



# ITSON

## INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIAS  
ALIMENTARIAS

**ESTUDIO DE LA CALIDAD SANITARIA DE LA  
CAFETERÍA DEL ITSON CAMPUS  
CENTRO CD. OBREGÓN.**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA  
GERARDO ZAZUETA ENCINAS**

**CD. OBREGÓN, SONORA**

**JUNIO DE 2007**

## ÍNDICE

	<b>Páginas</b>
ÍNDICE.....	i
LISTA DE TABLAS.....	iv
RESUMEN.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2 Justificación.....	4
1.3 Objetivos.....	5
1.4 Hipótesis.....	7
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	8
2.1 Seguridad alimentaría.....	8
2.1.1 Limpieza.....	9
2.1.2 Desinfección.....	10
2.2 Indicadores microbiológicos.....	10
2.2.1 Microorganismos indicadores.....	11
2.2.2 Criterios microbiológicos para los alimentos...	11
2.3 Microorganismo comunes.....	12
2.3.1 Coliformes.....	12
2.3.2 Coliformes fecales.....	13
2.3.3 Organismos mesófilos aerobios.....	13
2.3.4 Hongos y Levaduras.....	14
2.4 Bacterias productoras de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA'S).....	15
2.4.1 <i>Salmonella</i> .....	15
2.4.2 <i>Shigella</i> .....	15
2.4.3 Pruebas bioquímicas.....	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 Zona de estudio y periodo de muestreo.....	20
3.2 Toma de muestra.....	21
3.2.1 Superficies vivas.....	21

3.2.2 Superficies inertes.....	21
3.3 Transporte de las muestras.....	22
3.4 Análisis microbiológicos de superficies vivas e inertes.....	22
3.4.1 Cuenta total viable de mesófilos aerobios.....	22
3.4.2 Cuanta total viable de coliformes totales.....	22
3.5 Análisis microbiológicos de Alimentos.....	23
3.5.1 Cuenta total viable de mesófilos aerobios.....	23
3.5.2 Cuanta total viable de hongos y levaduras....	23
3.5.3 Numero más probable (NMP) de coliformes totales y fecales por la técnica de fermentación de tubos múltiples en alimentos.....	24
3.5.3.1 Prueba presuntiva.....	24
3.5.3.2 Prueba confirmativa para coliformes totales.....	24
3.5.3.3 Prueba confirmativa para coliformes fecales.....	25
3.5.4 Determinación de <i>salmonella sp.</i> en alimentos.....	26
3.5.4.1 Identificación por pruebas bioquímicas.....	26
3.6 Determinación de bacterias mesófilas aerobias en medio ambiente (técnica de placa abierta).....	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1 Recuento de microorganismos mesófilos aerobios en superficies vivas e inertes.....	34
4.2 Recuento de organismos coliformes totales en superficies vivas e inertes.....	35
4.3 Recuento de microorganismos mesófilos aerobios en medio en medio ambiente.....	35

4.4 Recuento de microorganismos mesófilos aerobios en alimentos.....	36
4.5 Recuento de hongos y levaduras en alimentos.....	37
4.6 Número más probable (NMP) de coliformes totales y fecales en alimentos.....	38
4.7 Determinación de <i>Salmonella</i> en alimentos.....	40
V. CONCLUSIONES.....	41
VI. RECOMENDACIONES.....	43
VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	45

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Fechas de muestreo.....	20
2	Sitio de muestreo en superficies vivas e inertes.....	21
3	Número más probable de microorganismo.....	25
4	Pruebas bioquímicas para <i>Salmonella</i> .....	31
5	Sitio de muestreo en medio ambiente.....	32
6	Cuenta tota viable de organismos mesofilicos aerobios en superficies vivas e inertes en la cafetería del ITSON campus centro Cd. Obregón.....	34
7	Cuenta tota viable de coliformes totales en superficies vivas e inertes en la cafetería del ITSON campus centro Cd. Obregón.....	35
8	Cuenta total de microorganismos mesófilos aerobios en medio ambiente de la cafetería del ITSON campus centro Cd. Obregón.....	36
9	Cuenta tota viable de microorganismos mesófilos aerobios en alimentos de la cafetería del ITSON campus centro Cd. Obregón.....	37
10	Cuenta tota viable de hongos y levaduras en alimentos de la cafetería del ITSON campus centro Cd. Obregón.....	38
11	Número Mas Probable (NMP) de coliformes fecales y totales en alimentos de la cafetería del ITSON campus centro Cd. Obregón.....	39

## RESUMEN

El presente trabajo se desarrollo en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Servicios de Recursos Naturales (CSRN) del Instituto Tecnológico de Sonora. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad sanitaria de la cafetería del ITSON campus centro de Cd. Obregón, mediante técnicas microbiológicas en superficies vivas e inertes, y medio ambiente así como de alimentos.

A las muestras tomadas de superficies vivas e inertes se le realizaron análisis de cuenta total viable de organismos mesófilos aerobios y coliformes totales, por la técnica de vaciado en placa. Los análisis a las muestras de alimentos fueron cuenta total viable de organismos mesófilos aerobios, hongos y levaduras por el método de vaciado en placa, determinación del número más probable de coliformes totales (CT) y fecales (CF), aislamiento e identificación de *Salmonella* por pruebas bioquímicas. Para las muestras de medio ambiente se empleo el método de placa abierta por 15 minutos.

Los resultados obtenidos fueron comparados con NOM-093-SSA1-1994. En la cuenta total viable de mesófilos aerobios se encontró que el 2.5% de las muestras de superficies inertes analizadas están fuera de la norma y el 100% de superficies vivas se encuentran dentro, en cuanto a organismos coliformes el 100% de las muestras cumplen con las especificaciones de la norma. Se encontró de 0 a 148,000 UFC/g de organismos mesófilos aerobios en alimentos lo cual indica que el 100% de los alimentos cumplen con las especificaciones de la norma antes mencionada.

Los resultados obtenidos en el recuento de hongos y levaduras en alimentos fue de 0 a 1310 UFC/g los cuales demuestran que se lleva a cabo un buen proceso de limpieza y manipulación de los alimentos. Con lo que respecta al NMP de coliformes totales y fecales se encontró que el 100% de las muestras se encontraban dentro de las especificaciones de la norma. Refiriéndose a la determinación de *Salmonella*, en ninguno de los alimentos analizados se logro detectar la presencia de este patógeno.

En base a los resultados se puede decir que las instalaciones, el medio ambiente y los alimentos de este establecimiento se encuentran en óptimas condiciones sanitarias, y se recomienda que se sigan aplicando las buenas prácticas de higiene.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

Durante siglos, el ser humano simultáneamente ha sacado provecho y ha sufrido infecciones por microorganismos y por actividades en los alimentos (Doyle, *et al.*, 1995).

Además de su valor indudable, desde la antigüedad los alimentos han sido relacionados con la transmisión de enfermedades. Las pruebas existentes indican claramente que los contaminantes biológicos son su causa principal (Adams, *et al.*, 1997).

La historia de la microbiología de alimentos es profusa y excitante. Nos ha llevado desde el lento caer en la cuenta de que algunas enfermedades eran causadas por microorganismos que crecían en los alimentos, hasta el control práctico de estos microbios usando herramientas físicas, químicas y biológicas. El conocimiento mecanicista de la fisiología y el metabolismo microbiano ha proporcionado nuevas aproximaciones a la conservación de los alimentos y ha sentado las bases del control genético de los patógenos transmitidos por alimentos (Doyle, *et al.*, 1997).

---

Los alimentos que consumimos, raramente por no decir nunca son estériles sino que contienen asociaciones microbianas cuya composición depende de que organismos llegan a él y de cómo se multiplican, sobreviven e interaccionan en el alimento en el transcurso del tiempo (Adams, *et al.*, 1995).

En la mayoría de los casos, estos organismos no ejercen un efecto aparente por lo que el alimento es consumido sin reparo y sin consecuencias adversas. Según Adams (1995) algunas veces los microorganismos manifiestan su presencia en una de estas formas:

- Pueden causar alteraciones.
- Causan enfermedades transmitidas por alimentos.
- Pueden transformar las propiedades de un alimento de forma beneficiosa, fermentación del alimento.

El crecimiento microbiano en los alimentos es un proceso complejo gobernado por factores genéticos, bioquímicos y medioambientales. La temperatura y la composición gaseosa son los principales factores extrínsecos que influyen sobre el crecimiento microbiano (Doyle, *et al.*, 1997).

En la mayoría de los casos, los microorganismos utilizan los alimentos como fuente de nutrientes para su propio crecimiento, hecho que, naturalmente puede ocasionar su alteración. Los microorganismos pueden echar a perder un alimento por que se multiplican en él, utilizan nutrientes, producen modificaciones y por que le comunican sabores desagradables mediante el desdoblamiento de determinadas sustancias o mediante la síntesis de nuevos compuestos, con el fin de evitar estos reducimos al mínimo el contacto entre los microorganismos y los alimentos, también se eliminan los microorganismos que contiene, o por lo menos adaptamos las condiciones de su almacenamiento para evitar que en ellos se multipliquen los microorganismos (Frazier, *et al.*, 1993).

---

Los alimentos pueden transferir una amplia gama de enfermedades al ser humano. En las infecciones alimentarias, los alimentos actúan de vehículo transmisor del patógeno al consumidor, el cual el microorganismo se multiplica y puede provocar posteriormente la enfermedad. En las intoxicaciones alimentarias, el patógeno se multiplica en los alimentos y produce toxinas que pueden afectar al consumidor (Prescott, *et al.*, 2004).

Cuando se trata de microorganismos patógenos, su asociación con nuestros alimentos es peligrosa desde el punto de vista de la salud pública. Algunos de nuestros alimentos toleraran la multiplicación de los microorganismos patógenos o, por lo menos, actuaran como vectores de los mismos, en este caso también intenta evitar que penetre y se multipliquen en nuestros alimentos o sean destruidos mediante algún tipo de tratamiento (Frazier, *et al.*, 1993).

Considerando lo antes mencionado en el presente estudio es realizar una investigación de la calidad sanitaria de las cafeterías del ITSON campus centro de Cd Obregón, para que de esta manera se pueda determinar si dicho establecimiento cumple con las especificaciones de la norma.

## **1.2 Justificación**

El deterioro de los alimentos es un problema importante en todas las sociedades. Esto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena de producción, transporte, conservación o preparación de un alimento. Las toxinas de patógenos alimentarios son una gran preocupación debida especialmente al incremento del comercio internacional y los largos periodos de conservación antes de su consumo (Prescott, *et al.*, 2004).

Es de suma importancia realizar estudios de la calidad sanitaria de los alimentos debido a que con este se conocerá el control, higiénico que le aplican al alimento. Así mismo es relevante conocer la calidad higiénica de las superficies vivas e inertes debido a que estas son una de las fuentes principales de contaminación para los alimentos, además de diagnosticar la calidad sanitaria del lugar de estudio.

### **1.3 Objetivo general**

Evaluar la calidad sanitaria de la cafetería del ITSON campus centro de Cd. Obregón mediante técnicas microbiológicas de superficies vivas e inertes, medio ambiente, así como de alimentos con el fin de comprobar si cumple con las normas oficiales establecidas por la SSA (NOM-093-SSA1-1994).

### 1.3.1 Objetivos específicos

- Localizar los sitios de muestreo dentro de la cafetería del ITSON campus centro.
- Analizar superficies vivas e inertes donde se elaboran los alimentos y realizar la cuenta total viable para cuantificación de organismos mesófilos aerobios y coliformes totales por la técnica de vaciado en placa.
- Determinar el numero mas probable (NMP) de coliformes totales y fecales a la muestra de alimentos.
- Realizar cuanta total viable de organismos mesófilos aerobios, hongos y levaduras en alimentos por la técnica de vaciado en placa.
- Determinar la presencia de *Salmonella* en alimentos mediante su aislamiento e identificación por pruebas bioquímicas.
- Determinar bacterias mesófilas aerobias en medio ambiente por la técnica de placa abierta.
- Realizar un diagnóstico de las condiciones de higiene y limpieza del área de elaboración de los productos, comparando los resultados con las especificaciones microbiológicas establecidas para la norma NOM-093-SSA1-1994.

### **1.5 Hipótesis**

Las condiciones sanitarias de las cafeterías del ITSON campus centro de Cd. Obregón y los alimentos ahí preparados cumplen con las especificaciones de la norma NOM-093-SSA1-1994.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Seguridad alimentaría

Las cadenas de tratamiento de alimentos de la industria suelen ser entidades distintas que producen un solo alimento bajo control constante. En este tipo de funcionamiento se puede hacer un cuidadoso análisis de los riesgos microbiológicos y se puede aplicar un sistema de control interno eficaz para asegurar la calidad de los alimentos (Frazier, *et al.*, 1993).

Así mismo los principales objetivos que se persiguen al fijar los criterios microbiológicos para los distintos alimentos consisten en garantizar: 1) que los alimentos serán aceptables desde el punto de vista de la salud pública, es decir que no serán responsables de la difusión de enfermedades infecciosas ni de intoxicaciones alimentarias, 2) que los alimentos serán de calidad satisfactoria, es decir, que estarán compuestos por materias primas de buena calidad que no se han deteriorado ni se han contaminados indebidamente durante las operaciones de tratamiento, almacenamiento, manipulación o comercialización, 3) que los alimentos serán aceptables desde el punto de vista estético, en el sentido de que se ha evitado que se ensucien con materia fecal, con restos de parásitos, etc. y 4) que los alimentos tendrán la calidad de conservación que cabe esperar de cada uno de ellos (Frazier, *et al.*, 1993).

La inocuidad de los alimentos depende de la ausencia de bacterias que producen intoxicaciones alimentarias y también de que no se produzca una contaminación microbiana masiva resultante por lo general de un almacenamiento descuidado. Los alimentos limpios aparecen libre de suciedad visible y de alteración por bacterias; no todas las bacterias que alteran los alimentos provocan intoxicaciones alimentarias, pueden no determinar alteración visible aún estando presentes en gran número. El objetivo de la higiene de los alimentos es la producción y distribución de alimentos sanos (Hobbs, 1986).

### 2.1.1 Limpieza

La limpieza es un proceso en el que la suciedad se suspende o disuelve, generalmente en agua su eficacia se puede aumentar por aplicación de ciertas formas de energía, como fregado, duchado o agitación, por empleo de coadyuvantes químicos, conocidos genéricamente como agentes de tensión superficial al mismo tiempo que emulsionan o suspenden las diferentes clases de suciedad (ICMSF, 1980).

Así mismo la definen como a aquel proceso que pretende remover cualquier sustancia (suciedad) que no forme parte de la estructura o función de lo que esta siendo limpiado (García, *et al.*, 1997).

Las superficies que presentan contacto con los alimentos y las zonas relacionadas con ellos se deben limpiar frecuentemente para eliminar los residuos alimenticios, películas de grasa, depósitos minerales, polvo y demás elementos, que pueden proteger o nutrir a los microorganismos. La limpieza constituye un eficaz método de descontaminación, ya que aunque mas del 90% de los microorganismo se eliminan con la suciedad, pero no se garantiza la destrucción total de estos (ICMSF, 1980).

### 2.1.2 Desinfección

La desinfección es aquel proceso, encaminado a la eliminación de microorganismos por alteración de su estructura o de su metabolismo con el fin de impedir su transmisión a los alimentos (García, *et al.*, 1997).

Los agentes desinfectantes son aquellos agentes químicos capaces de reducir a niveles insignificantes, la tasa de patógenos y demás microorganismos. También se denominan a productos depuradores o de saneamiento de aguas, utillaje y equipo de las fábricas de alimentos, en el mercado minorista y en los establecimientos donde expendan alimentos (ICMSF, 1980).

La actividad germicida de estos depende de las condiciones de uso, como concentración, tiempo, temperatura, pH, dureza de las aguas, clase y cantidad de materia orgánica presente, características de la superficie, tipos y concentración de los microorganismos a destruir. Estos no solamente influyen en la eficacia de la desinfección, si no también en la rapidez con que estas soluciones rebajan su fuerza, lo que determina con frecuencia que sea necesario repetir la operación de desinfección (ICMSF, 1980).

## 2.2 Indicadores microbiológicos

Durante la formulación de estándares y reglamentaciones microbiológicas, se hizo evidente que no se podrían realizar ensayos para todos y cada uno de los patógenos entericos que podrían estar presentes en una muestra de alimento. Había que buscar un sustituto. A.von Fritsch de Alemania sugirió en 1880 que ciertas *klebsiellae* eran características del agua contaminada con heces humanas. Cinco años después T. Escherich descubrió una bacteria fecal, *bacillus coli* (ahora denominada *Escherichia coli*) y en 1892 F. Schardinger sugirió que *E.coli.* sería útil como microorganismo indicador de contaminación fecal (Doyle, *et al.*, 1997).

### 2.2.1 Microorganismos indicadores

Los criterios microbiológicos para evaluar la seguridad sanitaria de los alimentos utilizan ensayos de microorganismo indicadores que sugieren la posibilidad de un riesgo microbiológico (Doyle, *et al.*, 1997).

En los criterios microbiológicos pueden emplearse microorganismos indicadores. Estos criterios podrían utilizarse para evaluar la calidad de un producto ya existente o para predecir la vida útil de un alimento. Se ha sugerido que el indicador ideal de la calidad o vida útil de un producto debería cumplir con los siguientes requisitos:

- Deberá estar presente y ser detectable en todos los alimentos cuya calidad va evaluarse.
- Su crecimiento y recuento deberá mostrar una correlación alta y negativa con la calidad del producto.
- Deberá ser fácil de detectar y cuantificar y ser claramente distinguibles de otros microorganismos.
- Deberá contarse rápidamente, idealmente en una jornada de trabajo.
- Su crecimiento no deberá afectar adversamente al resto de sus componentes de la flora del alimento (Doyle, *et al.*, 1997).

### 2.2.2 Criterios microbiológicos para los alimentos

Se puede emplear el número o el tipo de microorganismo presentes en o sobre un alimento para evaluar su calidad y seguridad microbiológica. La seguridad se determina por la presencia o ausencia de microorganismos patógenos o sus toxinas, por el número de patógenos, y por el control o destrucción esperado de estos agentes.

Según Doyle *et al.*, (1997) los ensayos con microorganismos indicadores pueden utilizarse para determinar la calidad o seguridad microbiológica siempre que previamente se haya establecido una relación entre la presencia del organismo

indicador y la presencia probable de un patógeno o una toxina. Normalmente los criterios microbiológicos se emplean para evaluar:

- La seguridad de un alimento.
- La implementación de Buenas Prácticas de Fabricación.
- El mantenimiento de la calidad (vida útil de ciertos productos perecederos).
- La utilidad (adecuación de un alimento o un ingrediente para un propósito determinado).

### 2.3 Microorganismos comunes

La microbiología es el estudio de los microorganismos y sus actividades, su forma, estructura, reproducción, fisiología, metabolismo e identificación, como están distribuidos en la naturaleza, sus relaciones con otros seres, los efectos benéficos o perjudiciales que ejercen sobre los humanos y las alteraciones físicas y químicas que provocan en su medio (Pelczar, 1982).

Un microorganismo es un organismo que es demasiado pequeño para ser visto directamente por el ojo humano, como los objetos inferiores a un milímetro y no pueden observarse claramente. Dentro de ellos se encuentran los virus, bacterias, algas, hongos y protozoos. Sin embargo, otros miembros de estos grupos particularmente algunos de algas y hongos son mas grandes y bastantes visibles (Prescott, *et al.*, 2002).

#### 2.3.1 Coliformes

Los organismos coliformes constituyen un grupo heterogéneo con hábitat primordialmente intestinal para la mayoría de las especies que involucra. A fin de simplificar su manejo para su determinación, se ha establecido una definición en base a las características mas constantes que exhibe la especie tipo del grupo, *Escherichia coli* (IPN, 1993).

Los coliformes son bacilos gram-negativos asporogenos que fermentan la lactosa en 48 horas y producen colonias negras con brillo metálico en agar tipo endo. Por

lo general los coliformes están representados por cuatro géneros de la familia Enterobacteriaceae: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*. *E.coli* es mas indicativo de contaminación fecal que los demás géneros y especies indicativos, con frecuencia es deseable determinar su incidencia en una población de coliformes. El método clásico usado es la formula IMVIC (Jay, 2000)

De modo igual que otras bacterias patógenas gram-negativas los coliformes crecen bien en una gran cantidad de medios y en muchos alimentos. Se ha dicho que crecen a temperaturas tan bajas como  $-2^{\circ}\text{C}$  y tan elevadas como  $50^{\circ}\text{C}$ . En los alimentos el crecimiento es escaso o muy lento a  $5^{\circ}\text{C}$ , aunque varios investigadores han indicado el crecimiento de coliformes a 3 a  $6^{\circ}\text{C}$ . Se ha informado que los coliformes crecen en el intervalo de pH de 4.4 a 9.0 (Jay, 2000).

### **2.3.2 Coliformes fecales**

Los coliformes fecales, incluyendo a *E.coli* se destruyen fácilmente por el calor y pueden morir durante la congelación y el almacenamiento en estado congelado de los alimento. Los criterios microbiológicos que emplean *E.coli* son útiles en aquellos casos en los que se desea determinar si ha ocurrido contaminación fecal. Los coliformes fecales tienen mayor probabilidad de contener microorganismos de origen fecal que los coliformes, que comprenden tanto microorganismo de origen fecal como microorganismo de origen no fecal. Los coliformes fecales pueden llegar a establecerse sobre el equipo y los utensilios de los ambientes de la industria alimentaría y contaminar alimentos procesados (Doyle, 1997).

### **2.3.3 Organismos mesófilos aerobios**

Los microorganismos mesófilos crecen a una temperatura óptima de 20 a  $45^{\circ}\text{C}$ , siendo la mínima de 15 a  $20^{\circ}\text{C}$ , y la máxima de casi  $45^{\circ}\text{C}$ . La mayoría de los microorganismo pertenecen a esta categoría, casi todos los agentes patógenos humanos son mesófilos, como es de esperar, pues la temperatura corporal humana es, casi de forma constante, de  $37^{\circ}\text{C}$  (Prescott, 2004).

La mayoría de los alimentos industrializados (Excepto, por ejemplo productos fermentados) deben ser considerados como inadecuados, para el consumo cuando contienen un gran número de microorganismos, aún cuando estos microorganismos no sean conocidos como patógenos y no hayan alterado de forma apreciable los caracteres organolépticos del alimento. Recuentos altos en alimentos estables a menudo indican materias primas contaminadas, la presencia de un número elevado de bacterias aerobias mesófilas significa que pueden haberse dado condiciones favorables a la multiplicación de los microorganismos patógenos de origen humano animal (ICMSF, 1982).

#### **2.3.4 Hongos y Levaduras**

Los hongos y levaduras crecen más lentamente que las bacterias en los alimentos no ácidos que conservan humedad y por ello pocas veces determinan problemas en tales alimentos. Sin embargo en los alimentos ácidos y en baja actividad de agua, crecen con mayor rapidez que las bacterias, determinando por ello importantes pérdidas por alteración de frutas frescas y jugos, vegetales, y quesos (ICMSF, 1982).

Además, existe el peligro potencial de producción de micotoxinas por parte de los mohos. Para eliminar o reducir tales problemas los manipuladores de alimentos susceptibles de enmohecimiento deberán:

- Reducir la carga de esporas, observando Buenas Prácticas de Fabricación.
- Reducir los tiempos de almacenamiento.
- Eliminar o reducir el contacto con el aire mediante envasados.
- Calentar el alimento en su envase final para destruir las células vegetativas y las esporas (ICMSF, 1982).

## 2.4 Bacterias productoras de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's)

Existen cuatro grupos principales de bacterias productoras de infecciones entericas humanas transmitidas por los alimentos: *Salmonella*, *Shigella*, *E.coli enteropatogena* y grupos *Vibrio* (ICMSF, 1982).

### 2.4.1 *Salmonella*

La salmonelosis constituye un problema de salud, no solo en México sino en todos los países del mundo. En México las enteritis y otras enfermedades diarreicas ocupan el segundo lugar en causas de mortalidad, siendo el grupo más afectado el comprendido entre los cero y cuatro años de edad. Se requiere que la vigilancia y el control epidemiológico de estas enfermedades transmisibles sean muy eficaces, lo cual demanda de un conocimiento exacto de la naturaleza del agente causal. Los alimentos más frecuentemente involucrados son: productos cárnicos, lácteos, pescados y verduras (IPN, 1993).

Con respecto a los síntomas clínicos, modo de difusión y patogénica la salmonelosis puede ser convenientemente dividida en dos grupos principales, 1) las fiebres tifoideas y paratifoideas, producidas por *S.typhi*, y *S. parathypi* A, B y C y 2) las infecciones entericas producidas por las otras *Salmonellas* (ICMSF, 1982).

La salmonelosis producidas por el otro grupo de *Salmonella* es una infección gastrointestinal, a veces complicada por una extensión septicémica a localizaciones fuera del tracto intestinal, los síntomas gastrointestinales se caracterizan por fiebre, diarrea, dolores intestinales y vomito (ICMSF, 1982).

### 2.4.2 *Shigella*

El género *Shigella* está formado por bacterias Gram negativas aerobias no esporuladas, no móviles y está constituido por cuatro especies que son *S. disenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei* (IPN, 1993).

Las *Shigellas* no se encuentran inicialmente en los alimentos. No obstante, determinan brotes de enterocolitis (shigelosis) y se transmiten a través de los alimentos o del agua contaminados por excretores humanos. La shigelosis es producida por miembros del género *Shigella*. Es difícil determinar la existencia en los alimentos, y más fácil demostrar su presencia en muestras clínicas. El modo de difusión de estos gérmenes por los alimentos ha sido muy poco estudiado. El agua y la leche son los alimentos más comúnmente contaminados (ICMSF, 1982).

Esta bacteria afecta principalmente a niños, sobre todo aquellos que viven en condiciones higiénicas reprobables, que generalmente pertenecen a estratos socioeconómicos muy bajas por lo que no cuentan con las condiciones o facilidades para llevar a cabo las medidas de higiene personal más elementales (IPN, 1993).

Se ha descrito que el género *Shigella* es inhibido fuertemente por la presencia de otros microorganismos (principalmente los microorganismos coliformes) que pudieran encontrarse en los alimentos en número elevado. El microorganismo es muy sensible a pH ácido, sensible a la presencia de conservadores (benzoato de sodio), así como a la congelación; por lo que es recomendable que los alimentos sospechosos (ensaladas de frutas, verduras, puré de papa y productos crudos) de la presencia de *Shigella* se analicen lo más rápido posible (IPN, 1993).

#### **2.4.3 Pruebas bioquímicas**

Las pruebas bioquímicas consisten en determinar la actividad de la vía metabólica de los distintos microorganismos presentes.

- **Aprovechamiento del citrato**

Esta prueba sirve para determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de carbono en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio. Entre las enterobacterias estas características se dan en los siguientes géneros: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* y algunas especies de *Salmonella*.

Sin embargo, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* son incapaces de crecer con esos nutrientes (Mac Faddin, 1984).

- **Reacción de Vogues Proskauer y Rojo de Metilo**

Prueba de vogues Proskauer: Se basa en la producción del acetilmetilcarbinol (acetoina) un producto final neutro derivado del producto de la glucosa. Esta es metabolizada en ácido piruvico, intermediario primario de la glucólisis. La producción de acetoina es uno de los ciclos utilizados para la degradación de la glucosa en las bacterias (Mac Faddin, 1984).

La prueba de rojo de metilo se basa en un indicador de pH que es el rojo de metilo, para determinar la concentración de iones hidrógenos, presentes cuando un organismo fermenta la glucosa. La concentración de hidrógenos depende de la relación gaseosa ( $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ ) que a su vez es un índice de los diferentes ciclos del metabolismo de la glucosa que muestran diversos organismos (Mac Faddin, 1984).

- **Prueba de la licuefacción de la gelatina**

Se incorpora gelatina en diversos medios para determinar la capacidad de un organismo para producir enzimas del tipo proteolíticas que a su vez, son detectadas por la digestión o licuefacción de la gelatina presentes. El medio de gelatina nutritiva para función no es conveniente para las pruebas de rutina de la actividad de la gelatinasa, dado que muchas especies requieren de una licuefacción prolongada antes de que parezcan muestras de licuefacción (Mac Faddin, 1984).

- **Prueba del indol**

Mediante esta prueba se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano. Dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptofano mediante la enzima triptofanasa (Mac Faddin, 1984).

- **Prueba de la oxidasa**

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana (Mac Faddin, 1984).

- **Prueba de la catalasa**

La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocrom; la excepción principal es el *Streptococcus*. Por lo general los organismos que no poseen este sistema "citocromo" carecen también de la enzima catalasa y por lo tanto no pueden descomponer el peróxido de hidrógeno. La mayoría de las especies anaerobias por ejemplo *Clostridium* poseen la enzima peroxidasa en lugar de la catalasa (Mac Faddin, 1984).

- **Prueba de la ureasa**

Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción del enzima ureasa. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se usa sobre todo para diferenciar este género de otras enterobacterias que dan negativo o positivo retardado (Mac Faddin, 1984).

- **Fermentación de la lactosa**

Esta prueba se usa para diferenciar entre las enterobacterias en general y el grupo de las coliformes. Se trata por tanto de una prueba de gran importancia debido a que los coliformes se utilizan como organismos indicadores de contaminación fecal en análisis, sobre todo, de aguas (Mac Faddin, 1984).

- **Fermentación de la glucosa (alcalina/ácida)**

La primera forma de fermentación en AHK después de 18 a 24 h de incubación es un pico de flauta alcalino y una capa profunda ácida (alcalina/ácida). Esta reacción se observa en los organismos capaces de fermentar solamente la glucosa; son no fermentadores de lactosa. El pico de la flauta es alcalino (rojo), lo que indica que se ha producido la degradación aeróbica de la glucosa (Mac Faddin, 1984).

- **Prueba del malonato**

El malonato es un inhibidor enzimático. El ácido malónico inactiva la enzima por un proceso denominado inhibición competitiva. El ácido malónico se une a la enzima, encerrando así los sitios activos de manera que la enzima no puede combinarse con su sustrato normal, el ácido succínico. Esto ocasiona el bloqueo de la oxidación del ácido succínico (Mac Faddin, 1984).

- **Prueba de la movilidad**

Sirve para determinar si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos que se encuentran principalmente entre los bacilos aunque existen algunas formas de cocos móviles (Mac Faddin, 1984).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1 Zona de estudio y periodo de muestreo**

El área de estudio en la cual se llevó a cabo esta investigación fueron las instalaciones de la cafetería del ITSON campus centro de Cd. Obregón, realizando muestreos en el periodo de febrero-mayo de 2007. En la tabla 1. se muestra las fechas de muestreo.

**Tabla 1.** Fechas de muestreo.

<b>Muestreo</b>	<b>Fecha</b>
1	20 de febrero de 2007
2	27 de febrero de 2007
3	20 de marzo de 2007
4	27 de marzo de 2007
5	17 de abril de 2007
6	24 de abril de 2007
7	08 de mayo de 2007
8	14 de mayo de 2007

## 3.2 Toma de muestra

### 3.2.1 Superficies vivas

Para la toma de muestra para este análisis se requiere de matraces de 150 ml conteniendo 50 ml de solución buffer de fosfatos, pinzas y torundas previamente esterilizadas. La toma de muestra de superficies vivas se realiza en manos del personal que presenta contacto directo con el alimento. El procedimiento consiste, en tomar la torunda con una pinza, sumergirla en la solución buffer de fosfatos, se exprime en las paredes del matraz, después se limpia la superficie de toda la mano, frotando también la parte interna de los dedos y las uñas con la torunda, y por ultimo colocar la torunda dentro del matraz.

### 3.2.2 Superficies inertes

Para la toma de muestra para superficies inertes (tabla 2.) se utiliza una plantilla de aluminio de 25 cm<sup>2</sup> previamente estéril, la cual se coloca en el lugar de muestreo seleccionado. Se frota el área dentro de la plantilla, con una torunda, la cual anteriormente fue sumergida en solución buffer de fosfatos y se coloca la torunda en el matraz.

**Tabla 2.** Sitio de muestreo en superficies vivas e inertes.

<b>Numero de muestras</b>	<b>Origen</b>
1	Mesa
2	Mano I
3	Mano II
4	Cuchillo
5	Pared
6	Piso
7	Refrigerador

### 3.3 Transporte de las muestras

Las muestras recolectadas fueron transportadas en una hielera a una temperatura aproximada de 4°C al laboratorio de microbiología para posteriormente realizar el análisis.

### 3.4 Análisis microbiológicos de superficies vivas e inertes

#### 3.4.1 Cuenta total viable de mesófilos aerobios

Una vez tomada la muestra se realizan diluciones seriadas  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ , se utiliza la técnica de vaciado en placa; la cual consiste en colocar 1 ml de la muestra directa y de las diluciones en una placa estéril y rotulada, para después adicionar de 15 a 20 ml de Agar Estándar Métodos estéril, este debe estar a temperatura aproximada de 45°C soportable, después homogenizar con movimientos de derecha a izquierda sobre una superficie lisa. Dejar solidificar e incubar a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 a 48 horas. Una vez concluido el periodo de incubación continuar con el conteo de colonias en las placas seleccionando la caja petri que contenga entre 25 y 250 colonias y reportar como Unidades Formadoras de Colonias por centímetro cuadrado de superficie (UFC/cm<sup>2</sup> de superficie) (NOM-092-SSA1-1994).

#### 3.4.2 Cuanta total viable de coliformes totales

Una vez tomada la muestra se realizan diluciones seriadas  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ , se utiliza el método de vaciado en placa: el cual consiste en colocar 1 ml de la muestra directa y de las diluciones en una placa estéril y rotulada, para después adicionar de 15 a 20 ml de Agar Bilis Rojo Violeta, después homogenizar con movimientos de izquierda a derecha sobre una superficie lisa. Dejar solidificar y una vez así incubar a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Una vez cumplido el periodo de incubación llevar a cabo el conteo de colonias típicas color rosa y seleccionar aquella placa que contenga entre 25 a 250 colonias y reportar como UFC/cm<sup>2</sup> de superficie (NOM-113-SSA1-1994).

### 3.5 Análisis microbiológicos de Alimentos

#### 3.5.1 Cuenta total viable de mesófilos aerobios

Una vez tomada la muestra esta debe ser licuada 1 a 2 minutos en caso de ser necesario, posteriormente pesar 10 g y colocarlos en un frasco de diluciones con 90 ml de solución buffer de fosfato para así obtener la dilución  $10^{-1}$ , después realizar diluciones seriadas  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  en tubos de ensayo con 9 ml de solución buffer de fosfato. Después mezclar cuidadosamente el frasco y los tubos de diluciones para posteriormente inocular 1 ml en las cajas petri previamente estériles y rotuladas, después adicionar de 15 a 20 ml de Agar Estándar Métodos estéril, este debe estar a una temperatura aproximada de  $45^{\circ}\text{C}$ , después homogenizar con movimientos de derecha a izquierda sobre una superficie lisa. Dejar solidificar y una vez así incubar a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 a 48 horas. Al término del periodo de incubación contar las colonias en las placas, y seleccionar aquella que contenga entre 25 a 250 colonias. La cuantificación se realiza multiplicando el número de colonias por la inversa de la dilución. Se reporta como Unidades Formadoras de Colonias por gramo o mililitro (UFC/g o ml) (NOM-092-SSA1-1994).

#### 3.5.2 Cuanta total viable de hongos y levaduras

Una vez tomada la muestra esta debe ser licuada por un tiempo de 1 a 2 minutos en caso de ser necesario. Posteriormente pesar 10 g y añadirlos a un frasco de diluciones con 90 ml de solución buffer de fosfato para así obtener la dilución  $10^{-1}$ , continuar realizando diluciones seriadas  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  en tubos de ensayo con 9 ml de solución buffer de fosfato. Mezclar cuidadosamente el frasco y los tubos de diluciones para inocular con 1 ml de estas las cajas petri previamente estériles y rotuladas. Adicionar de 15 a 20 ml de Agar Dextrosa de Papa, este debe estar estéril a temperatura aproximada de  $45^{\circ}\text{C}$  soportable, después homogeneizar con movimientos de derecha a izquierda sobre una superficie lisa. Dejar solidificar e incubar a una temperatura de  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 a 48 horas. Una vez llevado a cabo el periodo de incubación seleccionar aquella placa que

contenga entre 25 a 250 colonias, multiplicar por la inversa de la dilución y reportar como UFC/g o ml (NOM-111-SSA1-1994).

### **3.5.3 Numero más probable (NMP) de coliformes totales y fecales por la técnica de fermentación de tubos múltiples en alimentos**

Tomar 10 ml o 10 g y diluirlos en 90 ml de solución buffer de fosfato para obtener así la dilución  $10^{-1}$ , después transferir 1 ml de esta dilución a 9 ml. De solución buffer de fosfato para obtener así la dilución  $10^{-2}$ , de esta dilución transferir 1 ml a 9 ml de buffer de fosfatos para formar la dilución  $10^{-3}$ .

#### **3.5.3.1 Prueba presuntiva**

Inocular tres tubos conteniendo 10 ml de caldo lauril sulfato triptosa y campana Durham, con 1 ml de cada dilución. Esto se realiza por triplicado. Incubar los tubos a  $35 \pm 2$  °C durante  $48 \pm 2$  horas. Posteriormente observar los tubos a las  $24 \pm 2$  horas y observar se hay presencia de gas en la campana de fermentación y turbidez en el medio, si no hay presencia seguir incubado hasta las  $48 \pm 2$  horas. La presencia de gas y turbidez en cualquier cantidad, dentro del tiempo de incubación hace positiva la prueba.

#### **3.5.3.2 Prueba confirmativa para coliformes totales**

Agitar suavemente los tubos de caldo lauril sulfato triptosa, que resultaron positivos en la prueba presuntiva, transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo a tubos con caldo bilis verde brillante conteniendo campana de Durham. Posteriormente incubar los tubos inoculados a  $35 \pm 2$  °C durante 48 horas. Considerar la prueba positiva si hay turbidez y formación de gas en cualquier cantidad y determinar el número de organismos coliformes de acuerdo con la tabla 3. Tomando como base el numero de tubos en que se observe producción de gas y turbidez (NOM-112-SSA1-1994).

### 3.5.3.3 Prueba confirmativa para coliformes fecales

Agitar suavemente los tubos de caldo lauril sulfato triptosa, que resultaron positivos en la prueba presuntiva, y transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo a tubos con caldo EC (Eijkman) con campana Durham. Posteriormente incubar a  $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  en baño de agua y observar si hay producción de gas y turbidez durante 18 a 24 horas, la presencia de estos hace positivo la prueba. Determinar el número de organismos coliformes de acuerdo con la tabla 3.

**Tabla 3.** Número más probable de microorganismo y límite de confianza para diferentes combinación de tubos positivos cuando se inoculan tres tubos con 1 ml de la disolución 1:10 ( $10^{-1}$ ), tres con 1 ml de la disolución 1:100 ( $10^{-2}$ ) y tres de la disolución 1:1000 ( $10^{-3}$ ) de la muestra.

Combinación de tubos positivos			NMP/g o ml de muestra	Límites de confianza al 99%		Límites de confianza al 95%	
				Inferior	Superior	Inferior	Superior
0	1	0	3.0	<1.0	23.0	<1.0	17.0
1	0	0	4.0	<1.0	28.0	1.0	21.0
1	0	1	7.0	1.0	35.0	2.0	27.0
1	1	0	7.0	1.0	36.0	2.0	28.0
1	2	0	11.0	2.0	44.0	4.0	35.0
2	0	0	9.0	1.0	50.0	2.0	38.0
2	0	1	14.0	3.0	62.0	5.0	48.0
2	1	0	15.0	3.0	65.0	5.0	50.0
2	1	1	20.0	5.0	77.0	8.0	61.0
2	2	0	21.0	5.0	80.0	8.0	63.0
3	0	0	23.0	4.0	177.0	7.0	129.0
3	0	1	40.0	10.0	230.0	10.0	180.0
3	1	0	40.0	10.0	290.0	20.0	210.0
3	1	1	70.0	20.0	370.0	20.0	280.0
3	2	0	90.0	20.0	520.0	30.0	390.0
3	2	1	150.0	30.0	660.0	50.0	510.0
3	2	2	210.0	50.0	820.0	80.0	640.0
3	3	0	200.0	100.0	1,900.0	100.0	1,400.0
3	3	1	500.0	100.0	3,200.0	200.0	2,400.0
3	3	2	1,100.0	200.0	6,400.0	300.0	4,800.0

Fuente: Fernández, 1981

### 3.5.4 Determinación de *Salmonella sp.* en alimentos

Pesar 15 g de muestra y colocarlos en 125 ml de caldo Selenito Cistina, mezclarlo e incubarlo a 35°C por 24 ± 2 horas esto para enriquecer la muestra. Posteriormente sembrar en cajas con agar SS por agotamiento e incubar a 35 ± 1 °C por 24 ± 2 horas para llevar a cabo el aislamiento de colonias típicas. Examinar las placas y observar si hay presencia de colonias típicas (colonias transparentes, o con un punto negro en el centro) de *Salmonella*, si hay presencia de estas realizar pruebas bioquímicas.

#### 3.5.4.1 Identificación por pruebas bioquímicas

- **Oxidasa y catalasa**

- **Oxidasa:**

Se toma un poco de muestra y se coloca en las placas reactivas “Dry slide oxidase”, se espera 20 segundos.

Prueba positiva: Color púrpura dentro de los 20 segundos.

Prueba negativa: No se presenta cambio de color.

- **Prueba de la catalasa**

Se realiza en un porta objetos colocando una colonia y añadiendo una gota de peróxido de hidrógeno al 3%, la interpretación de la prueba es:

Prueba positiva: Formación inmediata de burbujas bien visibles.

Prueba negativa: No hay formación de burbujas.

- **Prueba de movilidad, producción de indol y ácido sulfhídrico**

En esta prueba se utiliza el medio SIM, vertical, es sembrado por picadura en el centro del tubo perpendicular a la base; se incuba 24 horas a 35 ± 2°C, la interpretación es de la siguiente manera:

- Movilidad:

Prueba positiva: Crecimiento a lo largo de la punción y en el seno del medio de cultivo.

Prueba negativa: Crecimiento lo largo de la punción exclusivamente.

- Producción de ácido sulfhídrico:

Prueba positiva: Desarrollo de un color negro a lo largo de la punción que puede extenderse a todo el medio.

Prueba negativa: Ausencia de color negro.

- Producción de indol:

Adicionar al cultivo en medio SIM que presente crecimiento, 5 gotas de éter, para extraer el indol y gotas de reactivo de Kovac.

Prueba positiva: Desarrollo de un anillo de color rojo.

Prueba negativa: sin cambio de color.

- **Prueba de movilidad, producción de indol y ornitina**

El medio utilizado para esta prueba es MIO, que es vertical y es sembrado por picadura en el centro del tubo, perpendicular a la base, es incubado a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas, los resultados se interpretan de la siguiente manera:

- Movilidad:

Prueba positiva: Crecimiento a lo largo de la punción y en el seno del medio de cultivo.

Prueba negativa: Crecimiento solo en picadura.

- Descarbolixación de la ornitina:

Prueba positiva: Cambio de color en el medio de violeta a púrpura.

Prueba negativa: Presencia de color amarillo en el medio.

- Producción de indol.

Adicionar al tubo con medio MIO que presente crecimiento, 5 gotas de éter para extraer el indol y 5 gotas de reactivo de Kovac.

Prueba positiva: Desarrollo de un anillo de color rojo.

Prueba negativa: Sin cambio de color.

- **Aprovechamiento de la Lisina**

Para el aprovechamiento de lisina se utiliza el medio Agar de hierro y lisina (LIA), es un medio vaciado en forma inclinada en el tubo y se inocula por picadura en el fondo y estrías en la superficie, es incubado a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 a 2 horas, los resultados se interpretan de la siguiente manera:

- Descarboxilación positiva: Fondo de color púrpura.
- Descarboxilación negativa: Fondo del tubo color amarillo
- Desaminación positiva: Superficie del tubo de color rojo.
- Desaminación negativa: Superficie púrpura o sin cambio de color.

- **Utilización del carbono de glucosa y lactosa, producción de gas y ácido sulfhídrico**

El agar hierro triple azúcar (TSI) es utilizado para esta prueba lo cual es sembrado por picadura en el fondo y por estrías en la superficie, es incubado a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, la interpretación se manifiesta de la siguiente manera:

- Fermentación de la glucosa:

Prueba positiva: Se observa un color amarillo en el fondo y un color rojo en la superficie.

Prueba negativa: No hay cambio de color.

- Fermentación de la lactosa:

Prueba positiva: Se observa un color amarillo en la superficie inclinada y un color rojo en el fondo.

Prueba negativa: No hay cambio de color.

- Producción de gas:

Prueba positiva: Se manifiesta mediante burbujas en el medio o una sola burbuja.

Prueba negativa: No hay presencia de burbujas en el medio.

- Producción de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S):

Prueba positiva: La presencia de un precipitado de color negro.

Prueba negativa: No se observa precipitado de color negro.

- **Utilización de malonato**

El caldo Malonato de Edwing es utilizado para realizar esta prueba, el cual es inoculado por medio de una asada simple y es incubado a  $35 \pm 2$  por  $40 \pm 2$  horas, los resultados son los siguientes:

Prueba positiva: Desarrollo de color azul.

Prueba negativa: Sin cambio de color.

- **Prueba de fermentación de carbohidratos**

Esta prueba es realizada en medio OF, en el cual se inoculan dos tubos por picadura profunda, la cual a uno de ellos se le agrega 1 ml de aceite mineral y se incuba a  $35 \pm 2$  por  $48 \pm 2$  horas, resultados:

Prueba positiva: Cambio de color del medio a amarillo.

Prueba negativa: No hay cambio de color.

- **Prueba de la hidrólisis de la gelatina**

El medio gelatina nutritiva es sembrado por picadura y se lleva a incubación a  $24 \pm 2$  °C por  $48 \pm 2$  horas, y se refrigera durante 20 minutos, la interpretación se da de la siguiente manera:

Prueba positiva: Si existe licuefacción.

Prueba negativa: La gelatina permanece sólida.

- **Aprovechamiento del nitrógeno de la urea**

Esta prueba se realiza en caldo Urea, el cual es inoculado por asada simple e incubado a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por  $48 \pm 2$  horas, la prueba se interpreta de la siguiente manera:

Prueba positiva: Viraje a color rosado.

Prueba negativa: No hay cambio de color.

- **Prueba de rojo de metilo y Voges – Proskauer**

Esta prueba se realiza en caldo RM-VP y la inoculación se lleva a cabo por medio de una asada simple y es incubado a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 72 a 120 horas; y los resultados son los siguientes:

- Prueba Voges Proskauer

Adicionar 0.6 ml de solución de alfa naftol.

Adicionar 0.2 ml de solución de hidróxido de potasio 40%.

Interpretar los resultados después de incubar por 2 horas a  $35 \pm 2$  horas o 4 horas a temperatura ambiente.

Prueba positiva: Desarrollo de color rojo ladrillo.

Prueba negativa: Sin cambio de color.

- Prueba de Rojo de Metilo (RM)

Adicionar al medio de cultivo de 96 horas de incubación de 2 a 3 gotas de solución de rojo de metilo. Interpretar los resultados inmediatamente de la siguiente manera:

Prueba positiva: Desarrollo de color rojo.

Prueba negativa: Desarrollo de color amarillo.

- **Utilización del carbono de citrato de sodio**

Para llevar a cabo esta prueba se utiliza el medio de cultivo agar citrato de Simmons (inclinado), este es inoculado por picadura en el fondo y por estrías en la superficie, se incuba a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 96 horas.

Prueba positiva: Cambio de color en el medio de verde a azul intenso.

Prueba negativa: No hay cambio de color.

(Castro, 2001)

En la tabla 4 se indican las pruebas bioquímicas para *Salmonella*.

**Tabla 4.** Pruebas bioquímicas para *Salmonella*.

<b>Pruebas Bioquímicas</b>	<b><i>Salmonella sp.</i></b>
Oxidasa	-
Catalasa	+
SH <sub>2</sub>	V <sup>+</sup>
Fermentación de glucosa	+
Fermentación de lactosa	-
Indol	-
Rojo de metilo	+
Voges-Proskauer	-
Citrato de Simmons	V <sup>+</sup>
Malonato	-
Ureasa de Christensen	-
Motilidad	V <sup>+</sup>
Licuefacción de gelatina 22°C	-
Lisina descarboxilasa	+
Ornitina descarboxilasa	-
Producción de gas	V
O-F de glucosa	O/F

Fuente: (IPN, 1993)

**(-) = Negativo**

**(+) = Positivo**

**(V) = Variable (-) ó (+)**

### 3.6 Determinación de bacterias mesófilas aerobias en medio ambiente (técnica de placa abierta)

Preparar cajas petri con 15 a 20 ml de Agar Estándar Métodos, incubarlas durante 24 horas para prueba de esterilidad, posteriormente colocar las cajas en puntos estratégicos para el análisis, abrir las cajas y mantener la exposición de esta por 15 minutos, después cerrar las cajas e incubarlas a  $35 \pm 2$  °C por 24 a 48 horas, realizar el conteo y reportar como UFC/placa/15minutos (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998). En la tabla 5. Se indican los sitios de muestreo de medio ambiente.

Tabla 5. Sitio de muestreo en medio ambiente

Numero de muestras	Origen
1	Mostrador
2	Barra (adentro)
3	Baño
4	Mesa
5	Refrigerador

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

A continuación se muestran y se discuten los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos realizados a 56 muestras de superficies vivas e inertes, además de 40 muestras para medio ambiente, así como 16 muestras de diferentes alimentos, elaborados en la cafetería del ITSON campus centro de Cd. Obregón, obteniendo los siguientes resultados.

#### 4.1 Recuento de microorganismos mesófilos aerobios en superficies vivas e inertes

En la tabla 6 se muestran los resultados de la cuenta total viable de organismos mesófilos aerobios en superficies vivas e inertes. Para este indicador se encontró que el 97.5% de las muestras de superficies inertes cumplen con las especificaciones de norma oficial de la secretaria de salud, la cual indica <400 UFC/cm<sup>2</sup> de superficie inertes y para superficies vivas <3000 UFC/superficie (NOM-093-SSA1-1994). Cabe mencionar que solamente una muestra fue la que sobrepaso la norma, la cual fue tomada del cuchillo. Así mismo es importante señalar que el 100% de las muestras de superficies vivas cumplen con las especificaciones antes mencionadas. Esto nos indica que se lleva a cabo un buen proceso de manipulación e higiene en el establecimiento. Fernández (1993), menciona que el recuento de este tipo de microorganismos es de bastante utilidad debido a que puede ser considerado como un indicador de las condiciones higiénicas en que ha sido manejado el producto y de la presencia de microorganismos patógenos.

**Tabla 6.** Cuenta total viable de organismos mesofílicos aerobios en superficies vivas e inertes en la cafetería del ITSON campus centro Cd. Obregón

Superficies inertes	Muestreo (UFC/cm <sup>2</sup> de superficie)								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
Cuchillo	47	70	44	* 636	3	68	9	16	
Mesa	0	0	0	0	1	1	0	0	
Pared	0	0	0	1	0	0	0	0	
Refrigerador	0	9	0	8	4	3	1	0	
Piso	0	0	0	0	0	0	1	0	
Superficies vivas	Muestreo (UFC/cm. de superficie)								
	Mano I	213	95	307	104	16	72	442	241
	Mano I	790	62	510	25	308	N.M	44	N.M

Especificaciones NOM-093-SSA1-1994: Superficies inertes <400UFC/cm<sup>2</sup> de superficie; Superficies vivas <3000UFC/superficie.

N.M: No Muestreado

\*Fuera de norma

## 4.2 Recuento de organismos coliformes totales en superficies vivas e inertes

En la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos en la cuenta total de coliformes totales en superficies vivas e inertes. Para este indicador se encontró que el 100% de los sitios muestreados cumplen con las especificaciones de la Secretaría de Salud (SSA), la cual establece para coliformes totales en superficies vivas <10 UFC/superficie y para superficies inertes <200/cm<sup>2</sup> de superficie. (NOM-093-SSA1-1994). Es importante mencionar que estos resultados se deben principalmente a las medidas higiénicas que se aplican en el establecimiento como es la limpieza constante del establecimiento. La mayoría de los alimentos según Fernández (1983), en los casos que en que estos reciben un tratamiento térmico vigoroso, la flora presente es casi destruida en su totalidad, dando como resultado un producto de bajo riesgo a la salud.

**Tabla 7.** Cuenta total viable de coliformes totales en superficies vivas e inertes en la cafetería del ITSON campus centro Cd. Obregón.

Superficies inertes	Muestreo (UFC/cm <sup>2</sup> de superficie)							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Cuchillo	7	6	0	2	0	2	0	0
Mesa	0	0	0	0	0	0	0	0
Pared	0	0	0	0	0	0	0	0
Refrigerador	0	0	0	0	0	0	0	0
Piso	0	0	0	0	0	0	0	0
Superficies vivas	Muestreo (UFC/cm. de superficie)							
Mano I	0	0	0	0	0	0	0	0
Mano I	0	0	0	0	0	N.M	0	N.M

Especificaciones NOM-093-SSA1-1994: Superficies inertes <200UFC/cm<sup>2</sup> de superficie; Superficies vivas <10 UFC/superficie.

**N.M: No Muestreado**

## 4.3 Recuento de microorganismos mesófilos aerobios en medio ambiente

En la tabla 8 se puede observar la presencia de organismos mesófilos aerobios en medio ambiente en el rango de 0 a 36 UFC/placa/15min. en los sitios estudiados, los cuales nos indica una baja cifra de estos en la mayoría de los

sitios, es importante mencionar que estos resultados se deben principalmente a que no hay presencia de corrientes de aire dentro del establecimiento las cuales puedan afectar el medio ambiente interno del mismo. Existen áreas que son un poco más difíciles de controlar como es el caso del baño y el mostrador, esto por que fueron los sitios donde se presentaron los conteos más altos, ya que son lugares en donde hay una mayor fuente de contaminación, aun con esto se considera un ambiente limpio.

**Tabla 8.** Cuenta total de microorganismos mesófilos aerobios en medio ambiente de la cafetería del ITSON campus centro Cd. Obregón

Sitios	Muestreo (UFC/placa/15min.)							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Mostrador	18	10	6	18	34	13	12	6
Barra (adentro)	4	8	12	3	7	11	22	11
Baño	8	23	C.M	22	16	36	36	29
Mesa	10	15	4	13	11	8	12	4
Refrigerador	0	0	0	1	3	1	2	7

C.M: Crecimiento Masivo

#### 4.4 Recuento de microorganismos mesófilos aerobios en alimentos

La producción de alimentos seguros exige la colaboración de todo el personal, desde los operarios de limpieza de la planta hasta la gerencia (Forsythe, 2000). En la tabla 9 se indican los resultados encontrados de organismos mesófilos aerobios en alimentos. Se encontró que el 100% de las muestras analizadas cumplen con las especificaciones de la Secretaria de Salud, debido a que el rango en los resultados fue de 0 a 148,000 UFC/g, cumpliendo así con la NOM-093-SSA1-1994, la cual especifica como limite máximo la cantidad de 150,000 UFC/g para alimentos cocidos y ensaladas. Este parámetro es de suma importancia llevarlo a cabo debido a que es utilizado como indicador de microorganismos patógenos así como de las condiciones higiénicas con que ha sido manejado el producto (Fernández, 1993).

**Tabla 9.** Cuenta total viable de microorganismos mesófilos aerobios (UFC/g) en alimentos de la cafetería del ITSON campus centro Cd. Obregón

Muestreo	Alimentos			
	1		2	
I	Fríjol	80	Ensalada	1560
II	Arroz	840	Pollo cocido	40
III	Sándwich	1980	Fríjol	630
IV	Cochinita	0	Sopa espagueti	20
V	Quesadilla	30	Fríjol	148, 000
VI	Papas cocidas	280	Sopa fideos	370
VII	Fríjol	60	Cabeza	90
VIII	Cochinita	100	Fríjol	1050

Especificaciones NOM-093-SSA1-1994:  
Alimentos cocidos y ensaladas 150, 000 UFC/gr.

#### 4.5 Recuento de hongos y levaduras en alimentos

El recuento de hongos y levaduras puede referirse a fragmentos de micelios de hongos que se ha desarrollado en el alimento. En primer caso puede usarse para conocer la calidad de la materia prima utilizada en la fabricación de un producto, habitualmente de naturaleza vegetal. (IPN, 1993). En la tabla 10 se muestran los resultados de la cuenta total viable de hongos y levaduras, donde se puede observar una baja incidencia de estos (0 a 1310 UFC/g) en la mayor parte de los muestreos, esto refleja una buena manipulación en la elaboración de los alimentos así como de las buenas prácticas de higiene que se llevan a cabo, además de la buena calidad de la materia prima utilizada.

**Tabla 10.** Cuenta total viable de hongos y levaduras (UFC/g) en alimentos de la cafetería del ITSON campus centro Cd. Obregón

Muestreo	Alimentos			
	1		2	
I	Fríjol	0	Ensalada	100
II	Arroz	0	Pollo cocido	0
III	Sándwich	740	Fríjol	120
IV	Cochinita	0	Sopa espagueti	0
V	Quesadilla	0	Fríjol	1310
VI	Papas cocidas	200	Sopa fideos	0
VII	Fríjol	0	Cabeza	0
VIII	Cochinita	60	Fríjol	520

#### 4.6 Número más probable (NMP) de coliformes totales y fecales en alimentos

Los coliformes tienen un valor probado como indicadores de inocuidad (Jay, 1994). En la tabla 11 se puede observar el número más probable de coliformes totales y fecales, en donde se encontró que ninguna de las muestras sobrepasa las especificaciones de la secretaria de salud, el rango que se presentó en alimentos cocidos fue de 0 a 9 NMP/g y de 0 a 23 NMP/g en ensaladas en coliformes totales, y no hubo presencia de coliformes fecales. La NOM-093-SSA1-1994 establece como límite máximo <10 UFC/g en alimentos cocidos y <100 UFC/g en ensaladas, estos resultados son la afirmación de que se llevan a cabo y aplican las buenas prácticas de higiene que se aplican dentro del establecimiento.

**Tabla 11.** Número Mas Probable (NMP) de coliformes fecales y totales en alimentos de la cafetería del ITSON campus centro Cd. Obregón

Muestreo	Alimentos (NMP/g)					
	1		2			
	CT	CF	CT	CF		
I	Fríjol	0	0	Ensalada	23	0
II	Arroz	0	0	Pollo cocido	7	0
III	Sándwich	0	0	Fríjol	9	0
IV	Cochinita	0	0	Sopa espagueti	0	0
V	Quesadilla	0	0	Fríjol	0	0
VI	Papas cocidas	0	0	Sopa fideos	0	0
VII	Fríjol	0	0	Cabeza	0	0
VIII	Cochinita	0	0	Fríjol	0	0

Especificaciones NOM-093-SSA1-1994:  
Alimentos cocidos; <10 UFC/g y Ensaladas <100 UFC/g.

Forte, *et al.*, (2000) mencionan que la higiene de las superficies, equipos y utensilios, es uno de los pilares donde se asientan las buenas prácticas de manufactura e higiene, pero es de suma importancia recordar que existen microorganismos capaces de resistir los tratamientos habituales de limpieza, pudiendo provocar una contaminación.

En un estudio llevado a cabo en España (Pérez, *et al.*, 1998) se menciona que los microorganismos patógenos pueden pasar de un alimento a otro por contacto directo o bien a través de quienes los manipulan, de las superficies de contacto o del aire. Una correcta higiene de los alimentos está determinada por una multitud de factores: condiciones de obtención de los mismos, características de los medios empleados para su transporte, temperaturas y condiciones de conservación, estructura de los locales donde se manipulan, destacando entre todos ellos la higiene de las prácticas de los manipuladores de alimentos. Entonces el resultado obtenido en este estudio llevado a cabo en la cafetería del ITSON campus centro de Cd. Obregón es el reflejo de los medios empleados para siempre contar con áreas y alimentos siempre limpios.

#### 4.7 Determinación de *Salmonella* en alimentos

En la determinación de *Salmonella* en alimentos los resultados fueron negativos ya que no se lo logro aislar este tipo de microorganismos patógeno, debido a que nunca se obtuvieron colonias típicas en ninguno de los análisis. En un estudio realizado por Quispe, *et a.*, (2000) también llevaron a cabo estudios para determinación de este patógeno pero tampoco lograron su aislamiento sin embargo menciona que la ausencia de *Salmonella* en su estudio puede explicarse por las temperaturas en las que se desarrolló el dicho estudio (15°C-19°C). De hecho, encontrar esta bacteria patógena representaría un problema grave en cualquier caso.

## **V. CONCLUSIONES**

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio que se llevo a cabo en la cafetería del ITSON campus centro de Cd. Obregón, en la cual se evaluó la calidad sanitaria de esta, analizando superficies vivas e inertes, medio ambiente así como de los alimentos expedidos por la cafetería, y de acuerdo a estos se llevo así a la siguientes conclusiones:

- En la cuenta total viable de mesófilos aerobios en superficies inertes se encontró que el 97.5% de las muestras cumplen con las especificaciones de la norma oficial y solamente el 2.5% se encontraron fuera las especificación de la secretaria de salud. Además se encontró que el 100% de las muestras de superficies vivas cumplen con las especificaciones de la norma.
- En los resultados obtenidos de organismos coliformes totales en superficies vivas e inertes se encontró que el 100% de las muestras no sobrepasa las especificaciones de la norma NOM-093-SSA1-1994 para este indicador microbiológico.
- En el recuento de microorganismos mesófilos aerobios en medio ambiente se puede decir que este cumple con las especificaciones necesarias para la elaboración del producto.

- 
- Se encontró una baja presencia de organismos mesófilos aerobios en alimentos debido a que el 100% de los alimentos analizados cumplen con los límites permisibles de la Secretaria de Salud.
  - Los resultados obtenidos en el recuento de hongos y levaduras demuestran una baja presencia en la mayoría de los alimentos.
  - En lo que respecta a la presencia coliformes totales y fecales en alimentos el 100% de los alimentos cumplen con las especificaciones de la norma.
  - No se logro el aislamiento de *Salmonella* en ninguno de los muestreos realizados.

Por lo anterior se puede asegurar que las instalaciones, el medio ambiente y los alimentos expedidos en la cafetería del ITSON campus centro, se encuentran en optimas condiciones sanitarias.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Una vez analizados los resultados de este estudio, se hacen las siguientes recomendaciones:

- El uso correcto de cofia y cubrebocas.
- Utilizar ropa limpia.
- Usar uñas cortas y limpias
- No masticar chicle dentro del estableciendo donde se preparan los alimentos.
- Lavarse con agua, jabón y sanitizar las manos antes de iniciar la preparación de un alimento así como después de ir al baño o haber tocado cualquier cosa que pudiera contaminar las manos.
- Preparar solo el alimento necesario que se va expedir en un día para evitar problemas de contaminación al combinarlos con nuevos.
- Diseñar un programa de capacitación para que las personas que laboran dentro de las estalaciones de la cafetería conozcan la importancia de aplicar

buenas prácticas de higiene así como el impacto que este puede tener si se manejan de forma incorrecta.

- Llevar a cabo estudios continuos de la calidad sanitaria de este establecimiento debido a que es un área de tipo estudiantil, así como para asegurar que las buenas practicas de higiene se estén aplicando y llevando a cabo.

## **VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA**

Adams M.R y M.O. Moss. (1995). Microbiología de los Alimentos, Primera Edición Editorial ACRIBIA, S.A, Zaragoza España.

Castro M, (2001). Manual de Procedimientos del Laboratorio de Microbiología de la DIEP; (ITSON)

Diario Oficial de la Federación. 1994. NOM-093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Practicas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos.

Diario Oficial de la Federación. 1994. NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

Diario Oficial de la Federación. 1994. NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

Diario Oficial de la Federación. 1994. NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de hongos y levaduras.

Diario Oficial de la federación. 1994. NOM-112-SSA1-1994. Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.

Doyle M.P, L.R. Beuchat y T.J. Montville. (1997), Microbiología de los Alimentos, Fundamento y Fronteras, Primera Edición, Editorial ACRIBIA, S.A Zaragoza, España.

Fernández E. (1981). Microbiología sanitaria; Aguay sus Alimentos Vol 1. Universidad de Guadalajara.

Fernández E.E (1983). Microbiología. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana. Sexta edición. México D.F.

Fernández (1993). Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria. Segunda Edición, Instituto Politécnico Nacional.

Forte, L.M. y J.E. Rebagliati. (2000). Control Bacteriológico en Plantas Frigoríficas y Conocimiento del Fenómeno Biopelícula. Boletín Alimentario. Editorial. Aldo Marzochi. Nº 13. Buenos Aires (Argentina).

Forysthe, S.J. (2000). Alimentos Seguros: Microbiología. Editorial ACRIBIA, S.A Zaragoza España.

Frazier W.C y D.C. Westhoff. (1993). Microbiología de los Alimentos, Cuarta Edición, Editorial ACRIBIA S.A, Zaragoza España.

García M.J y V. García. (1997). Técnicas de Descontaminación: Limpieza, Desinfección, Esterilización, Primera Edición, Editorial Thomson, Paraninfo, Madrid España.

Habbs B y R.J. Gilbert. (1986). Higiene y Toxicología de los Alimentos, Segunda Edición, Editorial ACRIBIA, Zaragoza España.

ICMSF, (1982). Microorganismos de los Alimentos Vol I. Segunda Edición, Editorial ACRIBIA, Zaragoza España.

ICMSF, (1980). Ecología Microbiana de los Alimentos Vol I, Editorial ACRIBIA, Zaragoza España.

Jay J.M, (2000). Microbiología Moderna de los Alimentos, Cuarta Edición, Editorial ACRIBIA S.A, Zaragoza España.

Mac Faddin Jean. (1984), Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial Panamericana. México D.F.

Pelczar, M.J, (1982). Microbiología, Cuarta Edición, Editorial Mc Graw-Hill, México.

Pérez, S.G; Belmonte, C.S y Martínez, C.J. (1998). Estudio Microbiológico de los Alimentos Elaborados en Comedores Colectivos de Alto Riesgo. Edit. Revista Española de Salud Pública. Madrid (España).

Prescott, Harley y Klein, (2004). Microbiología, Quinta Edición, Editorial Mc Graw-Hill-Interamericana, España.

Quispe, J.J y V. Sánchez, (2001). Evaluación Microbiológica y Sanitaria de puestos de venta ambulancia de alimentos del distrito de Comas, Lima – Perú, Vol.18 (1-2)

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998. 20a edición.