especie de muestra: | | <input type="checkbox"/> fruta. | <input type="checkbox"/> Hortaliza. |
| Identificación de la muestra: | | | |
| Descripción de la muestra: | | | |
| Proceso de cosecha: | | | |
| Proceso de postcosecha: | | | |
| Hora de recolección: | | condiciones ambientales: | °C %HR |
| Tipo de agua de riego: | | <input type="checkbox"/> aguas residuales. | <input type="checkbox"/> Lluvia. <input type="checkbox"/> otro. |
| Estado de la muestra: | | <input type="checkbox"/> bueno. | <input type="checkbox"/> Regular. <input type="checkbox"/> Malo. |
| Condiciones de la muestra. | | | |
| Tipo de recolección: | | <input type="checkbox"/> maquinaria. | <input type="checkbox"/> Manual. <input type="checkbox"/> Técnica de cultivo. |
| Color: | | <input type="checkbox"/> aceptable. | <input type="checkbox"/> No aceptable. |
| Olor: | | <input type="checkbox"/> aceptable. | <input type="checkbox"/> No aceptable. |
| Textura: | | <input type="checkbox"/> aceptable. | <input type="checkbox"/> No aceptable. |

| | | | |
|-------------------------------|--|--|--|
| MUESTREO EN CAMPO | N° de muestra: | | |
| Tipo de muestra: | <input type="checkbox"/> compuesta. | <input type="checkbox"/> Simple. | |
| Especie de muestra: | <input type="checkbox"/> fruta. | <input type="checkbox"/> Hortaliza. | |
| Identificación de la muestra: | | | |
| Descripción de la muestra: | | | |
| Proceso de cosecha: | | | |
| Proceso de pos cosecha: | | | |
| Hora de recolección: | condiciones ambientales: | | °C %HR |
| Tipo de agua de riego: | <input type="checkbox"/> aguas residuales. | <input type="checkbox"/> Lluvia. | <input type="checkbox"/> otro. _____ |
| Estado de la muestra: | <input type="checkbox"/> bueno. | <input type="checkbox"/> Regular. | <input type="checkbox"/> Malo. |
| Condiciones de la muestra. | | | |
| Tipo de recolección: | <input type="checkbox"/> maquinaria. | <input type="checkbox"/> Manual. | <input type="checkbox"/> Técnica de cultivo. |
| Color: | <input type="checkbox"/> aceptable. | <input type="checkbox"/> No aceptable. | |
| Olor: | <input type="checkbox"/> aceptable. | <input type="checkbox"/> No aceptable. | |
| Textura: | <input type="checkbox"/> aceptable. | <input type="checkbox"/> No aceptable. | |
| MUESTREO EN CAMPO | N° de muestra: | | |
| Tipo de muestra: | <input type="checkbox"/> compuesta. | <input type="checkbox"/> Simple. | |
| Especie de muestra: | <input type="checkbox"/> fruta. | <input type="checkbox"/> Hortaliza. | |
| Identificación de la muestra: | | | |
| Descripción de la muestra: | | | |
| Proceso de cosecha: | | | |
| Proceso de pos cosecha: | | | |
| Hora de recolección: | condiciones ambientales: | | °C %HR |
| Tipo de agua de riego: | <input type="checkbox"/> aguas residuales. | <input type="checkbox"/> Lluvia. | <input type="checkbox"/> otro. _____ |

| | | | |
|---|--|---------------------------------|----------------|
| Estado de la muestra: <input type="checkbox"/> bueno. <input type="checkbox"/> Regular. <input type="checkbox"/> Malo. | | | |
| Condiciones de la muestra. | | | |
| Tipo de recolección: <input type="checkbox"/> maquinaria. <input type="checkbox"/> Manual. <input type="checkbox"/> Técnica de cultivo. | | | |
| Color: <input type="checkbox"/> aceptable. <input type="checkbox"/> No aceptable. | | | |
| Olor: <input type="checkbox"/> aceptable. <input type="checkbox"/> No aceptable. | | | |
| Textura: <input type="checkbox"/> aceptable. <input type="checkbox"/> No aceptable. | | | |
| MUESTREO EN MERCADO. | | | N° de muestra: |
| Forma de entrega: <input type="checkbox"/> canastas. <input type="checkbox"/> Cajas. <input type="checkbox"/> Rejas. <input type="checkbox"/> Bolsas. | | | |
| Tipo de muestra: <input type="checkbox"/> compuesta. <input type="checkbox"/> Simple. | | | |
| Especie de muestra: <input type="checkbox"/> fruta. <input type="checkbox"/> Hortaliza. | | | |
| Identificación de la muestra: | | | |
| Descripción de la muestra: | | | |
| Estado de la muestra: <input type="checkbox"/> bueno. <input type="checkbox"/> Regular. <input type="checkbox"/> Malo. | | | |
| Color: <input type="checkbox"/> aceptable. <input type="checkbox"/> No aceptable. | | | |
| Olor: <input type="checkbox"/> aceptable. <input type="checkbox"/> No aceptable. | | | |
| Textura: <input type="checkbox"/> aceptable. <input type="checkbox"/> No aceptable. | | | |
| Hora de recolección: | | condiciones ambientales: °C %HR | |
| Manejo posterior a su venta. | | | |
| Contacto con agua: <input type="checkbox"/> si. <input type="checkbox"/> No. | | | |
| Tipo de agua: <input type="checkbox"/> potable. <input type="checkbox"/> Cisterna. <input type="checkbox"/> Otro. | | | |
| Observaciones: | | | |

| | | | |
|---|--|---|--|
| Antecedentes: | | | |
| MUESTREO EN MERCADO. | | N° de muestra: | |
| Forma de entrega: () canastas. () Cajas. () Rejas. () Bolsas. | | | |
| Tipo de muestra: () compuesta. () Simple. | | | |
| Especie de muestra: () fruta. () Hortaliza. | | | |
| Identificación de la muestra: | | | |
| Descripción de la muestra: | | | |
| Estado de la muestra: () bueno. () Regular. () Malo. | | | |
| Color: () aceptable. () No aceptable. | | | |
| Olor: () aceptable. () No aceptable. | | | |
| Textura: () aceptable. () No aceptable. | | | |
| Hora de recolección: | | condiciones ambientales: °C %HR | |
| Manejo posterior a su venta. | | | |
| Contacto con agua: () si. () No. | | | |
| Tipo de agua: () potable. () Cisterna. () Otro. | | | |
| Observaciones: | | | |
| Antecedentes: | | | |

| | | | |
|---|--------------------------|----|-----|
| MUESTREO EN MERCADO. | N° de muestra: | | |
| Forma de entrega: () canastas. () Cajas. () Rejas. () Bolsas. | | | |
| Tipo de muestra: () compuesta. () Simple. | | | |
| Especie de muestra: () fruta. () Hortaliza. | | | |
| Identificación de la muestra: | | | |
| Descripción de la muestra: | | | |
| Estado de la muestra: () bueno. () Regular. () Malo. | | | |
| Color: () aceptable. () No aceptable. | | | |
| Olor: () aceptable. () No aceptable. | | | |
| Textura: () aceptable. () No aceptable. | | | |
| Hora de recolección: | condiciones ambientales: | °C | %HR |
| Manejo posterior a su venta. | | | |
| Contacto con agua: () si. () No. | | | |
| Tipo de agua: () potable. () Cisterna. () Otro. | | | |
| Observaciones: | | | |
| Antecedentes: | | | |

Material y equipo de recolección de muestra:

- Bolsas reselladas.
- Guantes.
- Cofia.
- Cubre bocas.
- Bata.
- Hielera.
- Hielos.
- Marcadores.
- Bolsa para basura.
- GPS.

Técnica de muestreo según la NOM-109-SSA1-1994 norma oficial mexicana, bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Paso 1: identificar la muestra.

Paso 2: recolectar aproximadamente una porción mayor a 100 gramos con los guantes, cofia, cubre bocas y bata equipados.

Paso 3: colocar en la bolsa con ciper la porción de la muestra recolectada, inmediatamente cerrarla y ubicarla en la hielera con el respectivo hielo.

Paso 4: repetir el paso 1 al paso 3 respectivamente para cada muestra (sellar la hielera con cinta masking al termino del muestreo).

Paso 5: trasladar la hielera al laboratorio al término del muestreo para su posterior análisis.

Nota: en caso de muestrear alimentos al contacto con aire libre no se considera estricto procedimiento en el manejo aséptico para su recolección.

BIBLIOGRAFÍA.

- Hernández-García J. J. (2006).Guía Básica para la Sanidad en la Industria Alimentaria (Control de Bacterias, Hongos y Levaduras). Unidad Politécnica para el Desarrollo y la Competitividad Empresarial: Instituto Politécnico Nacional. México, D. F.
- Zinsser Microbiología Wolfgang K. Joklik, DPHIL Hilda P. Willet, PH.D D. Bernard Amos. M.D Catherine M. Wilfert, M.D 20 Edición, Diciembre 1998 Editorial Médica Panamericana Impreso en argentina
- Manual básico de Microbiología CULTIMED. 2003.
- Microbiología de los alimentos Agua y alimentos Hernández Fernández Escartin Universidad de Guadalajara Impreso y hecho en México
- Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.
- Academia de Plantas Piloto de Alimentos. ENCB IPN. Ingeniería de Alimentos. 3ra reedición. Mexico. ENCB IPN. 2005.
- Manual de Procedimientos para la Toma y Manejo de Muestras de Alimentos para Análisis Bacteriológico. 1992. Laboratorio Nacional de Salud Pública. Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario, SSA, México, D.F.
- <http://www.inforural.com.mx/spip.php?article25202>
- <http://www.noticias.irc.nl/page/34588>
- http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema_08_%20micro_alimentos.pdf
- http://www2.bren.ucsb.edu/~keller/courses/GP_reports/Final_SanCristobal_espanol.pdf
- GERARDO A. LEOTTA Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Instituto de Genética Veterinaria (CONICET-UNLP). Calle 60 y 118,

(1900) La Plata, Pcia. de Buenos Aires, Argentina Revista Argentina de Microbiología (2009)

- NORE LINA & SANCHES JEIMY, 2008, pontificia universidad javeriana facultad de ciencias carrera de microbiología industrial, estudio comparativo en técnicas de recuento rapido en el mercado y placas patriform para el análisis de alimentos bogota 2008. (tesis para la obtención de posgrado)
- **NOM-109-SSA1-1994.-** Procedimientos para la toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
- **NOM-110-SSA1-1994.-**Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- **NOM-112-SSA1-1994.**Determinación de la presencia en alimentos de coliformes totales.
- **NMX-F-308-1992.**Identificación en alimentos de coliformes fecales.
- **NOM-111-SSA1-1994.** Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nomssa.html>
- http://www.foodsafety.wisc.edu/assets/pdf_Files/safe_handling_strawberries_Sp.pdf
- <http://www.scielo.cl/pdf/parasitol/v59n3-4/art14.pdf>
- <http://www.scielo.org.bo/pdf/rbfb/v16n1/v16n1a02>