



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
LICENCIATURA EN QUÍMICA EN ALIMENTOS

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

Frecuencia y comportamiento de *Salmonella*, y
microorganismos indicadores de higiene en jugo de
zanahoria.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

DIANA FERNANDA OLVERA CASTELÁN

DIRECTOR DE TESIS: DR. JAVIER CASTRO ROSAS



Pachuca de Soto, Hidalgo

Febrero 2007



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología (en el área de Microbiología de Alimentos) del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.



El presente trabajo formó parte del Proyecto denominado “Comportamiento e identificación de bacterias patógenas mediante PRC y cultivo tradicional a partir de ensaladas y licuados de verduras crudas listas para su consumo” apoyado por PROMEP 2003-2006.



Los resultados de éste trabajo de investigación ha sido publicado en los siguientes foros científicos:

- Comportamiento en jugo de zanahoria de grupos patógenos de *E.coli* prevalentes en México. Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria Monterrey, N.L. 2004.

- Frecuencia de *Salmonella* y de microorganismos indicadores de higiene en jugo de zanahoria y betabel. XXI Reunión Nacional de Microbiología, Toxicología e Higiene de los Alimentos. Sexto Congreso Internacional de inocuidad de alimentos. Guadalajara, Jal. Noviembre de 2004.

- Frequency and concentration of total coliform organisms, thermotolerant coliforms bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella* in raw carrot juice from restaurants. Segundo Congreso Internacional “Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries”. Saltillo Coahuila, Octubre 2006.

ÍNDICE

I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	3
2.1 Jugos.....	3
2.1.1 Microorganismos patógenos en jugos.....	3
2.1.2 Brotes de enfermedad por consumo de jugos.....	5
2.2 La zanahoria.....	6
2.2.1 Descripción botánica.....	6
2.2.2 Composición.....	7
2.2.3 Producción de zanahoria.....	9
2.2.4 Variedades.....	10
2.2.5 Fuentes de contaminación de zanahoria.....	12
2.3 Microorganismos indicadores de higiene.....	13
2.3.1 Organismos coliformes	14
2.3.1.1 Presencia en alimentos	15
2.3.2 Coliformes termotolerantes.....	16
2.3.3 <i>Escherichia coli</i>	17
2.3.3.1 Presencia en alimentos	18
2.3.3.2 Significado en los alimentos	18
2.3.3.3 Grupos patógenos de <i>E. coli</i>	19
2.3.3.3.1 <i>E. coli</i> Enteropatógena (ECEP)	20
2.3.3.3.2 <i>E. coli</i> Enterotoxigenica (ECEP)	20

2.3.3.3.3 <i>E. coli</i> Enteroinvasiva (ECEP).....	22
2.3.4 Salmonella.....	23
2.3.4.1 Características generales.....	23
2.3.4.2 Presencia en los alimentos.....	25
2.3.4.3 Características de la enfermedad en humanos.....	26
2.3.4.4 <i>Salmonella</i> en jugos.....	27
III. Objetivos.....	29
3.1 Objetivo general.....	29
3.2 Objetivos particulares.....	29
IV. Metodología	30
4.1 Material	30
4.1.1 Medios de cultivo.....	30
4.1. 2 Reactivos.....	31
4.1.3 Equipo.....	31
4.2 Procedimiento	32
4.2.1 Recolección de muestras de jugo.....	32
4.2.2 Análisis microbiológicos.....	34
4.2.2.1 Preparación de la muestra.....	34
4.2.2.2 Recuento de organismos coniformes.....	34
4.2.2.3 Cuantificación de coliformes termotolerantes y <i>E. coli</i>	35
4.2.2.4 Determinación de <i>Salmonella</i>	37
4.2.2.5 Comportamiento de tres grupos de <i>E. coli</i> Rf ⁺ (ECEP,ECEI, ECET) y <i>Salmonella</i> a temperatura ambiente en jugo de zanahoria	40

4.2.2.5.1 Cepas	40
4.2.2.6 Obtención del jugo	41
4.2.2.7 Preparación del inóculo	41
4.2.2.8 Monitoreo del desarrollo de los patógenos	42
V. Resultados y discusión.....	43
5.1 Estudios de frecuencia de microorganismos indicadores de higiene y <i>Salmonella</i>	43
5.2 Estudios del comportamiento de grupos patógenos de E. coli y <i>Salmonella</i> en jugo.....	58
VI. Conclusiones.....	70
VII. Bibliografía.....	72
VIII. Anexos	
1. Sanborns	81
2. Vips	82
3. La Blanca	83
4. Ciro's	84
5. Comercio vía pública	85
6. Puesto del mercado Benito Juárez	86
Diagramas	D
Figuras	D
Tablas	E

ÍNDICE DE DIAGRAMAS, FIGURAS Y TABLAS

DIAGRAMAS

1. Cuantificación de Organismos Coliformes.....	36
2. Cuantificación de coliformes termotolerantes y <i>E. coli</i>	38
3. Identificación de <i>Salmonella</i>	39

FIGURAS

1. Comportamiento de tres grupos patógenos de <i>E. coli</i> en jugo de zanahoria almacenado a temperatura ambiente.....	61
2. Comportamiento de 4 serotipos de <i>Salmonella</i> en jugo de zanahoria almacenado a temperatura ambiente.....	62
3. Comportamiento de tres grupos patógenos de <i>E. coli</i> en jugo de zanahoria almacenado en refrigeración.....	64
4. Comportamiento de serotipos de <i>Salmonella</i> en jugo de zanahoria almacenado en refrigeración	65

TABLAS

1. Composición de la zanahoria en 100g. de sustancia comestible	8
2. Producción de zanahoria; ciclo primavera – verano; año agrícola 2006.....	10
3. Variedades de zanahoria.....	11
4. Clasificación de los restaurantes	33
5. Frecuencia de OC, Ct, <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> en jugo de zanahoria provenientes del restaurante Sanborns.....	45
6. Valores mínimos, medianas y máximos de microorganismos indicadores en jugo de zanahoria provenientes del restaurante Sanborns.....	45
7. Frecuencia de OC, Ct, <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> en jugo de zanahoria provenientes del restaurante Vips.....	46
8. Valores mínimos, medianas y máximos de microorganismos indicadores en jugo de zanahoria provenientes del restaurante Vips	
9. Frecuencia de OC, Ct, <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> en jugo de zanahoria provenientes del restaurante La Blanca.....	46
10. Valores mínimos, medianas y máximos de microorganismos indicadores en jugo de zanahoria provenientes del restaurante La Blanca.....	48

11.Frecuencia de OC, Ct, <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> en jugo de zanahoria provenientes del restaurante Ciro´s.....	49
12.Valores mínimos, medianas y máximos de microorganismos indicadores en jugo de zanahoria provenientes del restaurante Ciro´s.....	49
13.Frecuencia de OC, Ct, <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> en jugo de zanahoria provenientes de comercio en la vía pública.....	51
14.Valores mínimos, medianas y máximos de microorganismos indicadores en jugo de zanahoria provenientes de comercio en la vía pública	51
15.Frecuencia de OC, Ct, <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> en jugo de zanahoria provenientes del mercado Benito Juárez	52
16.Valores mínimos, medianas y máximos de microorganismos indicadores en jugo de zanahoria provenientes del mercado Benito Juárez	52
17.Mediana y frecuencia de microorganismos aislados de jugos de zanahoria obtenidas en restaurantes con tres niveles aparentes de higiene.....	57

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son una causa importante de enfermedad en todos los países. Los alimentos involucrados en brotes de enfermedad son con mayor frecuencia los de origen animal, ya sean cárnicos o lácteos. No obstante, aunque en menor proporción los vegetales también participan (CDC, 2000).

Recientemente, la demanda de verduras crudas se ha incrementado entre los consumidores debido a que se les percibe como saludables, sabrosas, frescas y de fácil manejo. Correlativamente se ha detectado también un incremento en el número de casos de enfermedad asociados al consumo de verduras (Bean, 1997)

Las verduras se encuentran expuestas a múltiples fuentes de contaminación durante su producción, cosecha, transporte y comercialización (Fernández, 2000). Su origen puede ser de distintos tipos como: el uso de desechos animales, heces de animales de uso doméstico o crianza como fertilizante de los cultivos; o riego de tierras de cultivo con aguas negras (Fernández, 2000).

El riesgo de enfermar por consumir verduras no sólo está en función de la presencia de microorganismos patógenos en las verduras, también en la posibilidad de propiciar contaminación cruzada. Estará además, en función de la capacidad de los patógenos para sobrevivir y desarrollar en las verduras.

En México se consumen una diversidad de jugos de verduras, dentro de los que se incluye el de zanahoria. Por lo general, estos jugos son consumidos

crudos. Aunque en nuestro país no hay datos sobre la inocuidad de los jugos crudos de zanahoria, existe la posibilidad de que los jugos puedan contener microorganismos patógenos que pueden desencadenar un padecimiento en el consumidor.

En nuestro país la información sobre la incidencia y comportamiento de microorganismos patógenos en jugos es limitada; más aún, no existe información sobre la frecuencia y comportamiento de microorganismos patógenos en jugo de zanahoria.

Por tal motivo, en este trabajo se investigó la frecuencia y comportamiento de algunos microorganismos indicadores de higiene y microorganismos patógenos en jugo de zanahoria, provenientes de mercados públicos, vendedores ambulantes y restaurantes de la ciudad de Pachuca, Hgo.

II ANTECEDENTES

2.1 Jugos

Muchas frutas y verduras se consumen en forma de jugo. El producto se prepara para consumo inmediato en los hogares, servicios de alimentos y en mercados públicos.

Los jugos de frutas y verduras se distinguen por su gran riqueza en vitaminas, principalmente del grupo B (Burgeois, 1996).

Los jugos de verduras son más sensibles al ataque de microorganismos y más difíciles de conservar que los jugos hechos con frutas. La causa esencial estriba en su acidez. El pH de los jugos de hortalizas oscila en general entre 5.0 y 5.8; el del jitomate entre 3.8 y 4.2 (Fernández, 2000). Por ello, bacterias como *Clostridium* no pueden multiplicarse en los jugos de frutas debido a que son más ácidos. Además los microorganismos muy exigentes como los lactobacilos, encuentran en los jugos de hortalizas una serie de sustancias que les son esenciales, por ejemplo, aminoácidos y vitaminas, que existen en pequeñas cantidades en los jugos de frutas y que por el contrario en las hortalizas se encuentran más abundantemente (Muller, 1989).

2.1.1 Microorganismos patógenos en jugos

En la preparación de jugos frescos con frecuencia se incide en maniobras peligrosas que propician la contaminación con microorganismos patógenos. La

fuente principal de contaminación a los jugos son las partes externas de las frutas y verduras.

De manera natural es posible encontrar una diversidad de microorganismos en la parte externa de las frutas crudas. No obstante, en ocasiones un determinado tipo de microorganismo o especie es relacionado con una verdura en particular; por ejemplo, las especies de microorganismos más frecuentemente encontradas en estudios realizados en jugos de manzana, uva, cereza y piña en el 24.7 % de estos productos se aisló *Saccharomyces cerevisiae*, seguido por *Candida stellata* (22.1%) y *Zygosaccharomyces rouxii* (14.3%) (Deak y Beuchat, 1993)

Entre los jugos de hortalizas más ácidos se encuentran el de lima y limón, con pH menor de 2.5 y entre los menos ácidos se encuentran el de jitomate con valores de 3.5 a 5.0. El pH bajo tiene un efecto directo en la selección de los microorganismos viables en el producto final, y en el tipo de flora predominante: levaduras, hongos y bacterias acidúricas, entre las que destacan las bacterias lácticas (Hatcher y col., 1992). Mientras éstas últimas tienen una tasa de desarrollo mayor, los hongos son más tolerantes a las altas concentraciones de azúcares. También, el tipo de producto influye en la selección o actividad de los microorganismos por ejemplo, las levaduras constituyen el problema de mayor importancia en ciertos jugos como los de uva y manzana (Fernández, 2000).

Más prominentes como acidúricas son algunos miembros del género *Bacillus* (*B. coagulans*, *B. licheniformis* y *B. polymyxa*) que son capaces de fermentar y deteriorar jugos empacados considerados termoestables (Fernández, 2000).

El jugo de jitomate es susceptible a la descomposición por actividad microbiana durante su almacenamiento (Fernández, 2000). Las bacterias esporuladas son una causa frecuente del daño. La mayoría de las esporas de bacterias aerobias o anaerobias no germinan en jugos de frutas con pH inferior a 4.0 (Fernández, 2000).

Otro microorganismo de interés es el hongo *Byssochlamys*, con dos especies (*B. fulva* y *B.nivea*), que provoca descomposición de frutas y jugos de frutas envasadas (Beuchat y Rice, 1979).

En los últimos años aparte de los microorganismos mencionados se han aislado microorganismos patógenos intestinales en jugos no pasteurizados; varios de estos microorganismos identificados se han aislado también a partir de jugos involucrados en brotes de ETAs en varias partes del mundo como los Estados Unidos de Norte América (EUA) (Parish y col., 1997). Los principales patógenos asociados a enfermedades por el consumo de jugos incluyen: *Escherichia coli* O157:H7, *Cryptosporidium parvum*, y algunos serotipos de *Salmonella* (Typhi, Hartford, Muenchen y Enteritis) (Parish y col., 1997; Cody y col., 1999).

2.1.2 Brotes de enfermedad por consumo de jugos

Los agentes etiológicos involucrados en enfermedades por consumo de jugos incluyen virus, bacterias y parásitos. (Fernández, 2000).

Desde 1990 se han reportado varios brotes de enfermedades en EUA asociados a jugos no pasteurizados que incluyen: jugo de manzana, jugo de naranja, jugo de sandía y jugo de zanahoria (FDA, 2000). La FDA calcula que

aproximadamente cada año hay entre 16,000 y 48,000 casos de enfermedades transmitidas por alimentos involucradas por el consumo de jugos no pasteurizados contaminados por microorganismos patógenos (FDA, 2000).

En 1991 se reportó un brote por el virus Norwalk asociado al consumo de jugo de naranja (Buckle, 1995). En otros incidentes, *E. coli* O157:H7 fue transmitida por jugo de manzana no pasteurizado, provocando enfermedad a más de 70 personas en EUA y Canadá (FDA, 2000). Y también por ese alimento ocurrió un brote de criptosporidiosis con 20 casos en EUA (Fernández, 2000).

En EUA se reportaron 6 brotes por jugo de naranja entre 1994 y 1995 que incluían gastroenteritis, salmonelosis, tifoidea y hepatitis (Parish, 1998).

2.2 La zanahoria.

La zanahoria es una especie originaria del centro asiático y del mediterráneo. Fue cultivada y consumida desde la antigüedad por griegos y romanos. Durante los primeros siglos de su cultivo, las raíces de la zanahoria eran de color violáceo. El cambio de éstas a su actual color naranja se debe a las selecciones ocurridas a mediados de 1700 en Holanda, que aportó una gran cantidad de caroteno, el pigmento causante del color (Belitz y Grosch, 1997).

2.2.1 Descripción botánica

La zanahoria proviene de la familia de *Umbelliferae* y su nombre científico es *Daucus carota L.* En esta planta bianual durante el primer año se forma una roseta

de pocas hojas y la raíz. Después de un período de descanso, se presenta un tallo corto en el que se forman las flores durante la segunda estación de crecimiento.

La raíz tiene función almacenadora, y también presenta numerosas raíces secundarias que sirven como órganos de absorción. Las flores son de color blanco.

2.2.2 Composición.

El tejido exterior de la zanahoria consta de un peridermo, cuya función es reducir la pérdida de humedad y evitar el ataque de microorganismos. La región interna o corazón consta de un xilema y una médula (Mountney y Wilburg, 1971)

La zanahoria es rica en minerales y en β caroteno (precursor de la vitamina A). Sus propiedades medicinales, son otro atributo importante aparte de las nutritivas. También es notable la presencia de vitaminas B y C, a las cuales se les atribuyen propiedades anticarcinogénicas (Mountney y Wilburg, 1971). El jugo de zanahoria es una fuente natural de β -carotenos y agente colorante. Contiene aproximadamente 10% de sólidos solubles, con una acidez titulable de 0.15% y un pH de 6.1 (Mountney y Wilburg, 1971)

En la siguiente tabla (1) se presenta el contenido nutricional de la zanahoria.

Tabla 1. Composición de la zanahoria en 100g. de sustancia comestible

Componente	Contenido
Agua (g)	88.6%
Carbohidratos (g)	10.1%
Lípidos (g)	0.2%
Calorías (cal)	40%
Vitamina A (U.I.)*	2.000-12.000 según variedades
Vitamina B1 (mg)	0.13%
Vitamina B2 (mg)	0.06%
Vitamina B6 (mg)	0.19%
Vitamina E (mg)	0.45%
Ácido nicotínico (mg)	0.64%
Potasio (mg)	0.1%

U.I.* Unidades Internacionales

Fuente: <http://www.infoagro.com/hortalizas/zanahoria.htm#8.%20>

Es importante notar que el alto contenido de agua, así como de carbohidratos y vitaminas, sugiere una verdura susceptible para el desarrollo microbiano.

Las zanahorias pueden contaminarse por microorganismos en cualquier etapa, desde que la planta empieza a crecer en el campo hasta antes de su consumo. Conforme envejecen los tejidos y se va perdiendo la integridad de las membranas celulares, resulta más sencillo para los microorganismos introducirse y establecerse en ellos. La forma más fácil para que se introduzcan en las estructuras sanas es a través de orificios naturales como los estomas y las lenticelas. Algunas especies pueden atravesar directamente la cutícula. La

exposición directa de los tejidos, los cortes practicados durante la recolección o debido a lesiones mecánicas, facilita enormemente la entrada de los microorganismos (Beuchat y Brackett, 1990) Las lesiones diminutas y difíciles de detectar producidas por arenillas constituyen una excelente vía para la introducción (Beuchat y Brackett, 1990).

2.2.3 Producción de zanahoria

El cultivo de la zanahoria ha experimentado un importante crecimiento en los últimos años tanto en superficie como en producción; actualmente es una de las hortalizas más producidas en el mundo. Asia es el mayor productor seguida por Europa y EUA. La producción mundial de zanahoria en 1999 alcanzó 18.40 millones de toneladas según la FAO, destacando como países productores China, EUA, Rusia Polonia y Japón que juntos aportaron el 50% de la producción mundial (Galarza, 2003).

Aunque México no está dentro de los principales productores de zanahoria a nivel mundial, anualmente se producen poco más de 110 000 toneladas; trece son los principales estados de la república productores de zanahoria (Tabla 2) (Galarza, 2003).

Tabla 2. Producción de zanahoria; ciclo primavera-verano; año agrícola 2006






Estado	Producción Estimada (Toneladas)
Aguascalientes	1,121.8
Baja California	88.0
Coahuila	476.0
Distrito Federal	117.0
Guanajuato	14,709.0
México	2,115.0
Michoacán	2,691.0
Nuevo León	7,370.0
Puebla	56,586.0
Querétaro	1,790.0
San Luís Potosí	187.5
Tlaxcala	2,000.0
Veracruz	9,450.0
Zacatecas	14,637.0
Total	113,338.8

Fuente: http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdeagr.html

2.2.4 Variedades

Botánicamente hay múltiples tipos de zanahorias, pero comercialmente solo se cultivan algunas de ellas (Tabla 3). Las zanahorias se clasifican en dos tipos; las de raíces de color rojo, amarillo o blanco y las de raíces cortas, medianas o largas (Mountney y Wilburg, 1971). En nuestro país, la variedad de zanahoria más aceptada es la Nantes, la cual es de tamaño mediano y de color naranja con puntas redondeadas. Además de esta, en México existen otras variedades como Emperador y Chantenay (Mountney y Wilburg, 1971).

Tabla 3. Variedades de zanahoria

Variedad	Descripción	Longitud Raíz (cm)	
Candy Stick	Sabor muy dulce. Alto potencial de rendimiento en proceso	25-28	
Crispy	Suculenta y crujiente, exterior suave. Temprana	28-30	
Early Gold	Muy temprana. Color muy uniforme, del corazón al exterior. Raíces suaves	23	
Enterprise	Excelente suavidad. Suculenta y crujiente para el mercado de rebanado y pelado. Diámetro consistente. Tolerancia intermedia al tizón causado por Alternaria	30-36	
Goliath	Uniforme, con muy buen color. Se comporta bien en el proceso	20-25	
Nantes Scarlet	Maduración temprana. Muy buena aceptación por los productores. Frutos de gran calidad tanto para mercado fresco como para proceso.	23-25	

Fuente <http://www.faxsa.com.mx/>

2.2.5 Fuentes de contaminación de la zanahoria

Teóricamente cualquier fruto o verdura puede ser vehículo de bacterias, virus y parásitos patógenos al hombre.

En la preparación de jugos y concentrados de hortalizas, lo mismo que en la obtención de jugos de pulpa de frutas, se debe prestar especial atención a la limpieza y desinfección ya que de no ser así los microorganismos pueden terminar en el producto (Fernández, 2000).

Para el caso de la zanahoria, ésta se encuentra expuesta a contaminación por microorganismos patógenos antes, durante y después de su cosecha. En la precosecha las fuentes de interés son la tierra, el agua de riego, la materia fecal humana o animal ya que la zanahoria es una raíz que crece en contacto con la tierra (Fernández, 2000). Los patógenos pueden persistir desde la siembra hasta la cosecha y finalmente encontrarse en el alimento listo para consumo. A pesar de que las normas oficiales de agricultura orgánica y convencional prohíben la aplicación directa de composta cruda a la tierra antes de sembrar y durante todas las etapas del cultivo (Fernández, 2000), todavía se sigue empleando la composta cruda. También el aire y las personas que cuidan las tierras de cultivo tienen participación. En la poscosecha destaca la maquinaria y equipo, los recipientes, animales domésticos y silvestres, los trabajadores, el polvo de la atmósfera y los vehículos como fuente de contaminación. Los microorganismos aportados por estas fuentes de contaminación, incluyen patógenos para el hombre y deterioradores (Fernández, 2000).

La población microbiana se localiza fundamentalmente sobre las partes externas de frutas y verduras, en gran medida, la flora microbiana de estas hortalizas refleja el ambiente en el cuál se cultivaron. Las verduras pueden contener diversos microorganismos intestinales: bacterias, virus, quistes y huevecillos de parásitos (Fernández, 2000).

Es importante destacar que el riesgo de contaminación por microorganismos patógenos en hortalizas no se limita únicamente a su presencia en el alimento, está además en función de la capacidad de los microorganismos para sobrevivir y proliferar en tierra y sobre las verduras (Moreno, 1994). Cualquier factor que prolongue la supervivencia o incremente los niveles del patógeno en el alimento, incrementan el riesgo para el consumidor. Factores como la humedad, la temperatura, tipo de suelo, flora competitiva, pH, penetración de la luz solar y aire en el suelo tienen influencia en el comportamiento microbiano (Jay, 1992).

2.3 Microorganismos indicadores de higiene

Los microorganismos indicadores sirven para evaluar las condiciones higiénicas bajo las cuales se ha elaborado un alimento. La presencia en los alimentos de algunas como *E. coli*, sugiere que el alimento se contaminó con materia fecal. Los coliformes son microorganismos indicadores, en el sentido de que su presencia en el alimento sugiere una deficiencia sanitaria en su manejo (Fernández, 2000).

Para evaluar el riesgo de un alimento con frecuencia se recurre al uso de microorganismos indicadores y no al uso de patógenos, ya que a menudo es difícil evidenciar la presencia de bacterias patógenas en los alimentos, por razones como: baja concentración del patógeno, falta de homogeneidad del patógeno en la muestra, estrés celular y estado viable no cultivable (Fernández, 2000).

Los grupos microbianos indicadores de mayor aplicación en los alimentos son: bacterias mesofílicas aerobias, organismos coliformes totales, coliformes termotolerantes, *E. coli*, Enterococos, la familia *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, así como hongos y levaduras (Fernández, 2000).

2.3.1 Organismos coliformes

Los organismos coliformes se definen como bacillos no esporulados, Gram negativos, de crecimiento aeróbico o anaeróbico facultativo y que fermentan la lactosa con producción de gas a 37°C en un lapso de 24 a 48 horas (Burgeois 1996).

Las bacterias coliformes se han aislado muchas veces de excretas humanas y animales, por lo tanto pueden ser de procedencia fecal y su presencia sirve a menudo para decidir sobre la aceptación o el rechazo del agua potable (Hargrove y col. 1969). Sin embargo, es importante señalar que los organismos coliformes únicamente se relacionan con contaminación fecal reciente cuando se encuentran en agua limpia y no son indicadores de contaminación fecal en alimentos (Fernández, 1981). No obstante, su presencia en números elevados se relacionan con falta de higiene durante la obtención de los alimentos (Fernández, 1981).

Las características morfológicas, de cultivo, y de resistencia a los agentes químicos y físicos de los organismos coliformes son muy homogéneas. Son bacterias que no resisten tratamientos térmicos moderados (pasteurización), son susceptibles a la congelación y descongelación, desecación y acidez excesiva (Jay, 1992).

2.3.1.1 Presencia en alimentos

Debido a su capacidad de sobrevivencia y su gran potencial para degradar la materia orgánica, pueden hallarse en una diversidad de sustratos extra-intestinales, como son: piel humana y de animales, vegetales, insectos, aguas superficiales, tierra y de hecho, cualquier material que entre en contacto con ellos. Los alimentos no son la excepción y el hallazgo de coliformes puede estar determinado por una contaminación seguida o no de un activo desarrollo (Fernández, 2000).

La presencia de organismos coliformes en los alimentos es por lo general el resultado de su exposición a los desperdicios orgánicos, cadáveres y desechos animales, heces, tierra, fauna nociva, aguas negras, residuos de alimento en utensilios y equipo, aunado a esto, la posibilidad de desarrollo que encuentren en tales sustratos. En consecuencia, su hallazgo en un alimento no involucra necesariamente a la materia fecal (Fernández, 2000).

2.3.2 Coliformes termotolerantes

Se ha empleado el término “coliformes fecales” para designar al grupos de microorganismos Gram negativos no esporulados capaces de utilizar la lactosa con formación de gas a 45°C. Sin embargo, el término para designar a este grupo microbiano recientemente se ha cambiado ya que creaba confusión debido a que sugiere la idea de contenido intestinal lo cual para este grupo microbiano no era verdad ya que este grupo microbiano, habita otros sustratos aparte del intestino. El nombre actual sugerido es el de coliformes termotolerantes (Fernández 2000).

Los coliformes termotolerantes forman un grupo microbiano más reducido que los organismos coliformes al cual pertenecen los termotolerantes. Este grupo está formado por aquellos microorganismos con semejantes características que los organismos coliformes, la única diferencia es que los termotolerantes fermentan la lactosa con producción de gas a 44°-45° (24-48h)

Estos microorganismos se aíslan con frecuencia de la materia fecal pero no son exclusivos de ella, un porcentaje considerable de coliformes termotolerantes tienen como hábitat el agua, el suelo y las plantas (Fernández 2000). Debido a esto, la presencia de coliformes termotolerantes en un alimento en general no es indicativo de contaminación fecal, excepto en el agua limpia, ostiones y algunas verduras crudas (Fernández, 1981). No obstante, su presencia y/o abundancia en el agua y los alimentos, pueden ser indicativa de malas prácticas de higiene durante cualquier etapa de elaboración, almacenamiento y transporte de los alimentos (Jay, 2000.)

Los organismos coliformes termotolerantes son frecuentes en vegetales crudos (Beuchat y col., 2001a; Beuchat y col., 2001b; Geldreich y Bordner, 1971; Harris y col. 1985). Más comúnmente se emplean como indicadores de la eficiencia de los procesos de desinfección de materiales y equipo. La presencia de organismos coliformes en números elevados, sugieren un alimento de pobre calidad microbiana (Fernández, 2000).

2.3.3 *Escherichia coli*

E. coli pertenece al grupo de los coliformes termotolerantes sin embargo, este microorganismo sí tienen exclusivamente hábitat intestinal (Fernández, 1981). La bacteria se dispersa en el medio ambiente y según el sustrato en el cual finalmente se deposite, tiene tres perspectivas: sobrevive, desarrolla o muere. En los dos primeros casos, tales sustratos pueden constituirse a la vez en fuentes de contaminación hacia nuevos objetos. Esto ocurrirá con una frecuencia variable, dependiendo de las condiciones en las que acontece la contaminación y la naturaleza del material contaminado (Bullerman, 1981).

En la actualidad, *E. coli* es el microorganismo más confiable para determinar contaminación fecal en los alimentos (Fernández, 2000)

E. coli sobrevive bien fuera del intestino y bajo condiciones favorables es capaz de multiplicarse activamente en alimentos; su capacidad metabólica es muy amplia, incluso se ha demostrado que puede degradar insecticidas como el lindano en un medio de cultivo (Francis y col., 1975)

2.3.3.1 Presencia en alimentos

La contaminación fecal de los alimentos, bien por contacto directo o indirectamente por medio del agua, es quizá el método de transmisión más importante. Este tipo de contaminación con frecuencia afecta a la carne, los productos cárnicos y a las verduras frescas, que se transforman así en una fuente de contaminación secundaria. Debido a que las heces siempre contienen *E. coli* se utiliza este microorganismo como indicador de contaminación fecal en alimento (Fernández, 2000).

La mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas, sin embargo, existen cepas capaces de provocar enfermedad, tal es el caso de *E. coli* O157:H7 que se ha visto implicada en brotes epidémicos en diversos países; la dosis infectante de este patógeno es muy baja, se estima entre 10-100 células (Fernández, 2000)

2.3.3.2 Significado en los alimentos

La ausencia o números bajos de *E. coli* en una gran variedad de alimentos como producto terminado o durante su procesamiento, suelen generar situaciones de confianza desde el punto de vista de su calidad sanitaria (CDC, 1991). Sin embargo, en ocasiones, el producto puede fabricarse en condiciones antihigiénicas sin demostrar a estos microorganismos en el análisis (Fernández, 1981).

Las necesidades de implementar el control sanitario de estos alimentos a través de la inspección, es evidente. La falta de limpieza puede determinar si un producto es riesgoso para la salud, debido a la posibilidad de que una vez ya

terminado se manifieste con animales microscópicos (ácaros), pesticidas, u otras sustancias tóxicas, o se fabriquen a partir de materias primas con toxinas (micotoxinas) preformadas (Chrdash, 1978). Frank y Marth señalan que un resultado negativo no libera de riesgos a un producto, ya que cepas toxigénicas de un serotipo diferente a los investigados podría presentarse (CDC 1991)

2.3.3.3 Grupos patógenos de *E. coli*

La mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas, algunas sin embargo, causan infecciones en el hombre que pueden localizarse en el tracto intestinal o fuera de él.

Actualmente se reconocen 6 grupos patógenos de *E. coli*. Entre estos existen diferencias en las manifestaciones clínicas y epidemiológicas de las enfermedades que provocan, así como en la estructura antigénica y mecanismos de patogenicidad de los grupos.

Los grupos patógenos de *E. coli* son (Fernández 2000):

- Enteropatógena (ECEP)
- Enterotoxigénica (ECET)
- Enteroinvasiva (ECEI)
- Enterohemorrágica (ECEH)
- Enteroadherente (ECEA)
- Enteroagregativa (ECEG)

De los seis grupos, los más frecuentes en México son la enteropatógena, enterotoxigénica y la enteroinvasiva (Eslava y col, 1993).

2.3.3.3.1 *E. coli* enteropatógena (ECEP)

Éste grupo fue primeramente identificado hacia los años 40's. Su patogenicidad se observa principalmente en recién nacidos, especialmente en hospitales; aunque también afecta a niños mayores y adultos. Aunque entre los adultos se aíslan diversos serovares reconocidos como patógenos, en ellos no es común observar casos clínicos. Esto se debe a que se desarrolla inmunidad que resulta de un reiterado contacto con el microorganismo.

La transmisión en adultos ocurre a través de alimentos contaminados o directamente siguiendo la ruta ano-mano-boca.

La enfermedad en los niños se caracteriza por diarrea acuosa, en ocasiones vómito y fiebre baja. En los menores de 6 meses la condición puede prolongarse por más de 14 días y terminar letalmente (Fernández, 2000)

Los serovares más comunes incluidos entre estas cepas patógenas son O55, O86, O11, O119, O125, O126, O127, O128ab y O142 (Benenson, 1990).

2.3.3.3.2 *E. coli* enterotoxigénica (ECET)

El cuadro clínico de la infección por este grupo de *E. coli* es similar al del cólera. El periodo de incubación oscila entre 8 y 44 h. El individuo presenta náuseas con moderado dolor abdominal y diarrea, que en casos agudos conduce a una acentuada deshidratación. No hay una respuesta inflamatoria. En niños el cuadro puede ser muy severo e interferir con la absorción de nutrientes. Se estima que en los países en desarrollo los niños suelen padecer entre dos y tres episodios de diarrea con esta etiología por año (Doyle y Cliver, 1990).

En adultos se identifica como un cuadro de gastroenteritis conocido comúnmente como diarrea del viajero, quizá este grupo patógenos sea el responsable del 60-70% de los casos de diarrea del viajero (Guzewich y col., 1997). La probabilidad de adquirir el padecimiento, se incrementa al prolongarse la estancia de la persona en el país visitado. *E. coli* enterotoxigénica es la mayor causa de síndrome diarreico entre aquellos que se trasladan hacia Latinoamérica, África y Asia (Fernández, 2000).

La manifestación del cuadro suele ser abrupta y mantenerse de 1 a 5 días. El padecimiento no es común en los países desarrollados (Kornacki y Marth, 1982). La dosis infectante calculada en voluntarios humanos, es elevada: 10^5 - 10^6 células. Es necesaria entonces una contaminación del alimento seguida de multiplicación del microorganismo, lo que implica deficientes condiciones de almacenamiento de los alimentos (Smith y Gyles, 1970). No hay evidencia de enfermedad por transmisión de persona a persona (Fernández, 2000).

Las cepas de ECET suelen corresponder a diversos serogrupos de *E. coli* O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O115, O128, O139, O148, O159 y O167. Algunas cepas de *E. coli* deben su poder patógeno a la producción de enterotoxinas (Benenson, 1990).

En México se originó un brote causado por *E. coli* debido al desbordamiento del canal de aguas negras en Chalco, en mayo del 2000. De los pacientes que presentaron diarrea y vómito, se realizó el aislamiento e identificación bioquímica de enterobacterias, de las cuales el 0.45% correspondió a *Salmonella* y 76.6% a

E. coli: 62.2% a ECET (44.6% con LT, 11.2% con ST, 44.1%), 0.84% a ECEI, 0.84% a ECEP, 0.08% a ECEH (CDC, 2000)

A bordo de un crucero comercial, en dos ocasiones sucesivas, al menos 64 y 259 personas respectivamente, resultaron víctimas de gastroenteritis; el agente causal fue una cepa de *E. coli* no móvil, y productora de enterotoxina termolábil. Los síntomas consistieron en diarrea, dolor abdominal, náusea, cefalea y vómito. El alimento implicado epidemiológicamente fue coctel de jaiba preparado en una cocina de la embarcación que exhibía notables deficiencias sanitarias. La cepa enterotoxigénica (serotipo O25) se aisló del 83% de 35 pasajeros enfermos y del 40% de pasajeros asintomáticos (probablemente infectados de la misma manera) (Harris y col. ,1985).

2.3.3.3.3 *E. coli* enteroinvasiva (ECEI)

Éste microorganismo puede invadir las células epiteliales del colon, proliferar dentro de ellas y destruirlas. El proceso conduce a una necrosis con heces fluidas, sanguinolentas y cargadas de moco. Además de la diarrea, la persona afectada puede presentar fiebre. Ocasionalmente aparece vómito. El periodo de incubación en los brotes es de 2 a 48 h. El reservorio natural de este germen es el hombre; no se ha demostrado su presencia entre los animales. Se conocen casos de transmisión directa de persona a persona (Marier y col., 1973). La dosis infectante es de millones de células viables.

Un brote extensivo registrado en EUA, ocurrió en noviembre-diciembre de 1971. Estuvo asociado al consumo de quesos Camembert y Brie importados de

Francia. Se tuvo conocimiento de 227 personas enfermas distribuidas en 8 estados y el Distrito de Columbia. La tasa de ataque fue de 94%. Después de un periodo de incubación de 24 horas las personas afectadas mostraron vómito (35%), diarrea (90%), fiebre (73%), dolor abdominal (66%), cefalea y en algunos casos sangre en las heces. La fuente de contaminación se trazó al agua utilizada en la limpieza de la planta procesadora del queso; provenía de un río y el sistema de filtración funcionaba defectuosamente en esa época (Fernández, 2000).

2.3.4 *Salmonella*

2.3.4.1 Características generales

El género *Salmonella* es uno de los más extensamente estudiados entre los patógenos que pueden ser aislados de los alimentos. Ello se debe a la frecuencia con la cual el germen participa en brotes y casos individuales de gastroenteritis (Fernández, 2000). Fue descubierta hace más de un siglo por el científico norteamericano Dr. D. E. Salmon, en cuyo laboratorio se aisló en 1885 una de las variedades más agresivas.

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos Gram negativos y su tamaño oscila entre 1 y 3 μm de longitud y entre 0.5 y 0.7 μm de diámetro. Generalmente poseen flagelos peritricos que les dan movilidad. Son bacterias anaerobias facultativas que fermentan la glucosa, produciendo ácido y gas; casi todas las especies de *Salmonella* producen ácido sulfhídrico a partir de las proteínas y son capaces de descarboxilar algún aminoácido. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37° C y la a_w mínima de desarrollo es de 0.93. El

intervalo de pH de crecimiento está comprendido entre los valores 4.1 y 9.0, multiplicándose, por lo tanto, en los alimentos de baja acidez (Fernández, 2000)

Salmonella es una bacteria patógena para el hombre y para muchos animales. El microorganismo se inactiva fácilmente por la acción de los germicidas ordinarios cuando se aplica al equipo, utensilios, envases y superficies que entran en contacto con los alimentos. Lo inactiva el cloro, compuestos que contienen yodo y sales cuaternarias de amonio a concentraciones desde 25-100 mg/L en superficies previamente lavadas. El agua tratada con hipoclorito o cloro gaseoso muestran un amplio margen de seguridad, cuando el cloro residual permanece entre 0.1 y 0.3 mg/L (Fernández, 2000).

Salmonella tiene como hábitat el intestino de animales, incluyendo el hombre. El huésped puede ser víctima de una infección o ser un portador asintomático. En ambas condiciones funciona como fuente de contaminación al excretar el microorganismo por heces.

Se conocen 2300 serovares de *Salmonella*, de estos alrededor de 80 son los que se encuentran involucrados en la mayoría de los brotes por alimentos (Black y col., 1982).

Este patógenos muestra cierta capacidad de sobrevivencia en los materiales que contacta y bajo condiciones favorables también para multiplicarse en ellos. Así, una diversidad de superficies se convierte en reservorio extraintestinal del microorganismo, y por tanto en una fuente de contaminación de los alimentos (Fernández, 2000).

2.3.4.2 Presencia en los alimentos

Todos los serotipos de *Salmonella* pueden producir infección, si el número de células viables en el alimento es suficientemente elevado. La dosis infectiva depende del serotipo de *Salmonella* de que se trate (Dosel, 1994)

Los alimentos identificados como responsables de brotes de salmonelosis incluyen frecuentemente productos crudos como la leche, carne frutas y verduras. De forma natural los vegetales o la carne se pueden contaminar con el patógeno, a partir de contacto directo o indirecto con materia fecal (Fernández, 2000). En consecuencia, es posible su detección en carne cruda, frutas y verduras en la precosecha e incluso en especias y granos.

Aunque teóricamente casi cualquier tipo de alimento puede convertirse en vehículo de *Salmonella*, una vez que éste se expone a contaminación con el patógeno, el riesgo se incrementa si el patógeno sobrevive o es capaz de desarrollar en el alimento ante condiciones favorables (Fernández, 2000).

El patógeno no requiere componentes esenciales en los alimentos para desarrollar. Además muestra notable potencial para hacerlo incluso en productos que no suelen reconocerse con alto contenido nutrimental para el ser humano. Por ejemplo, en trozos de sandía, papaya y jícama almacenados a 25-27 °C, *S. Typhi* se multiplica en pocas horas; la incorporación de jugo de limón retrasa pero no evita la actividad (Fernández 2000).

La presencia de microorganismos patógenos en frutas y hortalizas es un problema en México. Estas pueden albergar diversos microorganismos, entre ellos, grupos patógenos de *E coli*, *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *Aeromonas*,

entre otros (Fernández, 2000). Es importante destacar que varios de estos productos frescos son utilizados comúnmente en la preparación de jugos que se consumen crudos y sin un adecuado tratamiento de desinfección de las verduras o frutas de donde se obtienen.

2.3.4.3 Característica de la enfermedad en humanos

La salmonelosis es consecuencia de la ingestión de alimentos que contienen al menos la dosis mínima infectante de este patógeno (Fernández, 2000)

La salmonelosis humana es una enfermedad de origen alimentario producida por la ingestión de alimentos contaminados con el patógeno. La ruta primaria de la infección es la ingestión del microorganismo por un huésped susceptible y en un número suficiente para que se llegue a desarrollar la enfermedad y su patogenia se debe principalmente a la presencia de una endotoxina. Asimismo, se ha demostrado cómo algunas cepas de *S. Typhimurium* son capaces de producir enterotoxinas (Blazer y Newman, 1982; Guzewich y Todd, 1997).

Los factores determinantes de esta enfermedad dependen del estado inmunológico de la población, de la composición química de los alimentos y de la virulencia de las cepas. Los recién nacidos, niños, personas mayores e individuos inmunodeficientes son más sensibles a las infecciones por este microorganismo que las personas adultas sanas (Kapperud y col., 1990; Fernández, 2000).

2.3.4.4 *Salmonella* en Jugos

En julio de 1999 se estudió un brote de salmonelosis, con varios incidentes en EUA y Canadá, todos asociados al consumo de jugos de naranja no pasteurizados preparado en una planta procesadora. El producto se distribuía en hoteles restaurantes y supermercados y se servían en vasos individuales como jugo recién extraído. El serotipo causante fue *S. Muenchen*; se registraron 107 casos confirmados y 91 casos más presuntivos. Algunos enfermos tuvieron que ser hospitalizados (CDC, 1991)

El jugo de naranja estuvo implicado en un brote en 1995, había sido procesado en una planta de Florida. Se confirmaron 62 casos de salmonelosis con varios serovares implicados. Se aisló *S. Hartford*, *S. Rubislaw*, *S. Saintpaul* y *S. Newport* del jugo y superficies del equipo de la planta procesadora (Fernández, 2000).

Durante el cultivo de las verduras es inevitable la contaminación externa por microorganismos que se encuentran en la tierra. Las hortalizas crudas suelen mostrar contaminación con bacterias patógenas que con frecuencia se encuentran implicadas en enfermedades asociadas al consumo de alimento (ETAs). Diferentes verduras se emplean para producir jugos. Es posible que los jugos contengan microorganismos patógenos si las verduras se contaminan durante el cultivo, cosecha, transporte y comercialización. Más aun, durante la preparación de los jugos, hay ciertas maniobras que pueden introducir microorganismos patógenos en los jugos como son: rebanado, picado o troceado. Además, debido a que el jugo de zanahoria no industrializado y que se consumirá crudo, por lo

general, no recibe un tratamiento antimicrobiano efectivo previo a su consumo, es de gran importancia que las zanahorias sean lavadas y desinfectadas adecuadamente para disminuir los peligros microbiológicos.

Para lograr una prevención y control eficiente de las enfermedades asociadas al consumo de jugo de zanahoria, es importante conocer la frecuencia con la que estos se encuentran contaminados con microorganismos patógenos así como determinar su comportamiento en el jugo de zanahoria.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de microorganismos indicadores de higiene y *Salmonella* en jugo de zanahoria procedente de diferentes restaurantes y el comportamiento de 4 serotipos de *Salmonella* y tres grupos patógenos de *E. coli* en jugo de zanahoria.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Determinar la frecuencia de *Salmonella* y la frecuencia y concentración de Organismos Coliformes, Coliformes termotolerantes y *E. coli* en el jugo de zanahoria obtenido de restaurantes.

2. Estudiar el comportamiento de ECET, ECEI, ECEP y 4 serotipos de *Salmonella* en jugo de zanahoria almacenado a temperatura ambiente y de refrigeración.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Material

4.1.1 Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron de marca Bioxon, México

Agar de bilis y rojo violeta

Agar citrato de Simmons

Agar hierro-lisina

Agar Salmonella-Shigella

Agar sulfito de bismuto

Agar soya tripticasa

Agar triple azúcar y hierro

Agar verde brillante

Base de caldo tetracionato

Caldo lactosado

Caldo lactosado verde brillante fluorocult

Caldo selenito cistina

Caldo soya tripticaseína

Caldo urea

Peptona de caseína

4.1.2 Reactivos

Antibiótico Rifampicina (Rif) (Biomedical Inc, Ohio, EUA)

NaCl (Sigma Chemical, EUA)

Metanol (Sigma Chemical, EUA)

4.1.3 Equipos

Autoclave (Yamato Sterilizer SM 200)

Báscula granataria (Mettler Toledo Pc 2000)

Baño maría con circulación de agua; (Riosa)

Balanza analítica (PC 2000 Mettler Toledo)

Centrífuga (Hérmle Labnet Z 323 K)

Contador de colonias (American Optical Québec)

Incubadora bacteriológica (Blue M)

Lámpara de luz UV ENF-240C (Spectroline)

Refrigerador (Lab-line Enviroeneers Inc)

Stomacher 400 Circulator (Seward)

Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)

Termómetros

4.2 Procedimientos

4.2.1. Recolección de muestras de jugo

Los jugos de zanahoria fueron comprados en diferentes restaurantes de la ciudad de Pachuca, Hidalgo, con 3 niveles de higiene aparente: aparente alta (AAh), aparente media (AMh) y aparente baja (ABh). La clasificación de los restaurantes se dió en función del número de personas que trabajan en el área de preparación y de la capacitación que reciben sobre el manejo higiénico de los alimentos. Así, se incluyó en los de AAh a aquellos que a simple vista cuentan con instalaciones que cumplen con las disposiciones que establece la legislación sanitaria (NOM-093-SSA1-1994), que son publicitados en medios impresos o electrónicos, que tienen entre 8 y 15 personas trabajando en la cocina, que el personal de la cocina recibe capacitación técnica y periódica sobre el manejo higiénico de los alimentos y que pertenecen a cadenas de restaurantes. En los AMh a aquellos que a simple vista cuentan con instalaciones que cumplen con las disposiciones que establece la legislación sanitaria (NOM-093-SSA1-1994), que tiene de 4 a 7 personas trabando en la cocina, que son publicitados en medios impresos, que el personal de la cocina no recibe capacitación técnica y periódica sobre el manejo higiénico de los alimentos y que no pertenecen a cadenas de restaurantes. Y en los ABh se incluyó un establecimiento de mercado y un comercio de la vía pública.

De esta manera, se clasificó a los restaurantes de la siguiente forma; AAh: Restaurantes Vips y Sanborns; AMh: Restaurantes Ciro's y La Blanca; y ABh: un vendedor en vía publica y un local de un mercado público.

Tabla 4. Clasificación de los restaurantes.

Niveles de higiene	NOM-093-SSA1-1994
<p>Aparente Alta Higiene (AAh)</p>	<p>Publicitado en medios impresos o electrónicos Entre 8-15 personas trabajando en cocina Recibe capacitación técnica y periódica sobre el manejo higiénico de los alimentos Pertenece a cadenas de restaurantes Publicitado en medios impresos</p>
<p>Aparente Media Higiene (AMh)</p>	<p>Entre 4-7 personas trabajando en cocina No recibe capacitación técnica y periódica sobre el manejo higiénico de los alimentos No pertenece a cadenas de restaurantes</p>
<p>Aparente Baja Higiene (AMh)</p>	<p>No publicitado en medios impresos o electrónicos No recibe capacitación técnica y periódica sobre el manejo higiénico de los alimentos No pertenece a cadenas de restaurantes</p>

De cada restaurante se compraron y analizaron 20 muestras. Las muestras fueron tomadas y transportadas (en su empaque de venta) bajo condiciones asépticas y de refrigeración como lo establece la legislación sanitaria en México (NOM-109-SSA1-1994) y se analizaron dentro de las 2 primeras horas después de su compra.

Se realizó la cuantificación de coliformes totales, coliformes termotolerantes, *E. coli* y se investigó la presencia de *Salmonella* de acuerdo a los manuales especializados (FDA/CFSAN, 2001; Vanderzant y col., 1992; NOM-112-SSA1-1994; NOM-113-SSA1-1994; NOM-114-SSA1-1994).

4.2.2 Análisis microbiológico

4.2.2.1 Preparación de la muestra

Del volumen de jugo comprado (aprox. 400 mL) se tomaron 50 mL y se depositaron en una bolsa estéril de polietileno; posteriormente se le adicionó 450 mL de caldo lactosado y se homogenizó mecánicamente en Stomacher a 260 rpm/1minuto (Diagrama 1).

4.2.2.2 Recuento de organismos coliformes

A partir de la muestra homogenizada se realizaron diluciones decimales en tubos que contenían 9 mL de diluyente de peptona. Para el recuento se aplicó la técnica de vertido en placa: en una caja de petri vacía se colocó 1 mL de diluciones seleccionadas, seguido de 10 mL de agar bilis y rojo violeta (ABRV), se homogeneizó, se dejó solidificar; una vez solidificado, se adicionaron sobre la superficie otros 5 mL del mismo medio.

Las placas se incubaron a 35°C durante 24 h y se contaron las colonias rojo oscuras con un diámetro superior o igual a 0.5 mm con o sin halo de precipitación de sales biliares. El valor obtenido se expresó como unidades formadoras de colonias por mL de jugo (UFC/mL) (Diagrama 2).

4.2.2.3 Cuantificación de coliformes termotolerantes y *E. coli*.

A partir de la muestra homogeneizada, se prepararon 2 diluciones decimales más en tubos con 9 mL de diluyente peptona. De la muestra homogeneizada y de las 2 diluciones se tomaron 3 mL y se transfirió 1 mL en cada uno de tres tubos que contenían 9 mL de caldo lactosado con campanas Durham; los tubos se incubaron a 35 °C/ 24 h. Cada tubo que presentó gas se transfirió ahora de manera independiente a tubos con caldo lactosado fluorocult y campana Durham; los tubos se incubaron a $44^{\circ} \pm 0.5^{\circ} \text{C}$ / 24-48 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos que presentaron desarrollo y gas en la campana Durham se consideraron positivos para coliformes termotolerantes.

A los tubos positivos a coliformes termotolerantes se les investigó la producción de indol (revelado por la adición del reactivo de Kovac) y fluorescencia azul/verde bajo la luz ultra violeta. Los tubos de coliformes termotolerantes que fueron positivos a indol y fluorescencia se consideraron positivos para *E. coli*. Adicionalmente, los tubos considerados positivos a *E. coli* se confirmaron mediante siembra en agar eosina azul de metileno y reacciones del IMViC.

Diagrama 1

Cuantificación de Organismos Coliformes



Para el cálculo de la concentración de coliformes termotolerantes y *E. coli* se emplearon las tablas del NMP correspondientes (BAM, 2001)

El valor obtenido se expresó como NMP/mL de *E. coli* presente en jugo de zanahoria (Diagrama 3).

4.2.2.4. Determinación de *Salmonella*

Las muestras homogeneizadas en el Stomacher (Diagrama 1) se incubaron a 35° durante 24 h. Posteriormente se transfirió 1 mL de la muestra a tubos conteniendo 9 mL de caldo selenito cistina o 9 mL de caldo tetrionato, los caldos se incubaron a 35°C/24 h ó 43°C/24 h, respectivamente.

Después de la incubación, cada tubo se sembró por estría en los medios selectivos: agar *Salmonella-Shigella*, agar sulfito de bismuto y agar verde brillante; las cajas inoculadas se incubaron a 35°C/24 h. Al menos 3 colonias con morfología típica de *Salmonella* y una atípica que desarrollaron en cada medio de cultivo se sometieron a pruebas bioquímicas empleando agar hierro y triple azúcar, agar hierro lisina, caldo urea, caldo triptona (para producción de Indol) y agar citrato de Simmons.

Las colonias con pruebas bioquímicas típicas de *Salmonella* se confirmaron serológicamente con antisueros polivalentes (Diagrama 4)

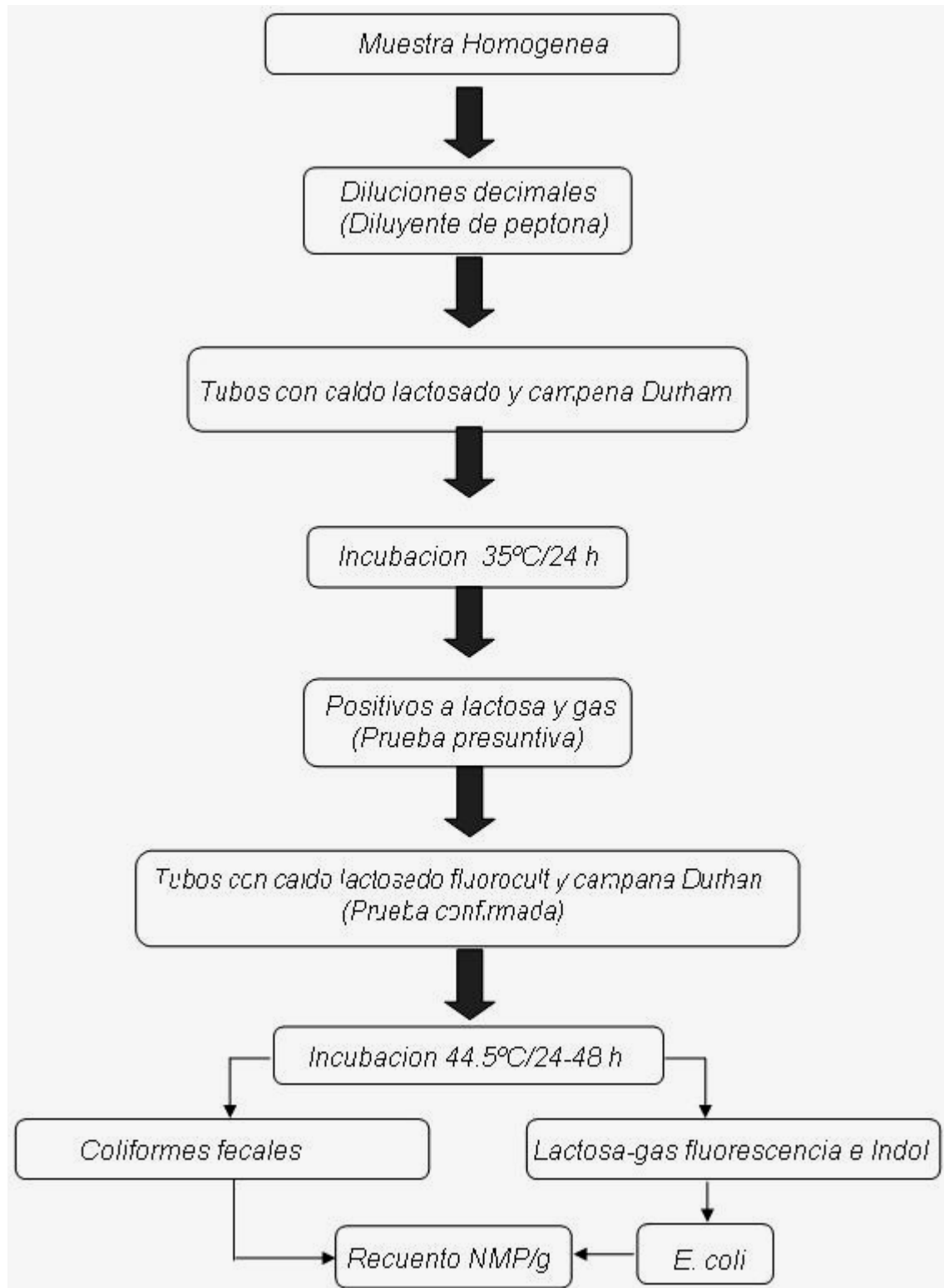
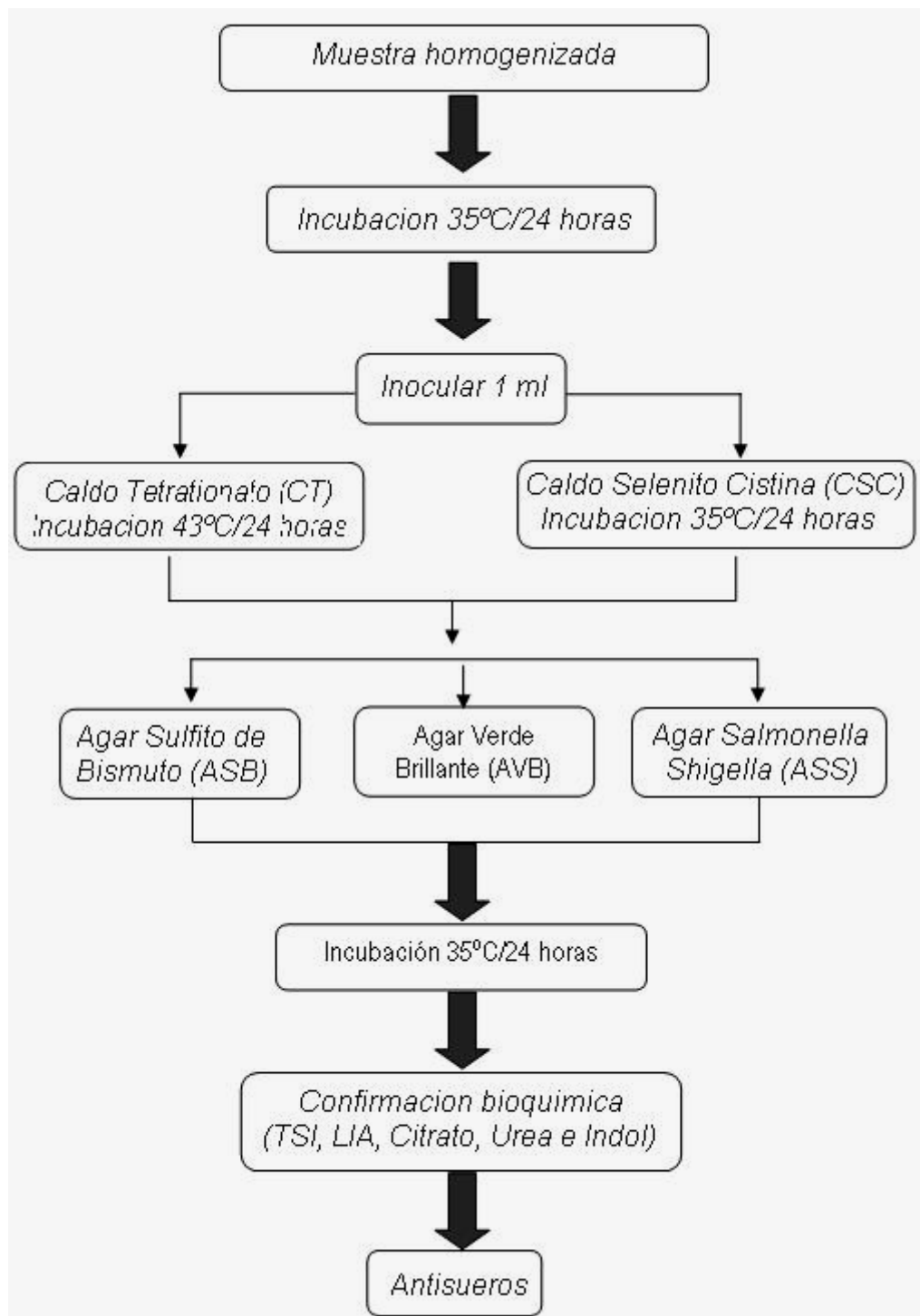
Diagrama 2Cuantificación de coliformes termotolerantes y *E. coli*

Diagrama 3
Identificación de *Salmonella*



4.2.2.5 Comportamiento de tres grupos patógenos de *E.coli* Rf+ (ECEP, ECEI, ECET) y *Salmonella* a temperatura ambiente en jugo de zanahoria.

4.2.2.5.1 Cepas

Se trabajó con 3 cepas de *E. coli* enteroinvasiva (ECEI): 4VC81-5, 323GM894, TL3, 3 cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ECET): 1620 TL 326, 10 ET, 150 TL 419, y 3 cepas de *E. coli* enteropatógena (ECEP): 872 TL 489, 873 TL 489, 52 GM 291. y 4 Serotipos de *Salmonella enteritidis*: Typhimurium , Typhi, Gaminara y Agona. Las cepas de *E. coli* fueron donadas por el departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN, México D.F; las de *Salmonella* fueron donadas por el laboratorio de Microbiología de Alimentos del posgrado en alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro. Todas las cepas lucieron resistentes a Rifampicina (Rf+) en el laboratorio de Biotecnología de la UAEH. Para esto, un cultivo desarrollado durante 6 h a 35°C en caldo soya tripticasa (CST), se centrifugó y resuspendió en solución salina isotónica (SSI) a una concentración final de 10⁹ UFC/mL. Se extendió por separado 1 mL de la suspensión de cada cepa en tres placas de agar soya tripticasa (AST) conteniendo 100 mg/L de Rifampicina (AST-Rif). Las placas inoculadas se incubaron a 35°C/48-72 h. Las colonias que desarrollaron en este medio de cultivo (teóricamente resistentes) fueron estriadas en nuevas placas de AST-Rif para asegurar la resistencia. Todas las cepas se mantuvieron de 4-7°C en AST con transferencias quincenales en tubos con AST inclinado y se activaron mediante tres transferencias sucesivas en CST incubando a 35°C/24 h. La resistencia al

antibiótico se mantuvo en las nueve cepas a lo largo del estudio. En lo sucesivo las cepas resistentes a Rifampicina serán referidas como R+.

4.2.2.6 Obtención del jugo

Se compraron zanahorias en un mercado público de la ciudad de Pachuca. En el laboratorio, las zanahorias fueron lavadas con agua purificada para eliminar partículas grandes como basura, tierra, polvo e insectos. Posteriormente se desinfectaron sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio a 50 mg/L. Una vez limpias se procedió a la obtención del jugo utilizando un extractor previamente desinfectado con una solución de hipoclorito de sodio a 50 mg/L. El jugo se recuperó en un matraz estéril y se distribuyó en tubos de ensaye estériles para su estudio.

4.2.2.7 Preparación del inóculo

Las 13 cepas (9 de *E. coli* y 4 de *Salmonella*) resistentes a Rifampicina (R+), fueron desarrolladas en CST a 37°C/18-24 h. Bajo estas condiciones de cultivo las cepas alcanzan una concentración de 9 Log₁₀ UFC/ml. Todos los cultivos fueron centrifugados dos veces con SSI al 0.85% a 3500 rpm/25 min (dos lavados). Los cultivos lavados se resuspendieron en SSI.

Por separado, las tres cepas de cada grupo patógeno de *E. coli* fueron mezcladas en un tubo de ensaye estéril en volúmenes iguales, obteniendo una sola mezcla representativa de cada grupo patógeno. Las cepas de *Salmonella* se utilizaron de manera individual. A partir de las mezclas de *E. coli* o las cepas

individuales de *Salmonella* se prepararon diluciones decimales en diluyente de peptona (DP) para obtener el nivel de inóculo deseado (10^{-2} ó 10^{-3} UFC/mL).

4.2.2.8 Monitoreo del desarrollo de los patógenos

Por separado, cada una de las mezcla de *E. coli* y los serotipos de *Salmonella* se inocularon en tubos de ensaye conteniendo 15 mL de jugo de zanahoria. Los tubos inoculados se incubaron a 22 C o 3-5°C. Periódicamente, se efectuaron recuentos a partir de cada uno de los tubos mediante la técnica de vertido en placa empleando AST adicionado de 100 mg/L de Rifampicina. Las cajas inoculadas fueron incubadas a 35°C por 24-48 h. Todos los estudios se efectuaron por triplicado.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudios de frecuencia de microorganismos indicadores de higiene y *Salmonella*

El número de microorganismos encontrados en cada una de las muestras analizadas y en cada tipo de establecimiento, se reportan en los anexos (1-6) incluidos al final de la tesis. En este apartado sólo se incluyen los valores mínimos, medianas y máximos, así como la frecuencia de los grupos microbianos para cada caso.

Se procesaron 20 muestras de cada uno de los 6 restaurantes o sitios incluidos en el estudio. Contrario a lo que se esperaba los jugos obtenidos en los sitios considerados de aparente alta higiene (Ah) en general presentaron mala calidad microbiológica (Tablas 4 a 7).

En el jugo de zanahoria adquirido en el restaurante Sanborns se encontró *E. coli* y *Salmonella* con una frecuencia de 20 y 15 %, respectivamente (Tabla 4). En algunas de estas muestras se detectaron niveles de 1100 NMP de coliformes termotolerantes (Ct) y alrededor de 38 NMP de *E. coli* por mL de jugo (Tabla 5). La frecuencia y niveles con los que se aislaron Ct, *E. coli* y *Salmonella* muestran franca contaminación fecal en los jugos así como un elevado riesgo de enfermedad.

Al igual que los jugos del restaurante Sanborns los de Vips mostraron baja higiene, indicios de contaminación fecal en el 20 % de las muestras y *Salmonella* estuvo presente en el 10 % de las muestras analizadas (Tabla 6). Aún cuando los

niveles de *E. coli* (Tabla 7) y frecuencia de *Salmonella* que se registraron en los jugos provenientes de éste restaurante son inferiores a los encontrados en los del restaurante Sanborns.

Una situación semejante en lo referente a la imagen microbiana de los dos establecimientos que clasificamos al inicio dentro de un nivel de aparente higiene alta, se observó en los jugos obtenidos en los restaurantes considerados de aparente media higiene. En general, los jugos obtenidos en estos establecimientos de aparente media higiene mostraron deficiente higiene. En los obtenidos en el restaurante La Blanca el contenido de OC fue muy elevado siendo el valor mínimo 5.6×10^3 UFC/g, todas las muestras presentaron Ct en niveles considerables, *E. coli* estuvo presente en 5 de las 20 muestras y *Salmonella* se detectó en un 20 % (Tablas 8 y 9).

Para el caso de los jugos obtenidos del restaurante Ciro's, la carga de Ct fue alta con una frecuencia de 50%, mientras que *E. coli* se encontró en el 20% de las muestras (Tabla 10). Los jugos obtenidos en Ciro's mostraron una carga de OC mayor que el que presentó el restaurante La Blanca (Tabla 11), y similar a el observado en los de aparente alta higiene. Los jugos obtenidos en Ciro's mostraron un mayor nivel de *E. coli* que el registrado en los jugos procedentes de los otros tres restaurantes hasta ahora mencionados (Tabla 11).

Tabla 5. Frecuencia de OC, Ct, *E. coli* y *Salmonella* en jugo de zanahoria provenientes del restaurante Sanborns

Microorganismo o grupo	Frecuencia	
	%	
OC (UFC/g)	100	20/20
Ct (NMP/g)	45	20/9
<i>E. coli</i> (NMP/g)	20	20/4
<i>Salmonella</i>	15	20/3

Tabla 6. Valores mínimos, medianas y máximos de microorganismos indicadores en jugo de zanahoria provenientes del restaurante Sanborns

Microorganismo o grupo	Mínimo	Mediana	Máximo
OC (UFC/g)	1.5×10^3	2.4×10^4	2.0×10^7
Ct (NMP/g)	<0.3	120	1100
<i>E. coli</i> (NMP/g)	<0.3	31	38

Tabla 7. Frecuencia de OC, Ct, *E. coli* y *Salmonella* en jugo de zanahoria provenientes del restaurante Vips

Microorganismo o grupo	Frecuencia	
	%	
OC (UFC/g)	100	20/20
Ct (NMP/g)	40	20/8
<i>E. coli</i> (NMP/g)	20	20/4
<i>Salmonella</i>	10	20/2

Tabla 8. Valores mínimos, medianas y máximos de microorganismos indicadores en jugo de zanahoria provenientes del restaurante Vips

Microorganismo o grupo	Mínimo	Mediana	Máximo
OC (UFC/g)	6.0×10^2	2.1×10^4	1.0×10^7
Ct (NMP/g)	<0.3	112	1100
<i>E. coli</i> (NMP/g)	<0.3	25	38

Los resultados obtenidos del análisis microbiológico de los jugos de zanahoria de estos restaurantes inicialmente clasificados de aparente mediana higiene, los colocan dentro de los de baja higiene. Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, en nuestro país desafortunadamente no existe una norma microbiana sobre los límites microbianos que deben tener como máximo los jugos de zanahoria; sin embargo, comparando nuestros resultados con los límites microbianos permitidos para ensaladas de verduras crudas podemos observar que la mayoría de las muestras de jugos que analizamos de estos dos establecimiento es tan muy por arriba de los límites permitidos (NOM-093-SSA1-1994).

Finalmente, los resultados microbiológicos de los jugos procedentes de los sitios considerados de baja higiene se presentan en las tablas 12 a 15. Al igual que en los casos anteriores, los jugos obtenidos en estos sitios mostraron deficiente calidad microbiológica. Los obtenidos en el comercio de la vía pública presentaron una frecuencia de *E. coli* del 20% y *Salmonella* se recuperó en el 10% de las muestras (Tabla 12). Los OC, Ct y *E. coli* se aislaron en niveles considerables con un máximo de 5.1×10^8 (Tabla 13). Es interesante notar que en general, el análisis microbiológico practicado de los jugos de este establecimiento fue similar a los de aparente alta y media higiene.

En los jugos procedentes del mercado se registró la mayor frecuencia de *E. coli* (Tabla 14) y el mayor nivel de OC de todos los sitios analizados (Tabla 15).

Tabla 9. Frecuencia de OC, Ct, *E. coli* y *Salmonella* en jugo de zanahoria provenientes del restaurante La Blanca

Microorganismo o grupo	Frecuencia	
	%	
OC (UFC/g)	100	20/20
Ct (NMP/g)	70	14/20
<i>E. coli</i> (NMP/g)	25	5/20
<i>Salmonella</i>	20	4/20

Tabla 10. Valores mínimos, medianas y máximos de microorganismos indicadores en jugo de zanahoria provenientes del restaurante La Blanca

Microorganismo o grupo	Mínimo	Mediana	Máximo
OC (UFC/g)	5.6×10^3	1.0×10^6	2.6×10^6
Ct (NMP/g)	<0.3	75	1100
<i>E. coli</i> (NMP/g)	<0.3	23	240

Tabla 11. Frecuencia de OC, Ct, *E. coli* y *Salmonella* en jugo de zanahoria provenientes del restaurante Ciro's

Microorganismo o grupo	Frecuencia	
	%	
OC (UFC/g)	100	20/20
Ct (NMP/g)	50	10/20
<i>E. coli</i> (NMP/g)	20	4/20
<i>Salmonella</i>	25	5/20

Tabla 12. Valores mínimos, medianas y máximos de microorganismos indicadores en jugo de zanahoria provenientes del restaurante Ciro's

Microorganismo o grupo	Mínimo	Mediana	Máximo
OC (UFC/g)	9.3×10^2	1.6×10^6	3.8×10^7
Ct (NMP/g)	<0.3	64	1100
<i>E. coli</i> (NMP/g)	<0.3	33	460

No existen datos disponibles en la literatura sobre la calidad microbiológica de jugos crudos de zanahoria que nos permitan comparar los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, los elevados niveles de OC y Ct que se detectaron en los jugos nos revelan alimentos de pobre higiene. Debe entenderse que la falta de higiene se refiere a diferentes aspectos como la no desinfección de las zanahorias o la inadecuada desinfección de ellas previo a la obtención del jugo, la utilización de utensilios mal saneados; mala higiene personal de los preparadores; contaminación cruzada durante su preparación, una intensa exposición a la contaminación durante su comercialización o no refrigeración del producto.

A diferencia de *E. coli*, a los OC no se les reconoce valor indicativo de contaminación fecal en los alimentos, como ocurre con el agua. Su presencia en los alimentos no implica un riesgo a la salud (Fernández, 1981). Esto es debido a que los OC son frecuentes en vegetales crudos (Duncan y Razzell, 1972; Geldreich y Clarke, 1966; Hargrove y col., 1969; Prokopowich y Blank, 1991; Solomon y Kautter, 1988). Los OC se emplean como indicadores de la eficiencia de los procesos de desinfección de materiales y equipo. Las altas cuentas de OC en el jugo pueden explicarse de dos maneras: una intensa exposición a la contaminación durante la cosecha, recolección, transporte y comercialización de las zanahorias y el jugo sin posterior desarrollo; o una discreta contaminación del jugo y en función de su riqueza en nutrientes, alta humedad, y temperatura ambiente, que favoreció la multiplicación de los microorganismos.

Tabla 13. Frecuencia de OC, Ct, *E. coli* y *Salmonella* en jugo de zanahoria provenientes de comercio en la vía pública

Microorganismo o grupo	Frecuencia	
	%	
OC (UFC/g)	100	20/20
Ct (NMP/g)	75	15/20
<i>E. coli</i> (NMP/g)	20	4/20
<i>Salmonella</i>	10	2/20

Tabla 14. Valores mínimos, medianas y máximos de microorganismos indicadores en jugos de zanahoria provenientes de comercio en la vía pública

Microorganismo o grupo	Mínimo	Mediana	Máximo
OC (UFC/g)	1.2×10^3	8.4×10^4	5.1×10^8
Ct (NMP/g)	<0.3	27.5	460
<i>E. coli</i> (NMP/g)	<0.3	<0.3	36

Tabla 15. Frecuencia de OC, Ct, *E. coli* y *Salmonella* en jugo de zanahoria provenientes del mercado Benito Juárez

Microorganismo o grupo	Frecuencia	
	%	
OC (UFC/g)	100	20/10
Ct (NMP/g)	60	12/20
<i>E. coli</i> (NMP/g)	35	7/20
<i>Salmonella</i>	25	5/20

Tabla 16. Valores mínimos, medianas y máximos de microorganismos indicadores en jugo de zanahoria provenientes de comercio dentro de mercado Benito Juárez

Microorganismo o grupo	Mínimo	Mediana	Máximo
OC (UFC/g)	8.6×10^2	9.8×10^6	2.5×10^9
Ct (NMP/g)	<0.3	21.5	1100
<i>E. coli</i> (NMP/g)	<0.3	<0.3	210

Este desarrollo puede ser tan activo que rápidamente alcancen su concentración máxima en el alimento. La segunda opción parecería la más viable, si bien en las condiciones prevalentes de producción y comercialización del jugo de zanahoria, es posible la ocurrencia de ambas. Este señalamiento es de especial significado cuando los microorganismos involucrados tienen carácter patógeno, ya que se puede estar propiciando la contaminación y su desarrollo en el alimento.

A diferencia de *E. coli*, a los OC no se les reconoce valor indicativo de contaminación fecal en los alimentos, como ocurre con el agua. Su presencia en los alimentos no implica un riesgo a la salud (Fernández, 1981). Esto es debido a que los OC son frecuentes en vegetales crudos (Duncan y Razzell, 1972; Geldreich y Clarke, 1966; Hargrove y col., 1969; Prokopowich y Blank, 1991; Solomon y Kautter, 1988). Los OC se emplean como indicadores de la eficiencia de los procesos de desinfección de materiales y equipo. Las altas cuentas de OC en el jugo pueden explicarse de dos maneras: una intensa exposición a la contaminación durante la cosecha, recolección, transporte y comercialización de las zanahorias y el jugo sin posterior desarrollo; o una discreta contaminación del jugo y en función de su riqueza en nutrientes, alta humedad, y temperatura ambiente, que favoreció la multiplicación de los microorganismos. Este desarrollo puede ser tan activo que rápidamente alcancen su concentración máxima en el alimento. La segunda opción parecería la más viable, si bien en las condiciones prevalentes de producción y comercialización del jugo de zanahoria, es posible la ocurrencia de ambas. Este señalamiento es de especial significado cuando los microorganismos involucrados tienen carácter patógeno, ya que se puede estar propiciando la contaminación y su desarrollo en el alimento.

En cuanto al hallazgo de *E. coli* en el jugo de zanahoria, es sabido que su presencia indica contaminación fecal directa o indirecta; su hallazgo, implica la posibilidad de que un patógeno pueda estar presente (Geldreih y Clarke, 1966; Andrews y col., 1976). También, números considerables de *E. coli* en ensaladas de verduras crudas o jugo de betabel, sugiere en general carencia de higiene y de inapropiadas manipulaciones así como un mal almacenamiento (Noguera, 2005; Ramírez, 2006).

Cabe señalar que aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* que se aíslan de alimentos o muestras ambientales no son patógenas, existen algunas que sí lo son tal como *E. coli* O157:H7 cuya dosis mínima infectante es muy baja (10-100 células) (Fernández, 2000).

Sin embargo, debido a la forma en como se obtienen y comercializan los jugos de zanahoria, es posible que algunas de las cepas de *E. coli* que se identificaron sean patógenas.

Desafortunadamente, en nuestro país no existe norma para jugos de zanahoria o jugos de verduras crudas para poder realizar una comparación de los resultados obtenido, sin embargo, de acuerdo a los límites establecidos por la ICMSF (1986) (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) para jugos en general, los niveles de OC, Ct y *E. coli* de la mayoría de las muestras que analizamos están fuera de norma (100 UFC/ mL).

Es destacable la alta frecuencia con la que se aisló *Salmonella* en los jugos: 17.5 % (21 muestras de 120). Esta frecuencia rebasa por mucho la que en general se reporta para verduras crudas que es de entre 1 a 5 % (FDA, 2001). La frecuencia de *Salmonella* que observamos en los jugos de zanahoria es mucho mayor a la que se observó recientemente en jugo de betabel (Ramírez, 2006); en ese estudio se obtuvo sólo una frecuencia de *Salmonella* del 1.25 %.

Recientemente se realizó un estudio sobre la calidad microbiológica de ensaladas de verduras crudas compradas en los mismos restaurantes de aparente alta y media higiene incluidos en los estudios de jugo de zanahoria; en las ensaladas se encontraron niveles semejantes OC, Ct y *E. coli* que los que observamos en los jugos de zanahoria. Y aunque con una frecuencia más baja, *Salmonella* se aisló también de las ensaladas compradas en los 4 sitios (Noguera, 2005).

Aunque no se cuantificó la concentración de *Salmonella* en los jugos de zanahoria, su presencia a cualquier concentración es inaceptable. La razón es que este patógeno muestra una dosis infectante muy baja (al rededor de 100 células) (Cliver, 1990).

Por otro lado, cualquier incremento en la concentración de *Salmonella* en los jugos de zanahoria incrementa el riesgo de enfermedad. Es bien sabido que *Salmonella* puede multiplicarse si las condiciones ambientales tales como el contenido de nutrientes, el valor de pH, y la actividad de agua favorecen su crecimiento (Ramírez, 2006). En este sentido, se reconoce la necesidad de mejorar o establecer programas de regulación y vigilancia de alimentos que se

venden en las calles ya que estos representan un riesgo elevado de enfermedad a los consumidores. Cabe mencionar que las medidas encaminadas a solucionar estos problemas, deben involucrar el incremento de la educación sanitaria de los manipuladores y consumidores, así como elevar la capacitación técnica de los inspectores y personal encargado de la regulación de los establecimientos de alimentos que se venden en mercados y en la vía pública. Finalmente, se ha mencionado la factibilidad de aplicar el sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) como alternativa para garantizar la inocuidad de los alimentos que se venden en servicios de alimentos como los restaurantes que analizamos o bien en la vía pública (Brayan, 1988; Caballero y col., 1998).

Los datos que hemos obtenido muestran que los jugos de zanahoria que analizamos representa un riesgo para la población.

Los resultados de la calidad sanitaria de estos alimentos, demuestran la existencia de problemas de contaminación microbiológica, inadecuada o nula desinfección y en general deficientes condiciones de higiene durante la preparación de los jugos que deben prevenirse mediante acciones más eficientes de las autoridades para garantizar la salud de los consumidores y con ello prevenir brotes de enfermedades transmitidas por alimentos.

En la tabla 16 se presenta un resumen de los datos microbiológicos que se observaron en los jugos de zanahoria.

Tabla 17. Mediana y frecuencia de microorganismos aislados de jugos de zanahoria obtenido en restaurantes con tres niveles aparentes de higiene.

Nivel de Higiene	Restaurante	No. de muestras	Microorganismo o grupo microbiano	Mediana	Frecuencia %
Alta	Vips	20	OC (a)	2.1×10^4	100
			CF (b)	< 0.3	40
	Sanborns	20	<i>E. coli</i> (b)	< 0.3	20
			<i>Salmonella</i>	-	10
Media	Ciro's	20	OC (a)	1.7×10^6	100
			CF (b)	6	50
	La Blanca	20	<i>E. coli</i> (b)	<0.3	20
			<i>Salmonella</i>	-	25
Baja	Comercio en vía pública	20	OC (a)	1.1×10^5	100
			CF (b)	36	75
	Puestos del mercado	20	<i>E. coli</i> (b)	<0.3	20
			<i>Salmonella</i>	-	10
Baja	Puestos del mercado	20	OC (a)	4.6×10^6	100
			CF (b)	20	60
	Puestos del mercado	20	<i>E. coli</i> (b)	3	35
			<i>Salmonella</i>	-	25

(a) UFC/g; (b) NMP/g; - no aplica

5.2 Estudios del comportamiento de grupos patógenos de *E. coli* y *Salmonella* en jugo.

El evaluar el comportamiento de microorganismos patógenos en alimentos como son *Escherichia coli* (enteropatógena, enterotoxigénica y enteroinvasiva) y *Salmonella typhimurium* en jugo de zanahoria), no es una tarea fácil ya que diversos factores (en ocasiones incontrolables) tienen influencia directa en los resultados finales como pueden ser: las condiciones de cultivo del inóculo, el procedimiento de inoculación, el tratamiento, procesamiento o almacenamiento de las muestras y los métodos para detectar o enumerar los patógenos en jugo de zanahoria (Beuchat y col., 2001a).

Para estudiar el comportamiento de los patógenos en jugo de zanahoria, se recurre a modelos de laboratorio que consisten en inocular el jugo con un número conocido de microorganismos, almacenarlas para monitorear su comportamiento y finalmente efectuar recuentos periódicos de las porciones inoculadas para poder conocer si el microorganismo se multiplica, muere o permanece en números constantes sobre el alimento. Para realizarlo, se emplearon cepas de microorganismos resistentes al antibiótico rifampicina (R+), este es un potente antibiótico de amplio espectro. Se recurrió al empleo de cepas R+ debido a que la flora nativa (psicrótrofos, mesófilos, bacterias lácticas, levaduras, etc.) nativas del jugo de zanahoria era capaz de crecer en los medios de cultivo selectivos para *Salmonella* o *E. coli* interfiriendo con el monitoreo del comportamiento de tales microorganismos. Además, como todo medio de cultivo selectivo, los que empleamos para el recuento de ambos microorganismos, manifiestan un cierto efecto inhibitorio sobre una porción de la población de los patógenos, es decir, la

recuperación del microorganismo no es completa (González y col., 1994). En consecuencia, durante su monitoreo, existía la posibilidad de subestimar el número de microorganismos de estudio presentes. De esta manera, al utilizar medio de cultivo no selectivo con suficiente concentración de antibiótico, desarrollarían únicamente las células patógenas R+, sin interferencia de flora asociada y eliminando el efecto inhibitorio de los medios de cultivo selectivos. Bajo esta condición, el número de colonias de las cepas resistentes que desarrollan en el medio de cultivo con el antibiótico, podría ser atribuido exactamente al que se encuentra en el jugo de zanahoria.

En el laboratorio obtuvimos cepas de *Salmonella* y *E.coli* resistentes a 100 ppm de rifampicina. Esta concentración del antibiótico fue suficiente para inhibir por completo a la flora nativa del jugo de zanahoria.

Por otro lado, en todos los estudios que efectuamos se trabajó con mezclas de cepas de *E. coli* del mismo grupo patógeno. El utilizar mezclas de diferentes cepas de un mismo microorganismo patógeno para evaluar su comportamiento en un material es un procedimiento muy utilizado (Castillo y col, 1998; Meza, 2000; Beuchat y col., 2001a). Cuando se utiliza una mezcla de cepa se obtienen valores más representativos de su comportamiento que cuando se utilizan de manera individual o por separado.

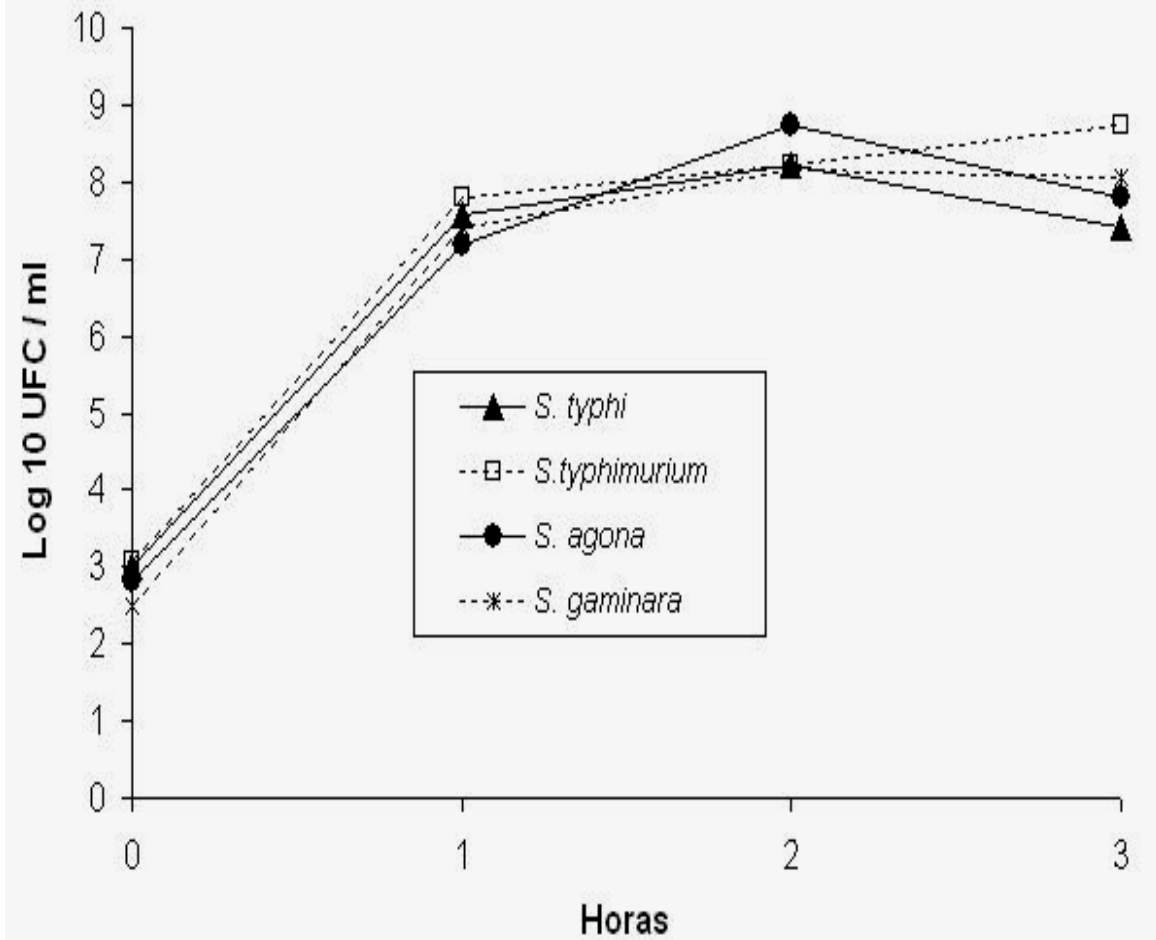
Evaluamos el comportamiento de los microorganismos a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$. El estudio se justifica ya que durante la comercialización con frecuencia el jugo de zanahoria es mantenidas a tales temperaturas.

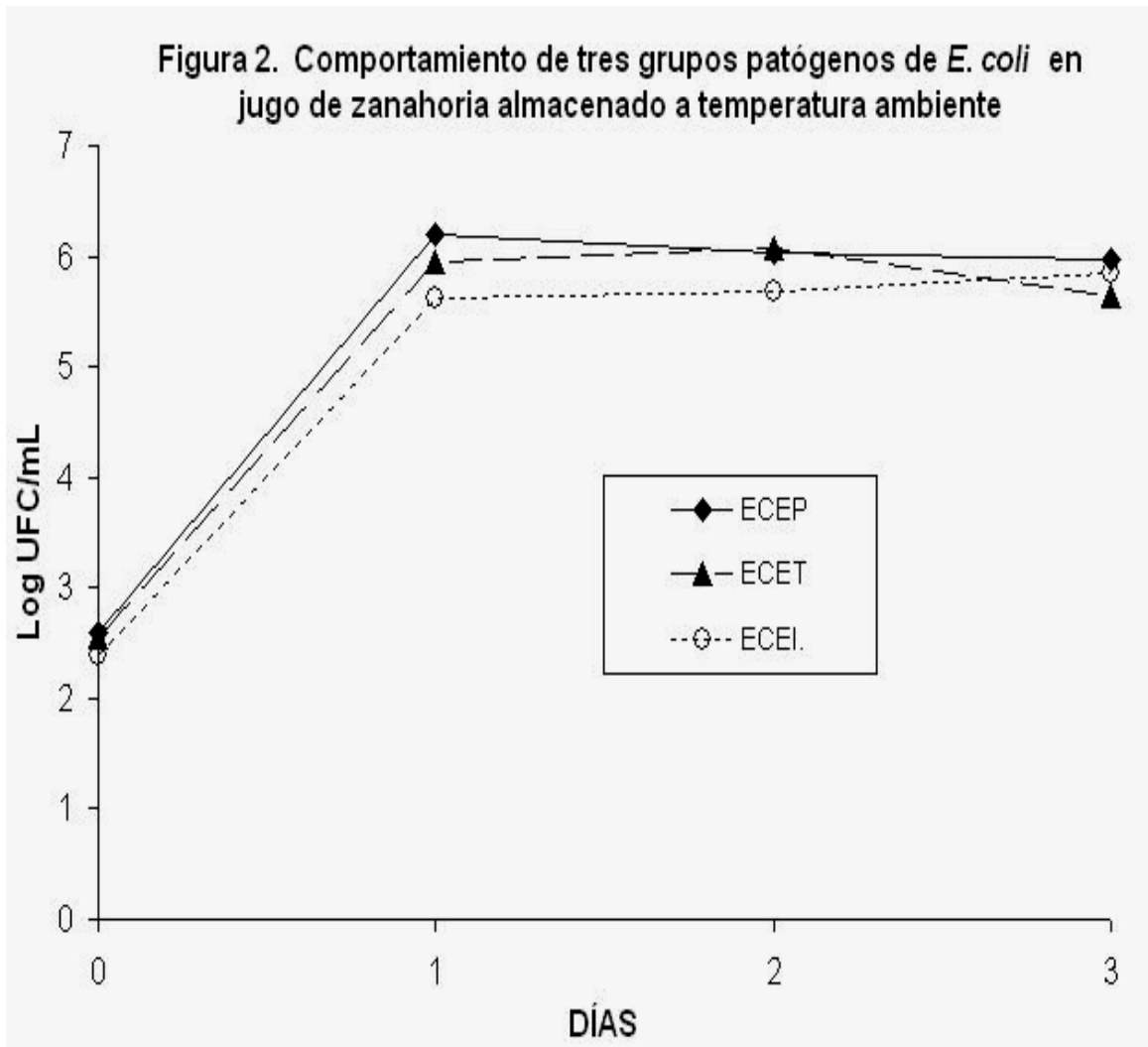
Tanto los tres grupos patógenos de *E. coli* como los cuatro serotipos de *Salmonella* se multiplicaron en el jugo almacenado a temperatura ambiente (Figura 1 y 2); Para el caso de los grupos patógenos de *E. coli* los tres grupos mostraron un comportamiento semejante: alcanzaron una concentración de alrededor de 6 Log UFC/mL de jugo a las 24 h de incubación, a partir de entonces la concentración se mantuvo prácticamente constante al menos hasta el tercer día (Figura 1). Los cuatro serotipos de *Salmonella* también mostraron un comportamiento semejante entre si (Figura 2). No obstante, a diferencia de *E. coli*, *Salmonella* alcanzó una concentración de alrededor de 8.5 Log UFC/mL a las 24 h de incubación (Figura 2); después de este tiempo la concentración de los cuatro serotipos de *Salmonella* en el jugo se mantuvo prácticamente constante hasta el tercer día de estudio. En refrigeración, los tres grupos patógenos de *E. coli* también se multiplicaron, no obstante el desarrollo fue menor que el observado a temperatura ambiente; los tres grupos alcanzaron un incremento de 1 a 1.4 log hasta el tercer día de almacenamiento (Figura 3).

Para el caso de *Salmonella*, ninguno de los cuatro serotipos se multiplico en refrigeración, no obstante su número se mantuvo constante (Figura 4).

No existen reportes en la literatura sobre comportamiento de grupos patógenos de *E. coli* o serotipos de *Salmonella* en jugo de zanahoria para hacer una comparación con los resultados que hemos obtenido.

Figura 1. Comportamiento de 4 serotipos de *Salmonella* en jugo de zanahoria almacenado a temperatura ambiente.





No obstante, existen diversas publicaciones sobre el comportamiento de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 (enterohemorrágica) en otros tipos de jugos. Por ejemplo, se ha observado potencial de desarrollo de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 en jugo de naranja no pasteurizado (Miller y Kaspar 1994; Splittstoesser 1976; Paris y Higgins, 1997; Rojas y Castillo, 2003). Se ha observado además que tanto *Salmonella* como *E. coli* pueden sobrevivir por largos periodos en jugos mantenidos en refrigeración y aun con pH por debajo de 4 (Miller y Kaspar 1994; Splittstoesser, 1976). Estudios realizados con *E. coli* O157:H7 en jugos de manzana demuestran una sobrevivencia del patógeno de hasta 18 días después de ser inoculado el jugo (Miller y Kaspar, 1994), Parish y Higgins (1989) mencionan que *Listeria* y *E. coli* O157:H7 sobreviven hasta de 24 días en jugo de naranja no pasteurizado, en ambos estudios tanto en jugo de manzana como el jugo de naranja a un pH de 4.6 se logran observar reducciones en la concentración de microorganismos después del primer día de estudio (Splittstoesser y col., 1996).

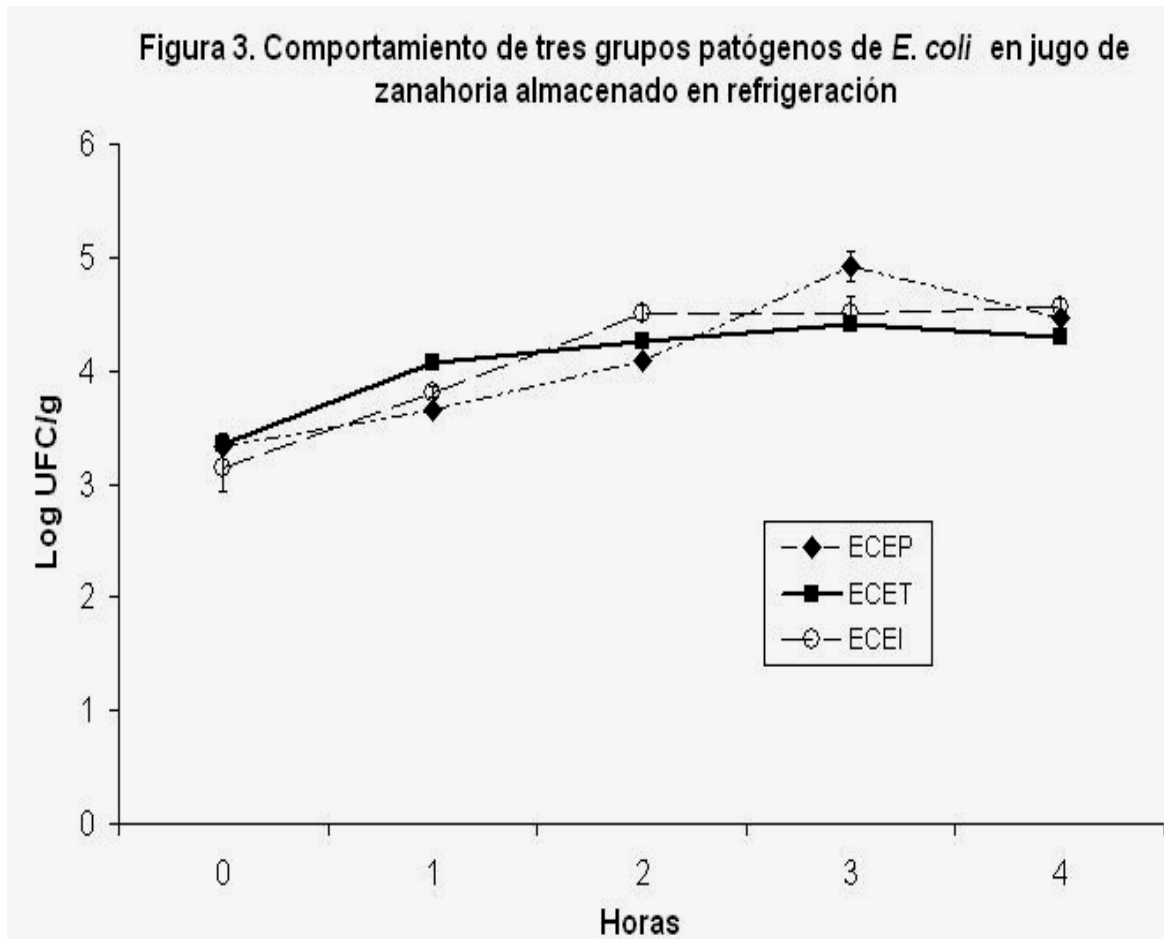
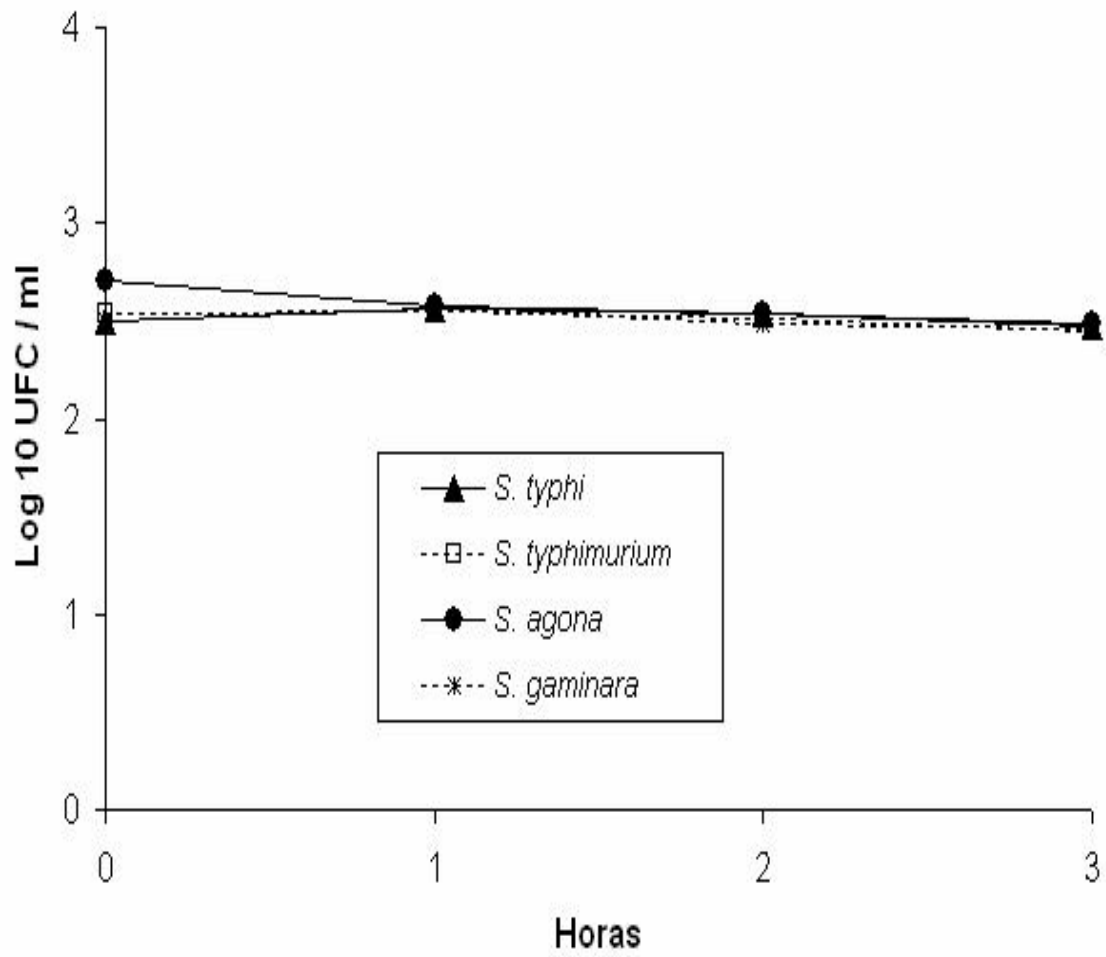


Figura 4. Comportamiento de 4 serotipos de *Salmonella* en jugo de zanahoria almacenado en refrigeración.



Otro estudio realizado por Paris (1998) con *Listeria* y *Salmonella* en jugos de naranja con pH inferiores de 4.0 demuestra que ambos patógenos no logran tener actividad. Y cepas de *E.coli* O57:H7 y *Listeria* no logran sobrevivir en jugos de lima y limón (FDA, 2000).

En nuestro estudio es importante destacar que la concentración que alcanzaron a las 24 h tanto los grupos patógenos de *E. coli* como los serotipos de *Salmonella* en el jugo de zanahoria mantenido a temperatura ambiente es más que suficiente para provocar un padecimiento. Se reporta que la dosis mínima infectante de *Salmonella* es de alrededor de 100 células y la de *E. coli* enteroinvasiva de 10,000 y de 1000, 000 para la patógena y toxigénica.

Más aun, aunque limitado, se observo también desarrollo de los tres grupos patógenos de *E. coli* en jugo mantenido en refrigeración. Aunque como se mencionó, la dosis mínima infectante de los grupos patógenos de *E. coli* es alta, hay que considerar que las concentración de los patógeno que se reportan en las gráficas es por mL de jugo; sí se considera que en promedio una persona consume 100 mL de jugo de zanahoria o más, habría que multiplicar entonces la concentración máxima alcanzada por 100 para conocer la cantidad de microorganismo patógeno que el individuo estaría ingiriendo junto con un jugo contaminado con *Salmonella* o algún grupo patógeno de *E. coli* en donde pudo ocurrir un discreto crecimiento en refrigeración.

Los resultados muestran que la refrigeración no constituye un método que conserve o mejore la inocuidad microbiana del jugo de zanahoria una vez contaminada con alguno de los patógenos que estudiamos. Por lo que un jugo

contaminado con algún microorganismo patógeno aun en refrigeración sigue siendo un alimento de riesgo.

En los restaurantes en ocasiones los jugos son preparados con mucho tiempo previo a su consumo; si éstos desde el inicio están contaminados con alguno de los patógenos estudiados, es posible que se multipliquen en el jugo si se mantienen a temperatura ambiente. Es práctica común también en puestos de la vía pública o en fondas el tener por varias horas los jugos de zanahoria a temperatura ambiente; tiempo suficiente para que los patógenos se multiplique convirtiéndolo en alimentos de riesgo para la población.

Debido al alto número de brotes que se han presentado por consumo de jugos de frutas no pasteurizados, y sobre todo por la severidad de las infecciones causadas por los patógenos involucrados en tales brotes, muchos países, han implementado nuevas reglas y sistemas con la finalidad de disminuir los riesgos a la salud asociados al consumo de jugos no pasteurizados (Brayan, 1988; Caballero y col., 1998)

Los resultados obtenidos en la presente investigación sugieren que para lograr la inocuidad de este tipo de productos es necesario aplicar algún tratamiento que garantice la disminución o, preferentemente, la eliminación de estos patógenos. Sin lugar a dudas, el tratamiento más adecuado es la pasteurización. Sin embargo, muchos de estos jugos son obtenidos en restaurantes, supermercados, fondas y locales de la vía pública lo cual hace difícil que estos se pastericen en estos sitios; en consecuencia, es necesario

implementar medidas alternas que permitan reducir o eliminar los peligros microbiológicos potencialmente presentes en el jugo de zanahoria crudo.

Se ha propuesto el uso de ácidos orgánicos tales como: ácido láctico, ácido sórbico y ácido propiónico en concentraciones de 0.1%, como una alternativa adecuada en este tipo de jugos, para la disminución del riesgo (Uljas y Ingham, 1999).

Otra alternativa mas racional, es la implementación obligatoria del sistema HACCP (por sus siglas en ingles: Hazard Analysis and critical Control Point). Sin embargo, bajo las condiciones de trabajo de los sitios donde se preparan jugos de zanahoria a baja escala, muchas de las veces es difícil y en algunos casos imposible la implementación del sistema HACCP ya que es necesario cumplir una serie de prerrequisitos básicos de higiene (HACCP).

Se hace necesario evaluar métodos de desinfección alternativos a la pasteurización que permitan disponer de zanahorias libres de microorganismos patógenos además de observar prácticas sanitarias adecuadas durante la producción, transporte, comercialización y almacenamiento de estas las zanahorias para evitar contaminación con microorganismos patógenos.

Los resultados microbiológicos de los jugos zanahoria obtenidos en diferentes restaurantes durante el periodo analizado, demuestran la existencia de problemas serios de contaminación microbiológica (de origen, cruzada o ambas) que deben prevenirse y controlar mediante acciones más eficientes. Esta mala calidad microbiológica, aunada al potencial que exhibieron los grupos patógenos

de *E. coli* y *Salmonella* para desarrollar en el jugo, siguieren un alimento de riesgo para la población.

Finalmente, es importante considerar que aunque el estudio abarcó pocos establecimientos y de una sola ciudad, los resultados dan una idea del nivel de higiene que se puede tener en los servicios de alimentos (al menos en la producción de jugos) y además sugieren la posibilidad de que el nivel de higiene que se encontró en los jugos, se mantenga en otros establecimientos, no sólo de la ciudad donde se desarrollo el estudio, sino también en restaurantes de otras ciudades o estados de México.

VI. CONCLUSIONES

1. Todos los jugos presentaron mala calidad microbiológica respecto al contenido de OC, CF y *E. coli* independientemente del lugar de procedencia.
2. El 23.3 % de todos los jugos presentó contaminación fecal.
3. Independientemente del sitio de compra de los jugos, en todos ellos se aisló *Salmonella* en un porcentaje importante.
4. Los jugos obtenidos de un restaurante de aparente alta higiene (Vip's) y los obtenidos en la vía pública presentaron la menor frecuencia de *Salmonella*.
5. No existió diferencia en la calidad microbiológica de los jugos por su origen de compra; en otras palabras, el riesgo de enfermedad prácticamente es el mismo si se consume jugo de zanahoria obtenido en la vía pública o en un restaurante establecido.
6. Los tres grupos patógenos de *E. coli* mostraron capacidad para multiplicarse tanto a temperatura ambiente (22°C) como de refrigeración; a diferencia, los cuatro serovares de *Salmonella* sólo a 22°C.
7. Los jugos analizados resultaron de riesgo para la población consumidora. Es conveniente llevar a cabo una vigilancia más estricta en la elaboración de jugos, tanto de las autoridades como de los productores.
8. Como en los países desarrollados, es necesario de regular la venta y consumo de jugos crudos; la venta de jugo crudo sólo se debiera permitir siempre y cuando el producto se haya obtenido bajo sistemas adecuados de higiene tales como el HACCP.

9. Por ello, es necesario evaluar tratamientos de desinfección que aseguren la eliminación de estos patógenos de las zanahorias crudas que se emplearán en la elaboración del jugo.
10. Se recomienda realizar mayores estudios en los establecimientos donde se obtuvieron los jugos con la finalidad de determinar el origen de los problemas. La información derivada de estos estudios permitirá atender con eficiencia los problemas higiénicos en estos sitios y, en lo sucesivo, prevenirlos; contribuyendo con ello a la disminución de los brotes de enfermedad por consumo de jugos de zanahoria.
11. Mientras no se modifiquen las medidas higiénicas durante la producción y comercialización de los jugos de zanahoria en los sitios analizados, nuestro estudio sugiere no consumir al menos en esos sitios jugo de zanahoria crudo debido al riesgo de enfermedad que existe.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, H. W., Diggs, C. D., Miescier, J. J., Wilson, C. R., Goodwin, C. P., Adams, W. N., Furtari, S. A. y Musselman, J. F. 1976. Validity of members of the total coliform and fecal coliform groups for indicating the presence of *Salmonella* in the *Mercenaria*. J. Milk Food Technol. 39: 322-324.
- Bean, N. H., Goulding, J. S., Daniels, M. T. y Angulo, F. J. 1997. Surveillance of foodborne disease outbreaks- United States, 1988- 1992. J. Food Prot. 60: 1265-1268.
- Belitz, H. D. y Grosch, W. 1997. Química de los alimentos. 2ª ed. Editorial Acribia. Zaragoza.
- Benenson, Abram S. 1990. Control of Communicable Diseases in Man, 15th edition. Washington, D.C.: American Public Health Association.
- Beuchant, L. R. y Rice, S. L. 1979. *Byssochlamys* ssp. And their importance in processed fruits. J. Adv. Food R. 25: 237-288.
- Beuchat, L.R. y Brackett, R. E. 1990 Inhibitory effect of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1734-1742.
- Beuchat, L. R., Harris, L. R., Ward, T. E. y Kajs, T. M., 2001a. A Development of proposed standard method for assessing the efficacy of fresh produce sanitizers. J. Food Prot. 64: 1103-1109.
- Beuchat, L. R., Farber, J. F., Garret, E. H., Harris, L. J., Parish, M. E., Suslow, T. V., y Busta, F. F. 2001b. Standardization of a method to

- determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. *J. Food Prot.* 64: 1080-1084.
- Black, R.E., Brown, K.H. y Becker, S., 1982. Longitudinal studies of infectious diseases and physical growth of children in rural Bangladesh. Incidence of diarrhea and association with known pathogens. *J. Epidemiol.* 115: 315-324
 - Blazer, M. R. y Newman, L. S. 1982. A review of human salmonellosis. *Rev. Infect. Dis.* 4: 1096-1106.
 - Brayon, F. L. 1988. Critical control point of street vended foods. *J. Food Protect.* 51: 373-84.
 - Bucle, K. 1995. 8th Australian food microbiology conference. *Trends Food. Sci. and Technol.* 6: 163-166.
 - Bullerman, L. B. 1981. Methods for detecting mycotoxins in foods and beverages. 2ª ed. Editorial L. R. Beuchat. EUA.
 - Burgeois, M. 1996. Microbiología Alimentaria. Editorial Acriba. Volumen 1.
 - Caballero, T. A., Carrera, V. J., Legomin, F. M. 1998. Evaluación de la vigilancia microbiológica de alimentos que se venden en las calles. Instituto de nutrición e higiene de los alimentos. *Rev. Cubana.* 12: 7-10
 - Castillo A., L.M. Lucia, K.J. Goodson, J.W. Savell and G.R. Acuff. 1998. Comparison of water wash, trimming and combined hot water and lactic acid treatments for reducing bacteria of fecal origin on beef carcasses. *Journal of food protection* Vol 61, No 7, 1998, Pages 823-828.

- CDC. 1991. Multistate outbreak of *Salmonella poona* infections – United States and Canada. *Morb. Mort. Weekly Rep.* 40: 549-552.
- CDC. 2000. Surveillance of foodborne-disease outbreaks United States, 1993-1997. *Morb. Mort. Weekly Rep.* 49 (SS01): 1-51.
- Chrdash, R. A. 1978. Incidence and pathological significance of *Escherichia coli* and other sanitary indicator organisms in food and water. *J. Food Technol.* 54-58.
- Cliver, D. O. 1990. *Foodborne Diseases.* Acad. Press, New York.
- Cody, S. H., Glynn, M. K. y Farrar, J. A. 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Ann Intern Med.* 130: 202-9.
- Deak, T. y Beuchat, L. R. 1993. Yeasts associated with juice concentrated, *J. Food Prot.* 50: 243-264.
- Doyle, M. P. y Cliver, D. O. 1990. *Escherichia coli.* Acad. Press. Inc. 60: 209-215.
- Duncan, D. W. y Razzell, W. E. 1972. *Klebsiella* biotypes among coliform isolated from forest environments and farm produce. *Appl. Microbiol.* 24: 933-938
- Eslava, C., Villaseca, J. M. y Cravioto, A. 1993. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. *En: Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales.* Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, México, D.F. 251-265.

- FDA (Food and Drug Administration). 2001. Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce Chapter IV *In: Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-cut produce*. Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- FDA (Food and Drug Administration). 2001. Hazard analysis and critical control point (HACCP); procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice; final rule. Fed. Register 66(13):6137
- FDA/CFSAN, 2001. Bacteriological Analytical Manual Online, <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>
- Fernández, E. E. 1981. Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos. Universidad de Guadalajara, México.
- Fernández E. E. 2000. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Francis, A. J., Spanggord, R. J. y Ouchi, G. I. 1975. Degradation of lindane by *Escherichia coli*. Appl. Microb. 556-568
- Geldreih, E. E. y Clarke, N. A. 1966. Bacterial Pollution indicators in the intestinal tract of freshwater fish. Appl. Microbiol. 14 : 184-187
- Geldreich, E. E. y Bordner, R. H. 1971. Fecal contamination of fruits and vegetables during cultivation and processing for market. J. Milk Food Technol. 34: 184-195

- González, N. M., Gomez, S. G. y Fernandez, E. E. 1994. Sobrevivencia de *V. cholerae* a la desecación. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México
- Guzewich, J. J. y Todd, E. C. D. 1997. Surveillance of foodborne disease. II. Summary and presentation of descriptive data epidemiological patterns; their value and limitations of Gyros. *J. Food Prot.* 43: 346-353
- Hargrove, R. E. Mc Donough, F. E. y Mattingly, W. A. 1969. Factors affecting survival of Salmonella in Cheddar and Colby cheese. *J. Milk Food Technol.* 32: 480-484.
- Harris, J. R., Marieno, J. y Wells, J. G. 1985. Person-to-person transmission in an outbreak of enteroinvasive *Escherichia coli*. *Am. J. Epidemiol.* 122: 245-252
- Hatcher, W. S., Weihe, J. L. y Splittstoesser. 1992. Fruit Beverages. *In: Vanderzant, C. and Splittstoesser, D. F. (eds). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.* Am. Pub. Health Assoc. Washington, DC
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1986. Microorganisms in foods. 2. Sampling for Microbiological analysis: Principles and Specific Application. 2nd ed. Toronto: University Toronto Press.
- Jay, M. J. 2000. Indicadores de la calidad e inocuidad microbiana de los alimentos. *Microbiología de los alimentos.* Zaragoza España

- Kapperud, G., Gustavsen, S., Hellesnes, I., Hasen, A. H., Lassen, J., Hirn, J., Jahkola, M., Montenegro, M. A. y Helmuth, R. 1990. Outbreak of *Salmonella typhimurium* infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60 megadalton virulence plasmid. *J. Clin. Microb.* 28: 2597-2601.
- Kornacki, J. L. y Marth, E. H. 1982. Fate of nonpathogenic and enteropathogenic *E. coli* during the manufacture of Colby. *J. Food Prot.* 45: 310–16.
- Marier, R., Wells, J. G. y Swanson, R. C. 1973. An outbreak of *Escherichia coli* foodborne disease traced to imported French cheese. *Lancet* 1376-1378.
- Meza, G J C. 2000. Preservación de la inocuidad del requesón mediante la incorporación de bacterias lácticas Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
- Miller, L. G. y Kaspar, C.W. 1994. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *J. Food Prot.* 57: 460-464.
- Moreno, G. D. 1994. Microbiología de los Alimentos. 1ª ed. Editorial Acriba.
- Mountney, G. J. y Wilburg, A. G. 1971. Fruits and Vegetables. Practical Food Microb. and Techn. 3rd .Ed. 249-259.
- Muller, G.1989. Microbiología de los alimentos vegetales. Editorial Acriba
- Noguera, U. Y. 2005. Frecuencia de *Salmonella*, *E. coli* y organismos coliformes en ensaladas listas para su consumo. Centro de Investigaciones

- Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tesis de licenciatura en Química en alimentos.
- Norma Oficial Mexicana NOM -109-SSA1-1994, Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Secretaría de salud. México
 - Norma Oficial Mexicana NOM-093-ssa1-1994, Bienes y Servicios. Practicas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Secretaría de Salud. México.
 - Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Procedimiento para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Secretaría de Salud. México.
 - Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del Número Más Probable. Secretaría de Salud. México.
 - Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de organismos coliformes totales en Placa. Secretaría de Salud. México
 - Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Secretaría de Salud. México.
 - Parish, M. E. y Higgins, D. P. 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. J. Food Prot. 52(3):144-147

-
- Parish, M. E, Narciso, J. A. y Friedrich, L. M. 1997. Survival of *Salmonella* in orange juice. J. of Food Safety 17: 273-81.
 - Parish, M. E. 1998. Coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* serovars associated with a citrus processing facility implicated in a salmonellosis outbreak. J. Food Prot. 61: 280-284
 - Prokopowich, D. y Blank, G. 1991. Microbiological evaluation of vegetables sprouts and seeds. J. Food Prot. 54 : 560-562.
 - Ramirez , T. L. 2006. Frecuencia y comportamiento de Salmonella y microorganismos indicadores de higiene en jugo de betabel. Tesis de Licenciatura. Centro de Investigaciones Químicas. U.AEH.
 - Rojas, T. y Castillo, Z. 2003. Supervivencia de un aislado de *Escherichia coli* O157:H7 en jugos de naranja no pasteurizados de expendio comercial. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 23(2):16-20.
 - Smith, H. W. y Gyles, C. L. 1970. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. J. Med. Microbiol. 3: 387-401
 - Solomon, H. M. y Kautter, D. A. 1988. Outgrowth and toxin production by *Clostridium botulinum* in bottled chopped garlic. J. Food Prot. 51: 862-865.
 - Splittstoesser. 1976. The microbiology of frozen vegetables. How they get contaminated and which organisms predominate. Food Technol. 1973: 54-55
 - Splittstoesser, D .F., McLellan, M. R. y Churey, J. J. 1996. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. J. Food Prot. 59(3):226-229.

- Uljas H. y Inghan S. 1999. Combinations of intervention treatments resulting in 5-Log-unit reductions in numbers of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimorium* DT104 organisms in apple cider. Appl. Environ. Microbiol. 65(5): 1924-1929.
- Vanderzant, C. y Splittstoesser, D. F. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3rd ed. American Public Health Assoc. Washington.

Páginas de internet:

- Fuente <http://www.faxsa.com.mx/>
- Fuente: http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdeagr.html

Anexo 1

Lugar: Sanboms

Tipo de restaurante: aparente alta higiene (Ah)

Número De muestra	Grupo microbiano			
	OC UFC/g	Ct NMP/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> (+/-)
1	1.9X10 ³	9.4	<3.0	Negativa
2	1.0x10 ⁵	120	38	Negativa
3	3.6X10 ⁶	<3.0	<3.0	Negativa
4	1.5X10 ³	210	35	Positiva
5	2.8X10 ⁴	<3.0	<3.0	Negativa
6	5.2X10 ³	460	<3.0	Negativa
7	2.0X10 ⁷	<3.0	<3.0	Negativa
8	1.6X10 ⁴	1100	27	Negativa
9	3.4X10 ³	<3.0	<3.0	Negativa
10	2.3X10 ⁶	<3.0	<3.0	Negativa
11	2.8X10 ⁴	460	20	Positiva
12	1.7X10 ⁴	<3.0	<3.0	Negativa
13	1.2X10 ⁶	15	<3.0	Negativa
14	3.4X10 ⁶	<3.0	<3.0	Negativa
15	1.6X10 ³	<3.0	<3.0	Negativa
16	7.9X10 ⁴	29	<3.0	Negativa
17	1.4X10 ⁴	<3.0	<3.0	Negativa
18	2.4X10 ⁴	93	<3.0	Positiva
19	1.1X10 ⁴	<3.0	<3.0	Negativa
20	2.4X10 ⁴	<3.0	<3.0	Negativa
Mínimo	1.5X10 ³	<3.0	<3.0	-*
Mediana	2.4X10 ⁴	120	31	-
Máximo	2.0X10 ⁷	1100	38	-
Frecuencia	100%	45%	20%	15%

* No aplica

Anexo 2

Lugar: Mps

Tipo de restaurante: aparente alta higiene (Ah)

Número De Muestra	<i>Grupo microbiano</i>			
	OC UFC/g	Ct NMP/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> (+/-)
1	1.7X10 ⁴	35	15	Negativa
2	6.0X10 ²	<3.0	<3.0	Negativa
3	2.0X10 ³	<3.0	<3.0	Negativa
4	1.3X10 ⁵	150	9.2	Positiva
5	3.3X10 ⁵	<3.0	<3.0	Negativa
6	2.5X10 ⁴	<3.0	<3.0	Negativa
7	1.3X10 ⁵	290	38	Negativa
8	2.0X10 ³	<3.0	<3.0	Negativa
9	1.2X10 ⁴	<3.0	<3.0	Negativa
10	3.4X10 ³	<3.0	<3.0	Negativa
11	2.3X10 ⁵	15	<3.0	Negativa
12	5.8X10 ³	160	<3.0	Negativa
13	3.3X10 ⁵	<3.0	<3.0	Negativa
14	2.0X10 ³	1100	36	Negativa
15	3.1X10 ⁴	<3.0	<3.0	Negativa
16	1.0X10 ⁷	36	<3.0	Negativa
17	1.8X10 ⁴	<3.0	<3.0	Negativa
18	2.4X10 ⁴	75	<3.0	Positiva
19	9.8X10 ³	<3.0	<3.0	Negativa
20	3.2X10 ⁴	<3.0	<3.0	Negativa
Mínimo	6.0x10 ²	<3.0	<3.0	_*
Mediana	2.1x10 ⁴	112	25	-
Máximo	1.0X10 ⁷	1100	38	-
Frecuencia	100%	40%	20%	10%

* No aplica

ANEXO 3

Lugar: La Blanca

Tipo de restaurante: aparente media higiene (Mh)

Número De Muestra	<i>Grupo microbiano</i>			
	OC UFC/g	Ct NMP/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> (+/-)
1	9.4X10 ⁴	<3.0	<3.0	Negativa
2	1.6X10 ⁴	<3.0	<3.0	Negativa
3	2.6X10 ⁶	75	<3.0	Negativa
4	8.4X10 ³	160	<3.0	Negativa
5	7.6X10 ⁴	290	23	Positiva
6	5.6X10 ⁶	64	21	Positiva
7	8.7X10 ⁴	36	<3.0	Negativa
8	2.1X10 ⁴	23	<3.0	Negativa
9	1.1X10 ⁵	93	<3.0	Negativa
10	3.3X10 ⁴	64	<3.0	Negativa
11	5.6X10 ⁶	150	<3.0	Negativa
12	1.9X10 ⁶	<3.0	<3.0	Negativa
13	6.8X10 ⁴	210	<3.0	Positiva
14	1.0X10 ⁶	<3.0	15	Negativa
15	3.2X10 ⁵	<3.0	<3.0	Negativa
16	5.6X10 ³	75	43	Negativa
17	1.1X10 ⁶	1100	240	Positiva
18	1.4X10 ⁴	<3.0	<3.0	Negativa
19	8.4X10 ⁵	20	<3.0	Negativa
20	2.5X10 ⁶	27	<3.0	Negativa
Mínimo	5.6x10 ³	<3.0	<3.0	-*
Mediana	1.0x10 ⁵	75	23	-
Máximo	2.6X10 ⁶	1100	240	-
Frecuencia	100%	70%	25%	20%

* No aplica

ANEXO 4

Lugar: Ciro's

Tipo de restaurante: aparente media higiene (Mh)

Número De Muestra	<i>Grupo microbiano</i>			
	OC UFC/g	Ct NMP/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> (+/-)
1	2.8X10 ⁷	460	<3.0	Negativa
2	3.6X10 ⁴	6.2	<3.0	Negativa
3	1.6X10 ⁶	64	11	Positiva
4	2.4X10 ⁶	240	<3.0	Negativa
5	8.2X10 ⁵	<3.0	<3.0	Negativa
6	1.4X10 ⁴	<3.0	<3.0	Negativa
7	1.5X10 ⁶	<3.0	<3.0	Negativa
8	2.1X10 ⁷	<3.0	<3.0	Negativa
9	5.2X10 ⁴	64	<3.0	Positiva
10	1.6X10 ⁶	7.4	<3.0	Negativa
11	2.7X10 ⁶	<3.0	<3.0	Negativa
12	9.3X10 ²	1100	460	Positiva
13	1.8X10 ⁶	<3.0	<3.0	Negativa
14	6.0X10 ⁶	<3.0	<3.0	Negativa
15	1.0X10 ⁷	<3.0	<3.0	Negativa
16	3.8X10 ⁷	<3.0	<3.0	Negativa
17	2.9X10 ⁶	210	38	Positiva
18	1.4X10 ⁷	38	28	Positiva
19	1.9X10 ⁶	<3.0	<3.0	Negativa
20	2.5X10 ⁶	38	<3.0	Negativa
Mínimo	9.3X10 ²	<3.0	<3.0	-*
Mediana	1.6X10 ⁶	64	33	-
Máximo	3.8X10 ⁷	1100	460	-
Frecuencia	100%	50%	20%	25%

* No aplica

ANEXO 5

Lugar: Comercio vía pública
 Tipo de restaurante: aparente
 baja higiene (Bh)

Número De Muestra	Grupo microbiano			
	OC UFC/g	Ct NMP/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> (+/-)
1	5.4X10 ⁴	3	<3.0	Negativa
2	2.3X10 ⁴	75	<3.0	Negativa
3	8.4X10 ⁴	6	<3.0	Negativa
4	5.1X10 ⁴	210	27	Negativa
5	4.6X10 ⁶	27	<3.0	Negativa
6	1.2X10 ³	240	23	Negativa
7	1.5X10 ³	36	<3.0	Negativa
8	5.1X10 ⁸	<3.0	<3.0	Negativa
9	1.8X10 ⁴	<3.0	<3.0	Negativa
10	8.5X10 ⁶	<3.0	<3.0	Negativa
11	2.0X10 ³	15	<3.0	Negativa
12	1.5X10 ⁵	64	3	Positiva
13	1.4X10 ⁶	460	<3.0	Negativa
14	1.6X10 ⁷	<3.0	<3.0	Negativa
15	2.4X10 ⁷	20	<3.0	Negativa
16	5.1X10 ⁸	<3.0	<3.0	Negativa
17	4.4X10 ⁸	43	36	Positiva
18	6.0X10 ⁴	290	<3.0	Negativa
19	2.4X10 ⁷	160	<3.0	Negativa
20	1.8X10 ³	28	<3.0	Negativa
Mínimo	1.2X10 ³	<3.0	<3.0	-*
Mediana	8.4x10 ⁴	27.5	<3.0	-
Máximo	5.1x10 ⁸	460	36	-
Frecuencia	100%	75%	20%	10%

* No aplica

ANEXO 6

Lugar: Puesto del mercado Benito Juárez

Tipo de restaurante: aparente baja higiene (Bh)

Número De muestra	Grupo <i>microbiano</i>			
	OC UFC/g	Ct NMP/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> (+/-)
1	3.2X10 ³	11	<3.0	Negativa
2	1.3X10 ⁶	43	<3.0	Negativa
3	9.0X10 ⁶	<3.0	<3.0	Negativa
4	1.1X10 ⁶	1100	20	Negativa
5	1.3X10 ⁷	1100	210	Positiva
6	8.6X10 ²	28	<3.0	Negativa
7	1.1X10 ⁷	<3.0	<3.0	Negativa
8	1.4X10 ⁷	240	29	Positiva
9	7.9X10 ⁶	290	7.2	Positiva
10	8.5X10 ⁶	11	<3.0	Negativa
11	6.8X10 ⁶	64	<3.0	Negativa
12	4.8X10 ⁴	38	<3.0	Negativa
13	1.1X10 ⁶	15	15	Positiva
14	1.0X10 ⁶	93	<3.0	Negativa
15	5.8X10 ⁶	<3.0	<3.0	Negativa
16	1.2X10 ⁷	<3.0	<3.0	Negativa
17	1.5X10 ⁷	<3.0	<3.0	Negativa
18	3.5X10 ⁷	<3.0	<3.0	Negativa
19	2.5X10 ⁹	<3.0	<3.0	Negativa
20	4.8X10 ⁷	290	7.2	Positiva
Mínimo	8.6X10 ²	<3.0	<3.0	-*
Mediana	9.8x10 ⁶	21.5	<3.0	-
Máximo	2.5X10 ⁹	1100	210	-
Frecuencia	100%	60%	35%	25%

* No aplica