



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO EN CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
LICENCIATURA EN QUÍMICA EN ALIMENTOS

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**Comportamiento de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*,
Escherichia coli O157:H7 y *Staphylococcus aureus* en
aguamiel y pulque.**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO EN ALIMENTOS
PRESENTA:**

CLAUDIO ALONSO DÍAZ CRUZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JAVIER CASTRO ROSAS



QUÍMICA EN ALIMENTOS

Pachuca de Soto, Hidalgo

Mayo de 2008



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 autor y el asesor de esta tesis agradecen a la Empresa Distribuidora Internacional de Pulque S.A de C. V., del Estado de Hidalgo, por todo el apoyo prestado para la realización de este trabajo de investigación.

Índice

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Maguey	3
2.1.1 Descripción taxonómica del maguey	3
2.1.1.1 Maguey pulquero	5
2.1.1.2 Producción de maguey	5
2.2 Aguamiel	6
2.2.1 Fuentes de contaminación del aguamiel	6
2.3 Pulque	7
2.3.1 Elaboración del pulque	8
2.3.2 Brotes por consumo de bebidas alcohólicas fermentadas	11
2.4 Patógenos	11
2.4.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	13
2.4.1.1 Generalidades de <i>Listeria monocytogenes</i>	14
2.4.1.2 Presencia en alimentos	15
2.4.1.3 Aspectos generales de la enfermedad	15
2.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.4.2.1 Generalidades de <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.4.2.2 Aspectos generales de la enfermedad	19
2.4.2.3 Presencia en alimentos	19
2.4.3 <i>Salmonella</i>	21
2.4.3.1 Generalidades de <i>Salmonella</i>	22
2.4.3.2 Aspectos generales de la enfermedad	23
2.4.3.3 Presencia en alimentos	25
2.4.4 <i>Escherichia coli</i>	26
2.4.4.1 Generalidades de <i>Escherichia coli</i> EHEC	27
2.4.4.2 Aspectos generales de la enfermedad	28
2.4.4.3 Presencia en alimentos	29
III. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo general	31
3.2 Objetivos específicos	31

IV. MATERIALES	32
4.1 Equipo	32
4.2 Reactivos	32
4.3 Medios de cultivo	33
V. MÉTODOS	34
5.1 Recolección de muestras	34
5.2 Comportamiento de <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7, y <i>Staphylococcus aureus</i> en aguamiel y pulque	35
5.2.1 Cepas	35
5.2.2 Preparación de la muestra	36
5.2.3 Preparación de los inóculos	36
5.2.4 Monitoreo del desarrollo de los patógenos	38
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1 Comportamiento de los microorganismos patógenos inoculados en AMSM, AMM y PS a 15° y 22°C	42
6.2 Comportamiento de <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> , <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. aureus</i> durante ciclos de fermentación de pulque semilla	52
VII. CONCLUSIONES	63
VIII. BIBLIOGRAFÍA	64
Índice	i
Índice de figuras	iii
Índice de gráficas	iii

Índice de figuras		Pág.
Figura 1.	Clasificación taxonómica de los agaves	4
Figura 2.	Elaboración de Pulque	9
Figura 3.	Comportamiento de <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> a partir de aguamiel y pulque inoculados	37
Figura 4.	Cuantificación de <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> O157:H7 en aguamiel y pulque	39

Índice de gráficas		
Gráfica 1.	Comportamiento de <i>Salmonella</i> Typhimurium a 22°C en aguamiel de un solo maguey (AMSM), aguamiel mezcla de varios aguamieles (AMM) y pulque semilla (PS) (aguamiel-semilla)	43
Gráfica 2.	Comportamiento de <i>E. coli</i> O157:H7 a 22°C en aguamiel de un solo maguey (AMSM), mezcla de varios aguamieles (AMM) y pulque semilla (PS) (aguamiel-semilla)	43
Gráfica 3.	Comportamiento de <i>S. aureus</i> a 22°C en aguamiel de un solo maguey (AMSM), mezcla de varios aguamieles (AMM) y "pulque semilla" (PS) (aguamiel-semilla)	44
Gráfica 4.	Comportamiento de <i>L.monocytogenes</i> a 22°C en aguamiel de un solo maguey (AMSM), mezcla de varios aguamieles (AMM) y "pulque semilla" (PS) (aguamiel-semilla)	44
Gráfica 5.	Comportamiento de <i>Salmonella</i> Typhimurium a 15°C en aguamiel de un solo maguey (AMSM), mezcla de varios aguamieles (AMM) y pulque semilla (PS) (aguamiel-semilla)	45
Gráfica 6.	Comportamiento de <i>E. coli</i> O157:H7 a 15°C en aguamiel de un solo maguey (AMSM), mezcla de varios aguamieles (AMM) y pulque semilla (PS) (aguamiel-semilla)	45
Gráfica 7.	Comportamiento de <i>S. aureus</i> a 15°C en aguamiel de un solo maguey (AMSM), mezcla de varios aguamieles (AMM) y mezcla de aguamieles más "pulque semilla" (PS) (aguamiel-semilla)	47

Gráfica 8.	Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> a 15°C en aguamiel de un solo maguey (AMM), mezcla de varios aguamieles (AMM) y "pulque semilla" (PS) (aguamiel-semilla)	47
Gráfica 9.	Valores de pH a 22°C en muestras de aguamiel de un solo maguey (AMSM), aguamiel mezcla de varios aguamieles (AMM) y pulque semilla (PS) (aguamiel-semilla)	51
Gráfica 10.	Valores de pH a 15°C en muestras de aguamiel de un solo maguey (AMSM), aguamiel mezcla de varios aguamieles (AMM) y pulque semilla (PS) (aguamiel-semilla)	51
Gráfica 11.	Comportamiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en aguamiel (AMM) A y en posterior mezcla de ese aguamiel A con "pulque semilla" (PS) a dos temperaturas (15° ó 22°C) de almacenamiento de las muestras	56
Gráfica 12.	Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> en aguamiel (AMM) y en posterior mezcla de ese aguamiel (AMM) con "pulque semilla" (PS) a dos temperaturas (15° ó 22°C) de almacenamiento de las muestras	56
Gráfica 13.	Comportamiento de <i>S. Typhimurim</i> en aguamiel (AMM)(A) y en posterior mezcla de ese aguamiel A con "pulque semilla" (PS) a dos temperaturas (15° ó 22°C) de almacenamiento de las muestras	57
Gráfica 14.	Comportamiento de <i>S. aureus</i> en aguamiel (AMM) y en posterior mezcla de ese aguamiel (AMM) con "semilla" (PS) a dos temperaturas (15° ó 22°C) de almacenamiento de las muestras	57
Gráfica 15.	Valores de pH en aguamiel (AMM) y en posterior mezcla de ese aguamiel con "pulque semilla" (PS) a dos temperaturas (15° ó 22°C) de almacenamiento de las muestras	59
Gráfica 16.	Comportamiento de <i>E. coli</i> O157:H7 durante 4 ciclos de fermentación de pulque realizados con "semilla" contaminada	59

I. INTRODUCCIÓN

Las pérdidas humanas causadas por las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son considerablemente elevadas en todo el mundo. Se estima que sólo en E.U.A alrededor de 9000 personas al año, entre niños y adultos mayores, mueren como resultado de infecciones e intoxicaciones producidas por la ingestión de alimentos y/o agua contaminada (Cary y col., 2000).

Las ETAs se encuentran asociadas a tres agentes causantes de distinta naturaleza: física, química o microbiana. Siendo estos últimos, y de acuerdo a los especialistas, los que representan la mayor amenaza a la salud cuando se consumen alimentos (Fernández, 2000).

Por otro lado, la composición de un alimento, pH ácido (mayoría de las frutas y los alimentos fermentados), bajo contenido de humedad (nueces, cacahuates), y la presencia de barreras físicas naturales (cascarón del huevo, cáscara de frutas) limitan en algunos casos las posibilidades de contaminación y el desarrollo de microorganismos patógenos (Fernández, 2000). Sin embargo, durante la preparación y comercialización de alimentos pueden operar varias fuentes de contaminación debido a los manipuladores, utensilios, superficies de trabajo e inclusive los mismos ingredientes.

El estudio de la incidencia de microorganismos patógenos en alimentos permite obtener información acerca de estos y sus efectos en la salud. También es importante tener conocimiento sobre el comportamiento de los microorganismos patógenos en los alimentos. Toda esta información es base para la generación de

medidas que resulten cada vez mejores para el control y/o prevención de enfermedades transmitidas por los alimentos.

En México existe una gran variedad de alimentos y bebidas que son producidos y consumidos en los diferentes estados de la república mexicana. Estos alimentos por lo general solo son producidos en una sola región o estado por lo que son considerados como “típicos” (enchiladas potosinas, por ejemplo). Algunos otros alimentos son producidos en varios estados y se han vuelto representativos de toda una región. Sin embargo, independientemente del origen o características de este tipo de alimentos; no existe prácticamente información relacionada con su inocuidad, así por ejemplo, no se conoce cual es la frecuencia de microorganismos patógenos en, tales alimentos, ni qué tipo de microorganismos se pueden encontrar asociados a estos, ni su comportamiento, ni hay registros de brotes asociados a su consumo.

Una de las bebidas típicas de la región central del país es el pulque. La mayor producción de esta bebida es mediante procedimientos artesanales; de los cuales existen una gran diversidad de estos para obtener la bebida fermentada a partir del sustrato (aguamiel), algunas empresas sin embargo, se encuentran ya industrializándolo, tal es el caso de la empresa Distribuidora Internacional de Pulque S.A. de C.V. No obstante, a pesar de la historia del pulque en México y del potencial económico que representó para los estados del centro del país a mediados del siglo pasado, poco se sabe sobre su inocuidad microbiana. Debido a ello en este trabajo se determinó el comportamiento de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* en aguamiel y pulque.

II. ANTECEDENTES

2.1 Maguey

El maguey es una planta en forma de roseta, compuesta por un tallo grueso y corto, sobre el que se insertan en espiral las hojas. Las hojas jóvenes son rectas y ligeramente separadas del eje central, cuando son adultas están separadas del eje, son gruesas, carnosas y se curvan con dirección al suelo con una púa terminal y espinas ganchudas en los bordes. Florece solo una vez y muere después de fructificar (Aguirre y col, 2001; Martínez, 1979).

2.1.1 Descripción taxonómica del maguey

Los magueyes o agaves pertenecen a la familia *Agavaceae*; Subfamilia *Agavoideae*, *Agaveae*; Género *Agave*; Subgénero *Agave* (Figura 1); Esta representa un grupo de plantas suculentas típicas de las zonas semiáridas de México, son de gran importancia biológica y económica para el país (Granados, 1999). Se distribuyen desde los 34° de latitud norte hasta los 60° de latitud sur del continente americano o en las islas que lo rodean, es decir, desde el sur de EUA, todo México y Centroamérica, teniendo como centro de difusión la altiplanicie mexicana (Ramírez, 1963) en donde se concentra el 76% de la familia de las agavaceas (García y Galvan, 1995), siendo el género más diverso el *Agave*.

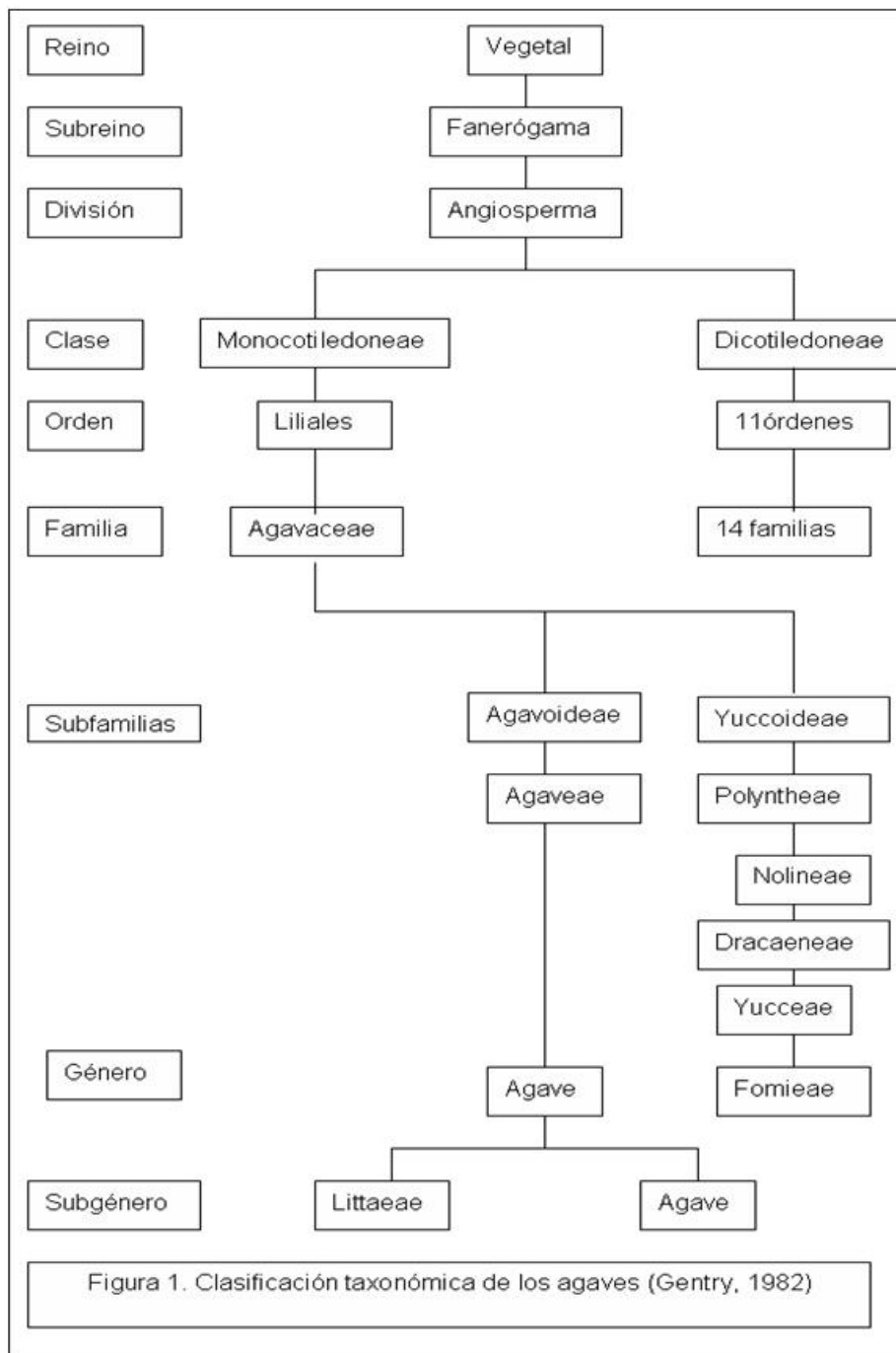


Figura 1. Clasificación taxonómica de los agaves (Gentry, 1982)

2.1.1.1 Maguey pulquero

El maguey de pulque o maguey manso (*Agave atrovirens kawr*) es la especie de maguey más robusta y de mayor producción de aguamiel, sus hojas (pencas) miden aproximadamente 2.5 m. De esta especie se obtiene el pulque, para ello antes de que se desarrolle el tallo floral se elimina éste y se hace en su sitio una concavidad donde se almacena la savia, la cual por fermentación produce el pulque (Martínez, 1979). Este tipo de maguey llega a dar hasta cuatro litros por alzada o recolección que regularmente se hace dos veces por día durante cuatro meses aproximadamente, seguido a esto el agave muere (Ruvalcaba, 1983). Especies como *A. salmiana*, y *A. mapisaga* se usan con igual fin, pero el producto es de diferente calidad (Martínez, 1979; Rzedowski y Calderón, 1990).

2.1.1.2 Producción de maguey

Por su importancia económica el género de los agaves se divide en tres grupos: los textileros, los pulqueros y los mezcaleros (Ruvalcaba, 1983). Las especies de las cuales se obtiene el pulque de forma común son *A. salmiana*, *A. mapisaga* y *A. atrovirens* que se distribuyen principalmente en el Valle de México y en los estados de México, Tlaxcala, Hidalgo y Puebla (Rzedowski y Calderón, 1990).

A nivel nacional, la superficie sembrada de maguey pulquero para el año 2006 fue de 8,067.05 Ha de las cuales 5, 611. 00 Ha se encontraban en el estado de Hidalgo (SAGARPA SIAP, 2007), ubicando a nuestro estado en el primer sitio en superficie sembrada con este tipo de plantas, sin embargo, en términos

productivos, solo se cosechó cerca del 36% de la superficie nacional sembrada, dado el tipo de cultivo, el cual es perenne.

2.2 Aguamiel

El aguamiel de los magueyes es el ingrediente a partir del cual se elabora el pulque (Ruvalcaba, 1983). Es un líquido cristalino, con un alto contenido de azúcares que le dan un sabor dulce, posee una densidad ligeramente superior a la del agua. Cuando recién es extraído es ligeramente alcalino con un pH de 7.45 (Nieto y Maecke, 1948).

En el año 2006 la producción reportada de aguamiel fue de 277, 792.10 m³ a nivel nacional, de los cuales, 230, 381. 20 m³ se recolectaron en Hidalgo, cuyo valor de producción fue de 774' 646, 320. 00 pesos para el país, y de 575' 870, 970. 00 para el estado Hidalgo (SAGARPA SIAP, 2007). Esto destaca la importancia que tiene este producto en el estado y en el país.

Por otro lado, el contenido de fructooligosacaridos e inulina en el aguamiel hacen posible acondicionar este como medio para el crecimiento de bifidobacterias, obteniéndose así un producto con características funcionales (Moreno, 2004).

2.2.1 Fuentes de contaminación del aguamiel

Al igual que muchas frutas y verduras, el aguamiel se encuentra expuesto al ambiente y por lo tanto a contaminación por microorganismos patógenos durante diferentes etapas, entre estas podemos mencionar algunas:

- a) Antes de la recolección de los productos en el campo, son de interés la tierra, el agua de riego, la presencia de materia fecal humana o animal, el tipo de abono utilizado, el aire y las personas que cuidan de las tierras de cultivo (Fernández, 2000).
- b) Durante la recolección destacan las condiciones de sanidad y/o grado de desinfección de los utensilios para la extracción y colección del aguamiel del centro horadado del agave, así como la higiene del tlachiquero (recolector del aguamiel) que es el factor humano que puede causar la mayor contaminación directa, incrementándose el riesgo si el mismo tlachiquero se encuentra como portador sintomático o asintomático de ciertos gérmenes patógenos, debido a que las parasitosis intestinales tienen una elevada prevalencia en nuestro país, especialmente en el medio rural.
- c) En la poscosecha destaca la maquinaria y equipo, los recipientes, animales domésticos y silvestres, los trabajadores, el polvo de la atmósfera y los vehículos, que también colocan al producto en una posición de riesgo (Beuchat, 1996).

2.3 Pulque

El pulque es una bebida alcohólica característica de México; es blanco y viscoso con un ligero olor herbáceo. Se obtiene por la fermentación de la savia azucarada o aguamiel que produce el maguey pulquero donde se obtiene al eliminar el quiote o brote floral y al hacer una cavidad en donde se acumula el aguamiel en cantidades que pueden llegar a cinco litros diarios durante tres meses (Ruvalcaba, 1983).

Esta bebida ha contribuido de forma importante en la adquisición de nutrientes en la dieta de las personas que habitan en sectores rurales de México, por ejemplo, el pulque contribuye con el 10% de tiamina, 24% de riboflavina, 23% de niacina, 48% de vitamina C y 26% de hierro en la dieta del otomí (Ortiz de Montellano, 1990). Por otra parte, investigadores han destacado el impacto negativo en términos de peso que tiene sobre el recién nacido el consumo de pulque por parte de mujeres embarazadas (alrededor del 72.9% de ellas consumen pulque, de las cuales, 28.6% consumen más de 150 g de etanol por semana) (Backstrand y col., 2001).

2.3.1 Elaboración del pulque

La elaboración del pulque a pequeña escala y de manera artesanal forma parte de la cultura de muchas zonas rurales de la meseta central de México, sin embargo, su producción varía de unos pocos litros hasta miles de litros en un mismo sitio.

De forma ilustrativa se presenta el proceso de elaboración del pulque (Figura 2), el cual involucra desde la recolección del aguamiel pasando por el transporte, hasta la distribución y venta del mismo; la producción se lleva a cabo en diferentes etapas:

a) El raspado del maguey tiene por objeto evitar que el tejido de la concavidad del maguey donde se acumula el aguamiel cauterice y así se continúe emanando de este el aguamiel. El raspado lo efectúa el tlachiquero o recolector de aguamiel con un “raspador” (tipo de navaja filosa y curva en forma de concha que se adapta al tipo de corte en una superficie cóncava) (Ruvalcaba, 1983).

Proceso de elaboración del pulque

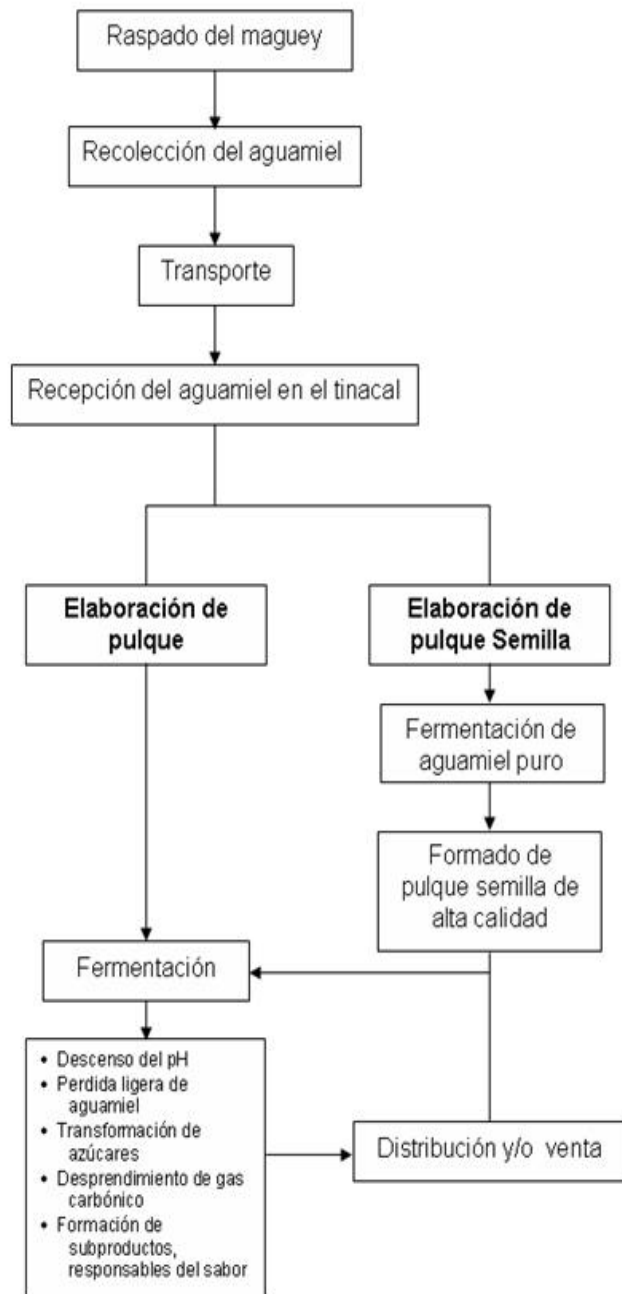


Figura 2. Elaboración de Pulque

La recolección del aguamiel, es el procedimiento de extracción del aguamiel de los diferentes magueyes. Ésta se efectúa con una pipeta hecha con el fruto de una cucurbitácea (*Lagenaria siceraria*) conocida como “acocote”. Es un guaje oblongo con una cavidad variable que llega a ser de hasta 8 litros.

b) El aguamiel recolectado es depositado en “castañas” o recipientes de madera y transportado por medio de animales de granja o dependiendo de la zona en vehículos motorizados. Dado que las “magueyerías” (campo donde están los magueyes) no siempre están cerca del tinacal o lugar donde se procesa el producto y el tiempo empleado en recolectar la tanda de magueyes (número de magueyes que cada tlachiquero explota; generalmente son de 60 a 80 magueyes) es usual que el recolector emplee hasta una hora en transportarse hasta el lugar de procesamiento (Ruvalcaba, 1983).

c) La recepción del aguamiel en el tinacal o lugar de procesado del pulque se efectúa a diferentes horas; durante la mañana y por la tarde. El aguamiel que ha sido recolectado por el tlachiquero es depositado en tinas de madera de diferentes volúmenes según la capacidad del tinacal y el punto de fermentación del pulque en la tina.

d) La elaboración de pulque se realiza en lugares específicos denominados tinacales. Cada uno de estos tiene una forma particular de elaborar pulque; los hay desde aquellos que procesan sus propias aguamieles preparando ellos mismos la “semilla” (o líquido-base-madre de la fermentación) hasta aquellos que compran las aguamieles, procesan su semilla y expenden la mayor parte de su producto como pulque sintético (tipo de pulque que es elaborado a partir de la fermentación de azúcar comercial disuelta en agua; el aguamiel se utiliza

únicamente para darle cuerpo, aroma y sabor de pulque verdadero). Entre estos dos tipos extremos hay una gama numerosa de explotaciones con características intermedias y combinadas (Ruvalcaba, 1983).

e) Durante la fermentación el descenso del pH 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).

2.3.2 Brotes por consumo de bebidas alcohólicas fermentadas

El proceso fermentativo donde la caída del pH es consecuente, no es un obstáculo para ciertos microorganismos que toleran variaciones de pH puedan sobrevivir, tal es el caso de brotes de enfermedades por *S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7 en sidra (CDC, 1975; Besser y col., 1993). Lo inusitado de este último brote (con 23 personas afectadas) radica en que la sidra se obtiene por fermentación maloláctica del jugo de manzana que da lugar a una caída en el pH cercana a 4.0. Investigaciones sobre acido-tolerancia y adaptación ácida en patógenos como *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium* han demostrado la capacidad que tienen estos para sobrevivir y adaptarse a alimentos de bajo pH como sidra y jugos de frutas (Cheng y col, 2001; Miller y Kaspar, 1994; Zhao y col., 1993).

2.4 Patógenos

Los alimentos pueden ser vehículos de transmisión de diferentes microorganismos y metabolitos microbianos, algunos de ellos patógenos para el hombre. A escala mundial, y específicamente en nuestro país, las enfermedades diarreicas ocupan

un lugar preponderante como causante de mortalidad infantil (Fernández, 2000). Las cifras más elevadas se presentan en menores de un año, entre estos, el papel de la ingesta de alimentos de baja calidad sanitaria como determinantes del problema de mortalidad no debe de ser muy significativo.

La lista de patógenos se ha incrementado notablemente. En algunos casos se trata de microorganismos recientemente descubiertos, en otros, son microorganismos que perdieron vigencia de acuerdo con los reportes epidemiológicos, pero que han resurgido y se reportan cada vez con mayor frecuencia (Fernández, 2000).

De acuerdo a su procedencia es posible agrupar estos microorganismos en: a) de origen endógeno, ya presentes en los alimentos antes de su obtención y b) de origen exógeno, que llegan a los alimentos durante su obtención, transporte, industrialización, conservación, etc. (Mossel, 1982).

Las bacterias patógenas del intestino muestran diferentes mecanismos de patogenicidad: invasivo, citotóxico, toxigenico, adhesivo. Entre los patógenos que han tenido una mayor incidencia en alimentos y en la salud se encuentran: *A. hydrophila*, *B. cereus*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Brucella*, *C. burnetii*, *E. coli*, *S. thyphi*, *Salmonella*, *Shigella*, *C. jejuni*, *V. cholerae*, *V. parahemolyticus*, *Y. enterocolítica* entre otros. Algunos de estos se describen a continuación.

2.4.1 *Listeria monocytogenes*

Este bacilo fue descubierto hace más de un siglo, pero no fue hasta la década de los 80`s que fue implicado como agente etiológico en las ETAs. De acuerdo con los criterios de identidad vigente puede reconocerse como patógeno humano, como agente etiológico de zoonosis, y como bacteria de vida libre (Fernández, 2000).

Las listerias están difundidas en la naturaleza, pudiéndose encontrar en la materia vegetal muerta en descomposición, en los suelos, en las heces de los animales, en la aguas residuales, en el ensilado y en el agua (Jay, 2002).

En la actualidad se admiten 8 especies de *Listeria* (Seeliger y Jones, 1986). Sin embargo, diversos estudios han propiciado un reconocimiento de mayor especificidad. Por ejemplo, Jay (2002) menciona que las 5 verdaderas especies de *Listeria* son: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovi*, porque tienen un porcentaje de variación en estudios de DNA que va desde 36 al 38%, mientras que en las correspondientes a *L. gray* y *L. murrayi* varia del 41 al 42.5%, además de que son distintas en el aspecto serológico.

L. monocytogenes, esta representada por 13 serovariedades, algunas de las cuales son compartidas por *L. innocua* y por *L. seeligeri*. La severidad del padecimiento y el dramatismo de los brotes de listeriosis hacia ciertos grupos de población que muestran especial susceptibilidad como mujeres embarazadas, fetos, lactantes, ancianos, inmunodeprimidos por cualquier causa y quienes son tratados de padecimientos crónicos han desencadenado una serie de medidas

muy rigurosas para la prevención de la enfermedad. Por tales motivos, en EUA (al menos en un principio), se observaron enfoques y estrategias preventivas no del todo conscientes entre las dos instituciones con mayor ingerencia en el control sanitario de los alimentos, la FDA y la USDA (Klima y Monteville, 1995). Actualmente EUA mantiene una posición rígida de cero tolerancia a la presencia de *L. monocytogenes*, con decomiso de productos que no satisfagan la norma (Fernandez, 2000). No obstante otros países rechazan esta posición para alimentos que no han sido riesgo importante a la salud pública o cuando el germen se inactiva por pasteurización debidamente controlada y otros factores que no representan riesgos mayores y cuyas reducciones aminoran costos, como lo han hecho en Australia, sin embargo en estos países se han presentado una serie de brotes y casos aislados que hacen cuestionar algunas de sus medidas.

2.4.1.1 Generalidades de *Listeria monocytogenes*

Las listerias son bacilos cortos gram positivos, aero-anaerobios, asporógenos de 1.2 x 0.5 μm , a veces calificado de cocoide y corineforme por mostrar diploformas dispuestas en V, no acidorresistentes dotados de movilidad con capacidad de crecer de 0° hasta 44°C como señala la IAMES (1991). Antiguamente fueron clasificados como <<listerella>> (Jay, 2002; Fernandez, 2000; Frazier y Westhuff, 2000). *Listeria monocytogenes* se desarrolla mejor en presencia de una tensión reducida de oxígeno. Su pH óptimo de crecimiento esta proximo a la neutralidad (7.2-7.6). El pH límite esta alrededor de 5.6, sin embargo, puede adaptarse a pHs ácidos en algunos casos y su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37°C (Burgeois y col., 1994).

Las necesidades nutritivas de las listerias son las típicas de otras muchas especies de bacterias gram positivas. Crecen bien en muchos medios ordinarios tales como el caldo con infusión de cerebro y corazón, el caldo con soya y tripticasa y el caldo con triptosa (Jay, 2002).

2.4.1.2 Presencia en alimentos

Los principales alimentos responsables de la transmisión de la listeriosis han sido la leche cruda y la carne; sin embargo se han presentado casos de importancia relacionados con otros tipos de alimentos. En 1981, en Canadá se dio un brote con 41 muertos por el consumo de repollo o berzas crudas (Silliken, 1986; Schelch y col., 1983), así como una gran cantidad de brotes asociados al patógeno en diferentes verduras como patatas, rábanos, pepinos, col, champiñones, lechugas y muchas ensaladas frescas de hortalizas (Fernández, 2000).

2.4.1.3 Aspectos generales de la enfermedad

Cuando *L. monocytogenes* se adquiere por vía oral, parece ser que coloniza el tracto intestinal mediante mecanismos poco conocidos. Desde el tracto intestinal, el microorganismo invade los tejidos incluida la placenta de las mujeres gestantes, y pasa a la corriente sanguínea desde la que alcanza otras células sensibles del organismo. Como patógeno intracelular, primero debe penetrar en las células sensibles y después ser capaz de replicarse en el interior de estas (Jay, 2002). En este contexto la característica más sobresaliente del germen es su capacidad para sobrevivir y multiplicarse en los macrófagos (Mackanes, 1962). *L. monocytogenes* puede ser transportada intracelularmente por fagocitos y diseminada al bazo e

hígado. Sólo una fracción de las bacterias que llegan a esta localidad evaden la destrucción por macrófagos (Kauffmann, 1993), cuando tal ocurre, las listerias sobrevivientes provocan una infección sistémica e invasión de tejidos como la placenta, sistema nervioso central y el propio feto. La infección se traduce, según el caso, en aborto o meningoencefalitis (Fernández, 2000).

2.4.2 *Staphylococcus aureus*

Este microorganismo fue uno de los primeros patógenos de interés humano que fue descubierto y descrito ya en 1882 por Rosenbach. Su potencial patógeno para el hombre y para animales se manifiesta en diferentes formas (Fernández, 2000).

Dentro de su ciclo natural existe como parasito intrascendente en diversas localidades del cuerpo humano o puede dar lugar a procesos patológicos que van desde infecciones muy localizadas del tipo de un forúnculo autolimitado o sinusitis, otitis, y muchos otros, hasta septicemia y endocarditis con letalidad del 40-80% de los casos (Joklik y col., 1988) y síndrome de shock tóxico.

De manera general, se recupera escasamente del contenido intestinal, en esta localidad puede causar enterocolitis, apendicitis y tras la perforación de la pared, peritonitis. Un número de casos termina letalmente (Fernández, 2000). *S. aureus* se encuentra tanto en el hombre como en los animales. Hay que distinguir entre portadores sanos, ocasionales, intermitentes y permanentes. Las fosas nasales constituyen el reservorio principal del germen. En el hombre la localización nasal afecta del 20-50% de los individuos. El microorganismo se disemina de la nariz

hacia la piel, las manos y en la cara en particular, y también hacia el ambiente, aire, suelo, agua, ropa, etc. (Minor y Marth, 1976).

El manual de Bergey lo considera dentro de la familia *Micrococcaceae*, al lado de los géneros *Micrococcus*, *Panococcus* (Holt y col., 1994). Algunos microbiólogos piensan que el género *Staphylococcus* debería separarse de estos otros y formar la familia *Staphylococcaceae* (ICMSF, 1996).

Este patógeno provoca una de las intoxicaciones alimentarias que se presentan con mayor frecuencia, originada por la ingestión de la enterotoxina que se forma en los alimentos cuando en los mismos se multiplican ciertas cepas de *S. aureus*. La toxina recibe la denominación de enterotoxina por que produce gastroenteritis o inflamación de la mucosa que reviste el tracto gastrointestinal.

2.4.2.1 Generalidades de *Staphylococcus aureus*

Las células de *S. aureus* son esféricas, gram positivas, aero-anaerobio facultativas, no esporuladas, inmóviles, de 0.8 a 1.2 μm de diámetro. Produce catalasa y otras enzimas, algunas relacionadas con la patogenicidad (Fernandez, 2000; Burgeois, 1994). Tienen utilidad para su identificación en el laboratorio o sugieren un potencial enterotoxigénico.

La especie de *S. aureus* es homogénea desde el punto de vista taxonómico pero puede separarse en biotipos en función de la especificidad del hospedero (Devriese, 1984).

El *Staphylococcus* típico se presenta en acúmulos parecidos a los ramos de uvas, en parejas o en forma de cadenas cortas. La mayoría de los cultivos que producen enterotoxina son coagulasa-positivos (coagulan el plasma sanguíneo), producen termonucleasa estable, son facultativos en cuanto a su exigencia de oxígeno en un medio glucosado complejo, aunque en aerobiosis crecen mejor que en anaerobiosis (Frazier y Westhuff, 2000). Además necesita aminoácidos y vitaminas. Es mesófilo. La presencia de una flora competitiva importante inhibe su crecimiento (Burgeois, 1994). La temperatura óptima para su desarrollo es de 37°C y puede desarrollarse de 7-40°C, a una aw de 0.83 presenta desarrollo, pero sólo hasta una aw de 0.92 es cuando se produce la enterotoxina. Tienen un pH óptimo de 7 y puede desarrollarse en niveles de pH que van desde 4.3 hasta 9.0. Por otra parte, es un microorganismo termosensible; poblaciones de 10^6 células/mL se inactivan totalmente en 4-24 minutos a 54-60°C. Sin embargo, algunos componentes o constituyentes del medio (lípidos, proteínas, azúcares, sales) pueden protegerle del calor (Minor y Marth, 1976). Es sensible a la acidez del medio. Tolerancia concentraciones elevadas de NaCl y aw baja.

Algunos cocos productores de toxina son muy halotolerantes y toleran también a los nitritos. También toleran los azúcares disueltos de un 50 a un 60% de sacarosa. Son fermentativos y proteolíticos, aunque en la mayoría de los alimentos no suelen producir olores repugnantes ni los convierte en alimentos de aspecto desagradable. *S. aureus* produce seis enterotoxinas (A, B, C₁, C₂, D y E), serológicamente diferenciadas.

2.4.2.2 Aspectos generales de la enfermedad

La intoxicación alimentaria por *S. aureus* está catalogada como un padecimiento de severidad moderada y de diseminación limitada (ICMSF, 1986). Se sabe de ella prácticamente todo lo necesario para evitarla (Fernandez, 2000).

Una toxiinfección alimentaria por *Staphylococcus* es un síndrome gastrointestinal que aparece a las 1-8 horas (2-4 de media) después de haber ingerido un alimento con enterotoxinas estafilocócicas, los síntomas aparecen bruscamente; náuseas, dolores de cabeza, dolores abdominales y sobretodo vómitos violentos, incoercibles y repetidos, a menudo acompañados de diarrea. Generalmente no hay fiebre, a veces una ligera hipertermia (hasta 38 °C) o lo contrario hipotermia. Pudiendo sobrevenir algunas complicaciones en función de la dosis de toxina ingerida y la sensibilidad individual como: deshidratación, calambres musculares, postración, hipertensión, shock, colapso. Normalmente los enfermos se restablecen en 24 horas, aunque pueden padecer una gran fatiga durante unos días. Se trata en definitiva de una enfermedad corta, pero dolorosa y espectacular, puede alcanzar cotas dramáticas cuando afecta a una colectividad (Burgeois, 1994).

2.4.2.3 Presencia en alimentos

El *S. aureus* posee una notable capacidad para proliferar en diversos alimentos. Bajo condiciones propicias la tasa de crecimiento conduce a la concentración de brotes de gastroenteritis severos (Fernández, 2000). Algunos productos cárnicos y lácteos y ciertos vegetales y alimentos cocinados funcionan como medios

excelentes para sostener la multiplicación. Un ejemplo es el yogurt, que no suele identificarse como vehículo en brotes de ETAs, sin embargo, si la fermentación no se instala oportunamente, algunos patógenos pueden multiplicarse. En Francia fue reportado un brote por enterotoxina estafilococcica; el *S. aureus* desarrolló debido a la elevada concentración de azúcar incorporada; el incremento de la osmolaridad retrasó el crecimiento de las bacterias acidolácticas (ICMSF, 1998).

En general es posible esperar que los estafilococos vivan al menos en un número escaso, en cualquiera o en todos los productos alimenticios que son de origen animal o en aquellos que son manipulados directamente por personas a no ser que se apliquen fases del tratamiento térmico para llevar a cabo su destrucción (Jay, 2002).

La interpretación del hallazgo de *S. aureus* en los alimentos no sigue los criterios que se aplican en el caso de los patógenos intestinales del tipo de la *Salmonella* y la *Shigella*. Se trata de una bacteria enterotoxigénica; es decir, que la toxina que provoca la enfermedad se genera y libera en el alimento como consecuencia del desarrollo del microorganismo. El hallazgo de la bacteria no implica, por tanto, el mismo tipo de riesgo que el asociado con la presencia de bacterias infecciosas de reconocida capacidad patógena (Fernández, 2000). Sin embargo, debido al carácter parasitario de esta bacteria por una parte, y a su susceptibilidad a los tratamientos térmicos de cocción o pasteurización que se aplican a los alimentos, constituye un indicador muy sugestivo de contaminación humana (Fernández, 2000).

2.4.3 *Salmonella*

El género *Salmonella* fue creado definitivamente tras una serie de observaciones por varios bacteriólogos en 1900 por Lignieris y se le denominó así en honor de D.E Salmon, el patólogo veterinario americano que describió por primera vez *Salmonella cholerae-suis* (Adams y Moss, 1997).

El primer brote de salmonelosis se describió en Alemania en 1888, luego de que 50 personas habían consumido carne cruda molida proveniente de una vaca moribunda (Tauxe, 1991). El padecimiento se mantiene endémico en todos los países, incluidos los más industrializados, en donde de vez en cuando se presentan brotes masivos.

Hasta 1994 se reconocían 2,375 serovares distribuidos en especies y subespecies (Fernández, 2000), de estos alrededor de 80 son los que se encuentran involucrados en la mayoría de los brotes por alimentos (Black y col., 1982).

En la actualidad las salmonellas son universalmente consideradas como una de las causas más importantes de enfermedad transmitida por alimentos. En Europa en el año 1989, la incidencia anual de salmonelosis fue de alrededor de 50 casos por cada 100, 000 habitantes (Adams y Moss, 1997).

Se admite de forma general que solo del 1 al 10% de las toxiinfecciones alimentarias son conocidas por los servicios oficiales (Mossel, 1982). Las toxiinfecciones alimentarias por salmonellas representan una pesada carga para la población (Bryan, 1978; Archer y Kvenberg, 1985; Beckers, 1986).

Las *salmonellas* son huéspedes habituales del tracto gastrointestinal, son transportados por una gran variedad de animales de abasto, animales salvajes, roedores, animales de compañía, aves, reptiles e insectos. Pueden ser diseminados por medio de las heces al suelo, al agua, a los alimentos y piensos y desde estos medios a otros animales (incluidas las personas).

La *Salmonella* no requiere componentes especiales en los alimentos para desarrollar. Muestra notable potencial para hacerlo incluso en productos que no suelen reconocerse con alto contenido nutricional para el hombre (Fernandez, 2000).

2.4.3.1 Generalidades de *Salmonella*

Las *salmonellas* pertenecen a la familia *enterobacteriaceae*. Son bacilos (típicamente de 0.5 μm por 1-3 μm) gram-negativos, asporógenos que son facultativamente anaerobios, catalasa-positivos, oxidasa-negativos y generalmente son móviles con flagelos peritricos (Adams y Moss, 1997). Producen ácido y a menudo gas durante la fermentación de la D-glucosa o de otros hidratos de carbono (Burgeois, 1994). En algunos estudios ha sido reportado su crecimiento desde temperaturas por debajo de 5° C hasta 47 ° C con un crecimiento óptimo a 37°C. La tasa de su desarrollo empieza a declinar notoriamente al disminuir la temperatura por debajo de los 20° C y se torna muy lenta en refrigeración. Las salmonellas son termosensibles y son destruidas fácilmente por las temperaturas de pasteurización. Los valores de pH para desarrollar son de 3.8 como mínimo, 7.0 óptimo y 9.0 máximo, según la IAMFES (1991) y 3.8, 7-7.5 y 9.5,

respectivamente, según la ICMSF, (1996). La a_w límite para el desarrollo de *Salmonella* es de 0.94 (ICMSF, 1996). La a_w mínima de crecimiento se halla en torno a 0.93 pero las células sobreviven perfectamente en los alimentos desecados aumentando el índice de sobrevivencia a medida que se reduce el a_w . Las colonias son al cabo de 18-24 horas, de 2 a 3 mm de diámetro, salvo para algunos serotipos que producen siempre colonias enanas (abortusovis, abortusequi, thysuis).

En lo que a sobrevivencia se refiere, *Salmonella* se mantiene viable en la superficie de frutas y verduras como lo demuestran diversos estudios. Madden (1992) observó que a temperatura ambiente *Salmonella* se mantiene viable en lechuga, 21-28 días. En 1990 y 1991 en EUA el consumo de melón chino se relacionó con brotes de salmonelosis, donde se registraron 245 casos pertenecientes a 30 entidades, aunque se estima que el número real rebasó los 25, 000, La bacteria responsable fue *S.Chester* (Ries y col., 1990).

2.4.3.2 Aspectos generales de la enfermedad

La información acumulada a través del estudio de brotes asociados al consumo de alimentos, muestra que pueden bastar muy pocas células, en algunos casos, para provocar la enfermedad.

La salmonelosis se define como una infección zoonótica, puesto que la fuente principal de la enfermedad humana la constituyen los animales infectados. La transmisión tiene lugar por la vía fecal-oral por medio de la cual el contenido

intestinal de un animal infectado es ingerido con un alimento o con el agua (Adams y Moss, 1997). Los síntomas de toda infección gastrointestinal por *Salmonella* son: náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea, que suele aparecer súbitamente. La diarrea a veces va precedida de cefalalgia y escalofríos. Otros síntomas de la enfermedad son heces líquidas, verdosas, y malolientes, abatimiento, debilidad muscular, lasitud, generalmente fiebre moderada, desasosiego, contracciones nerviosas, y somnolencia.

Tras superar las defensas primarias del tubo digestivo superior, la *Salmonella* ingerida alcanza la mucosa intestinal e inicia un proceso de colonización del ileum distal, mediante acción de fiambras, apéndices proteínicos y hemaglutinas no fimbriadas con glicoproteínas presentes en los enterocitos, el germen se adhiere. El germen fijado a la membrana puede penetrarla mediante pinocitosis siguiendo un mecanismo mediado por incremento en la concentración intracelular de calcio, que daña los lípidos de la membrana. Ya dentro de la célula intestinal el germen se multiplica en el interior de una vacuola; las bacterias generadas pasan a la lámina propia de la mucosa intestinal. A partir de entonces el ingreso a la circulación sanguínea con acceso a otros tejidos y ulterior multiplicación depende de la virulencia del microorganismo y capacidad para superar nuevos mecanismos de defensa del huésped, incluyendo la fagocitosis y la acción de anticuerpos (Fernández, 2000).

2.4.3.3 Presencia en alimentos

Los alimentos más a menudo implicados son las carnes y los productos cárnicos, algunos productos de charcutería, las aves y productos derivados, los ovoproductos y otros diversos a base de huevo, la leche y la leche en polvo, los productos vegetales pueden así mismo servir de vectores de las salmonellas.

Un producto fermentado de origen animal que ha sido implicado en brotes es el salami que afectó 85 personas. El periodo de incubación de las salmonellas fue desusualmente largo (de 3 a 7 días). Es evidente que la cepa interesada, *S. Typhimurium* fagotito Dt 124, sobrevivió al proceso de maduración de la carne por secado, que fue de sólo 6 días. Otro brote por salami, con 83 casos, se presentó en Italia en 1995 (Pontello y col., 1998). El serovar *S. Typhimurium* (mismo fagotito-ribotipo) se aisló de los pacientes y del alimento. Un deficiente proceso de maduración favoreció la sobrevivencia del patógeno; el periodo fue demasiado corto debido a una sobre demanda del producto (Fernández, 2000).

Productos de campo y productos vegetales, por ejemplo, las hortalizas que se utilizan para preparar ensaladas, han sido relacionadas con brotes accidentales de fiebre tifoidea y de salmonelosis. En estos casos, la utilización de agua de riego contaminada o de deyecciones humanas y de estiércol de los animales como abono pueden ser factores de importancia.

Los vegetales procedentes de tierras regadas con aguas negras, cercanas a animales de crianza o domésticos, o abonadas con desechos animales suelen

estar contaminadas con agentes patógenos intestinales incluida la *Salmonella*. La *Salmonella* sobrevive por algún tiempo en la tierra al contacto con lodos provenientes de agua de albañal; disminuye de 130 UFC /100 g a 35 unidades en una semana y a 0 a partir de la quinta semana (Fernández, 2000). En cambio *L. monocytogenes* con cifras iniciales similares se multiplica y su número no disminuye aún después de 8 semanas (Watkin y Sleath, 1981). De esta manera, hortalizas y otros productos agrícolas se contaminan con los microorganismos patógenos cuando se exponen a estos materiales.

2.4.4 *Escherichia coli*

Desde 1885, año en el que fue aislado por primera vez en heces de niños y descrito por el bacteriólogo alemán Theodor Escherich el estudio científico sobre *Escherichia coli* ha sido prodigado en tal medida que en la actualidad probablemente sea el organismo de vida libre que mejor se conoce.

E. coli es el germen facultativo aerobio más frecuente y abundante en el contenido intestinal de los animales superiores. La mayoría de las cepas no son patógenas, algunas sin embargo, causan infecciones en el hombre y pueden localizarse en el tracto intestinal o fuera de él.

Actualmente se reconocen 6 grupos de *E. coli* patógena que dan lugar a diversos padecimientos (enteropatógena, enterotoxigenica, enteroinvasiva enterohemorrágica, enteroadherente, enteroagrativa). Entre estos existen

diferencias clínicas y epidemiológicas, así como en la estructura antigénica y mecanismos de patogenicidad de los diferentes grupos.

E. coli enterohemorrágico (EHEC), también conocido como *E. coli* O157:H7, fue descrito por primera vez en Canadá, donde en algunas comarcas rivaliza con *Campylobacter* y con *Salmonella* como la causa más frecuente de diarrea. Algunos serotipos de este microorganismo son capaces de provocar diarrea, pero el serotipo O157:H7 es el que con mayor frecuencia se aísla en las personas. Ha llamado la atención no solo por que la transmisión de la enfermedad alimentaria es más común que en el caso de otras cepas de *E. coli* productoras de diarrea, sino también por que es capaz de causar enfermedades que amenazan la vida como son la colitis hemorrágica, el síndrome urémico hemolítico y la púrpura trombótica trombocitopénica (Fernández, 2000).

2.4.4.1 Generalidades de *Escherichia coli* EHEC

Este serovar de *E. coli* muestra un activo desarrollo entre 30 y 41°C, con tiempos de generación de 0.49 horas a 37°C y 0.64 horas a 42°C en caldo soya tripticasa (Doyle y Shoeni, 1984), sin embargo resulta muy escaso a 44-45°C (dependiente en parte del medio de cultivo) y nulo a 45.5°C en 48 horas. El pH mínimo de desarrollo se encuentra entre 4.0 y 4.5; el tipo de ácido usado para regular el pH influye en la respuesta. Miller y Kaspar (1994) observaron una tolerancia excepcional de cepas de *E. coli* O157:H7 a valores de pH extremos (2 y 12), comportamiento más notable a 4°C que a 25°C.

E. coli O157:H7 es similar a la *E. coli* típica; fermenta la lactosa, pero no el sorbitol dentro de 48 horas (Farmer y Davis, 1985). Tampoco produce glucuronidasa (Thompson y col., 1990), base para la reacción de MUG ampliamente utilizada para identificar *E. coli*. Una cualidad muy distintiva de este patógeno es su incapacidad para desarrollar a temperatura superior a 42°C (Doyle y Shoeni, 1984). En la actualidad se reconocen 62 fagotipos del microorganismo (Khakhria y col., 1990).

La tolerancia a valores bajos de pH, que aparentemente no afecta la virulencia del microorganismo es un dato de interés primario en el análisis de riesgos para controlar etapas críticas en el procesamiento de los alimentos, esta observación se apoya en el conocimiento de brotes de infección mediados por el consumo de alimentos fermentados como yogurt, salami y sidra (Fernández, 2000).

Cuando el alimento se mantiene a bajas temperaturas, la acidotolerancia es más notoria; por ejemplo, Zhao y col. (1993), reportaron que en sidra de manzana el germen sobrevivía menos de 3 días a 25°C, pero hasta 31 días, a 8°C. El mecanismo de tolerancia a la acidez parece asociarse con una proteína que se sintetiza por exposición del germen a un medio ácido (Fernández, 2000).

2.4.4.2 Aspectos generales de la enfermedad

La importancia de esta bacteria a la salud humana sobresale por su baja dosis infectante, su efecto en todos los grupos etarios de la población, la severidad del padecimiento que origina, la tolerancia a condiciones de acidez poco comunes

entre los patógenos, y su asociación con rumiantes que aportan alimentos de amplio consumo humano (Buchanan y Doyle, 1997).

La colonización se observa principalmente en el intestino grueso. *E. coli* enterohemorrágica se adhiere a las células epiteliales del intestino, lo que se acompaña de una pérdida de microvellosidades. El cuadro clínico más frecuente causado por esta bacteria es la diarrea sanguinolenta y los casos moderados consisten en diarrea, vómito y dolor abdominal. El 10% requiere hospitalización (Fernández, 2000). El USDA estima que actualmente ocurren 20, 000 casos de ETAs relacionados con *E. coli* O157:H7 en EUA (CDC, 1995b). Adicionalmente se estima que del 85-95% de los casos de síndrome urémico hemolítico son provocados por el serovar *E. coli* O157:H7 (Griffin, 1995); Para el resto se cuentan otros en diferentes partes del mundo, la letalidad total es cercana al 18% (Fernández, 2000).

2.4.4.3 Presencia en alimentos

Generalmente las infecciones por *E.coli* O157:H7 se asocian al consumo de alimentos, entre los que predominan los de origen animal. Otros alimentos identificados son: la lechuga, rábano, germinado de alfalfa, y productos elaborados como yogurt, salami y sidra. Cepas especialmente acidúricas de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 pueden sobrevivir en leches fermentadas por periodos variables (Fernández, 2000). En un brote por sidra, el producto fue preparado en la propia granja productora de las manzanas; con frecuencia los frutos se recogían del suelo que había sido abonado con estiércol (CDC, 1975). La investigación reveló

además que el equipo de fabricación era lavado pero no desinfectado; la sidra se mantenía refrigerada, por lo que no contenía ningún conservador agregado. Resultaron afectadas 229 persona. *S. Typhimurium* se aisló de las heces de 154 víctimas, de 6 de 30 empleados de la planta y de 2 botellas de sidra que se encontraron en el hogar de los enfermos. La media del pH del producto fue de 3.6 (3.4-3.9) (Fernández, 2000).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estudiar el comportamiento de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia Coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* en aguamiel y pulque bajo diferentes condiciones de elaboración.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar el comportamiento de *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* durante la fermentación del agua miel a dos temperaturas de incubación.
2. Investigar el comportamiento de *E. coli* O157:H7 durante varios ciclos de fermentación del pulque utilizando como “semilla” pulque contaminado con el patógeno a fin de determinar la acidotolerancia del microorganismo.

IV. MATERIALES

4.1 Equipo

Agitador Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, U.S.A.)

Autoclave eléctrica SM 200 (Yamato Scientific, U.S.A.)

Balanza analítica (Ohaus, U.S.A.)

Baño maría con circulación de agua, (Riossa)

Centrífuga digital (Hérmle Labnet Z 323 K, Alemania)

Cuenta colonias (Darkfield Québec, Cia. American Optical, U.S.A.)

Homogeneizador Stomacher, (Seward 400)

Incubadora bacteriológica (Blue M, U.S.A.)

Parrilla eléctrica (Thermolyne Cimarec, U.S.A.)

Potenciómetro (Thermo Electron Corporation, U.S.A.)

Refrigerador (Lab-line Environeers Inc., U.S.A.)

Termómetros

4.2 Reactivos

Agua destilada

Antibiótico Natamicina

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

Metanol (Sigma Chemical, EUA)

NaCl (Sigma Chemical, EUA)

4.3 Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron de marca Bioxon, México

Agar Baird Parker (ABP)

Agar cuenta estándar (ACE)

Agar de bilis y rojo violeta (ABRV)

Agar eosina-azul de metileno (EMB)

Agar soya tripticasa (AST)

Agar sulfito bismuto (ASB)

Agar verde brillante (AVB)

Caldo soya trlpticaseína (CST)

Diluyente peptona de caseína (DP)

V. METODOS

5.1 Recolección de muestras

El aguamiel y el pulque semilla empleados en este trabajo fueron obtenidos en Singuilucan, Hidalgo, en las instalaciones de la empresa Distribuidora internacional de pulque S. A. de C. V. (DIP). Las muestras de aguamiel mezcla (AMM) y pulque semilla (PS) fueron obtenidas de la planta de la empresa y el aguamiel sin mezclar (AMSM) fue obtenido directamente de una planta de maguey de un campo de cultivo ubicado a 3 Km de la empresa, en estación pre-invernal.

Cada muestra recolectada correspondió a una etapa del proceso de elaboración del pulque semilla, así; aguamiel sin mezclar fue el aguamiel proveniente de una sola planta de maguey sin mezclar con otro aguamiel en el estado de prerrecolección a campo abierto. El aguamiel mezcla, fué el aguamiel captado por la empresa, proveniente de diferentes plantas de maguey, así como de diversos productores de la región. Y el pulque semilla es el producto fermentado que prepara la empresa para ser utilizado como inóculo de aguamiel fresco para la obtención del pulque comercial. El pulque semilla tiene características muy particulares y no son reveladas por la empresa.

Se tomaron dos lotes de muestras en dos días distintos en un periodo de un mes. La temperatura, pH y porcentaje de sólidos solubles fueron; 2.7°C, 7.51 y 12°Bx para AMSM, 7.9°C, 7.62 y 9.8°Bx para AMM y 12°C, 4.29 y 4.4°Bx, en PS. Adicionalmente se recolecto AMSM (recolectado inmediatamente después de

raspar el maguey), para los últimos estudios. Las muestras fueron tomadas y transportadas bajo condiciones asépticas y de refrigeración como lo establece la legislación sanitaria en México (NOM-109-SSA-1994). En el laboratorio las muestras fueron divididas en tubos individuales con 30 mL y todos los tubos se mantuvieron en congelación a -18°C, hasta su uso.

5.2 Comportamiento de *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, y *Staphylococcus aureus* en aguamiel y pulque

5.2.1 Cepas

Se trabajó con 4 cepas resistentes al antibiótico Rifampicina; *E. coli* enterohemorrágico O157:H7 (aislada de caso clínico); *Salmonella* Typhimurium (8₅ aislada de jitomate); *Listeria monocytogenes* Scoott A, y *Staphylococcus aureus* (ATCC 13301). La cepa patógena de *E. coli* O157:H7 fue donada por el departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional y las demás cepas fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro. La resistencia al antibiótico Rifampicina había sido lograda por antelación mediante los procedimientos descritos por Kaspar (1993). Brevemente, un cultivo desarrollado durante 6 h. a 35°C en CST, se centrifugó y resuspendió en solución salina SSI a una concentración final de 10⁹ UFC/ml. Un mililitro de la suspensión de cada cepa se extendió en 3 placas con AST conteniendo 100 mg/L de rifampicina (AST-Rif). Las placas inoculadas se incubaron a 35°C/48-72 h. Las colonias que desarrollaron, 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 agar soya tripticasa (AST) inclinado y se activaron mediante tres transferencias sucesivas en caldo soya tripticasa (CST) incubado a 35°C/24horas. La resistencia al antibiótico se mantuvo en las 4 cepas a lo largo del estudio.

5.2.2 Preparación de la muestra

Tubos con 30 mL de cada muestra (AMSM, AMM y PS) mantenidos en congelación (punto 5.1), fueron sacados del congelador y se descongelaron sumergiendo los tubos en agua con una temperatura aproximada de 40°C. Bajo estas condiciones, la descongelación de las muestras se presentó en un lapso de 10 minutos alcanzando una temperatura aproximada de 20°C. De cada muestra se tomaron 10 mL y se depositaron por separado en tubos de ensaye estériles; posteriormente estos fueron inoculados con cada uno de los patógenos y se homogenizaron mecánicamente en vortex (Figura 3).

5.2.3 Preparación de los inóculos

Las 4 cepas resistentes a Rifampicina R+, fueron desarrolladas en CST a 37°C/18-24 horas. Bajo estas condiciones de cultivo las cepas alcanzan una concentración de 10^9 UFC/mL. Todos los cultivos activados fueron centrifugados dos veces con SSI al 0.85% a 3500rpm/25 min (dos lavados). Los cultivos lavados se resuspendieron en SSI para su inmediata utilización en el alimento. A partir de estas cepas lavadas, para cada una se realizaron diluciones decimales en diluyente de peptona (DP), para obtener el nivel de inóculo deseado (10^2 ó 10^3 UFC/mL).

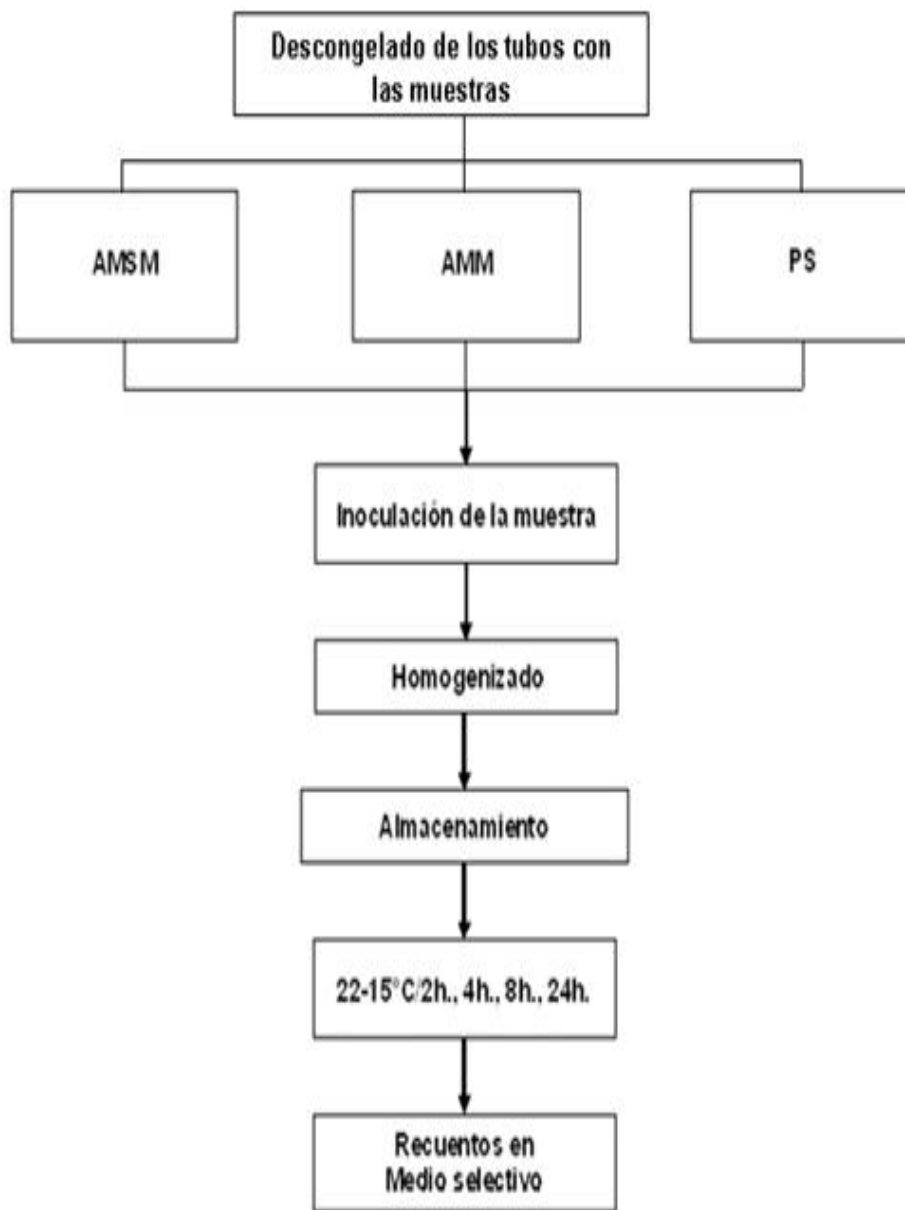


Figura 3. Comportamiento de *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*, a partir de aguamiel y pulque inoculados.

5.2.4 Monitoreo del desarrollo de los patógenos

Por separado, cada una de las cepas de los microorganismos patógenos se inocularon en tubos de ensaye conteniendo 10 ó 15 mL de aguamiel o pulque. Los tubos inoculados se incubaron a 15°C y 22°C. Periódicamente se efectuaron recuentos a partir de cada uno de los tubos mediante la técnica de vertido en placa empleando agar cuenta estándar (ACE) diluido con medios selectivos correspondientes al patógeno adicionados de 100 mg/L de Rifampicina. El recuento de los patógenos consistió en lo siguiente: a partir de la muestra homogenizada se realizaron diluciones decimales en tubos que contenían 9 ml de diluyente peptona. Los recuentos consistieron en colocar dentro de una caja de petri vacía, 1 mL de diluciones seleccionadas, seguido de 10 mL de ACE con medios selectivos con una concentración de 100 mg/L de Rif con o sin Natamicina (Nat) 50 mg/L. Para *Salmonella* y *E. coli*, se utilizó agar sulfito bismuto (ASB) y agar de bilis y rojo violeta (ABRV), respectivamente; ambos diluidos con ACE y con una concentración de 100 mg/L de Rif, (Figura 4). Para *L monocytogenes* y *S. aureus* se utilizó agar cuenta estándar ACE con una concentración de 100 mg/L de Rif y con una concentración de Natamicina (Nat) de 50 mg/L, se homogeneizó, y se dejó solidificar (Figura 4). Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas. El valor obtenido se expresó como unidades formadores de colonias por mL de muestra (UFC/mL). Todos los estudios se efectuaron por triplicado.

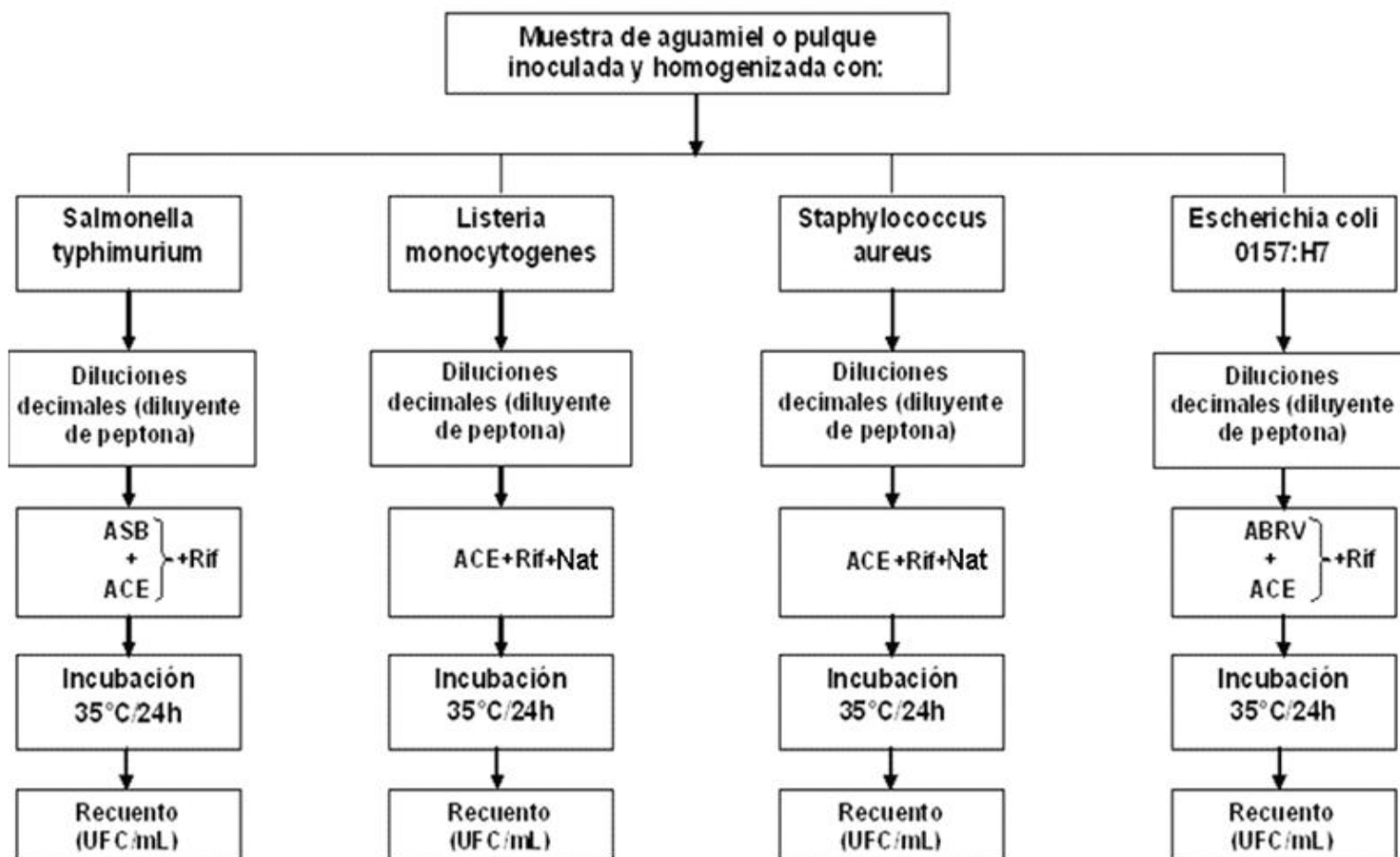


Figura 4. Cuantificación de, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* O157:H7 en aguamiel y pulque.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de microorganismos patógenos en aguamiel y pulque es de especial importancia al considerarse el origen del aguamiel, su manipulación, la forma de preparar la bebida fermentada y la forma en que se consume el pulque. El aguamiel es esencialmente un producto que se produce en el campo y al igual que muchas frutas y verduras, se encuentra expuesto a múltiples fuentes de contaminación en el proceso, desde su producción hasta su fermentación; diferentes y variadas fuentes de contaminación pueden entrar en contacto con el aguamiel tales como: la tierra, el agua de lluvia, la fauna, los utensilios y el humano. Por otra parte, a diferencia del aguamiel, los vegetales y frutas limitan su contenido microbiano a sus partes externas, por encima del tejido que les recubre (cutícula), sin embargo, ésta es una barrera inexistente para aguamiel. Durante la recolección del aguamiel, las condiciones de sanidad y/o grado de desinfección de los utensilios para la extracción y colecta del aguamiel, así como la higiene del recolector del aguamiel (tlachiquero) son factores de riesgo, en especial el factor humano. Después de la recolección del aguamiel, podrían influir la maquinaria y el equipo, los recipientes, animales domésticos y silvestres, los trabajadores, el polvo de la atmósfera y los vehículos de transporte.

En general, los microorganismos incluidos en este estudio poseen características que les pueden permitir multiplicarse en los alimentos y un potencial de sobrevivencia en el ambiente extraintestinal (Fernández, 2000). Así pues, un alimento adquiere mayor o menor riesgo para la salud, dependiendo del tipo de

microorganismos patógenos que pueda contener y de las condiciones prevalentes que permitan su desarrollo (Orozco, 1999). En consecuencia, la evaluación del comportamiento de bacterias patógenas en los alimentos, como el aguamiel y pulque, es una forma de medir el riesgo atribuido a su consumo.

Para el estudio del comportamiento de los patógenos en aguamiel y pulque se recurrió a modelos de laboratorio consistentes en la inoculación de las bebidas con un número conocido de microorganismos, almacenamiento controlado, monitoreo del comportamiento del microorganismo y la ejecución de recuentos periódicos de las porciones inoculadas para conocer la dinámica del microorganismo estudiado. Aunque, este tipo de modelos no nos reflejan el comportamiento exacto que de manera natural presentan los microorganismos durante la recolección, transporte del aguamiel y fermentación del mismo, nos dan idea del comportamiento microbiano que podría estar ocurriendo.

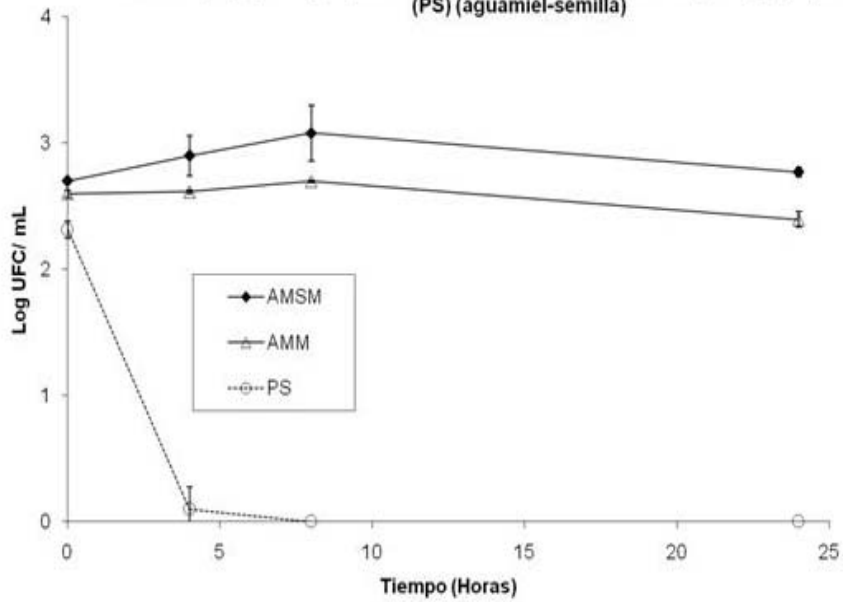
Al comenzar los estudios se encontró que los microorganismos nativos del aguamiel y pulque eran capaces de crecer en los medios selectivos empleados para la investigación de los patógenos, interfiriendo con el conteo de los microorganismos de estudio, por tal razón se recurrió al empleo de cepas de las bacterias patógenas resistentes a rifampicina (R+), un antibiótico de amplio espectro. Así, la siembra de *Salmonella* y *E. coli* se efectuó en el medio selectivo correspondiente, que fue diluido con medio no selectivo ACE conteniendo rifampicina. Se empleó la mezcla medio selectivo+ACE+rifampicina, ya que por sí sola la rifampicina no fue suficiente para inhibir a todos los microorganismos nativos del pulque; la rifampicina no inhibe el desarrollo de las levaduras por lo

que estas crecían en el medio que sólo contenía este antibiótico, de esta forma el medio de cultivo final inhibió a toda la flora microbiana del aguamiel y pulque (Datos no mostrados). La inhibición de levaduras en los medios de cultivo también se puede lograr con el antibiótico Natamicina; este se incorpora a los medios de cultivo y las levaduras no crecen. Sin embargo, al inicio de nuestro estudio no contábamos con presupuesto para la compra del antibiótico. Dispusimos del antibiótico hasta la mitad de nuestros estudios, por consiguiente lo empleamos sólo en los estudios de *L. monocytogenes* y *S. aureus*; en este caso se preparó medio no selectivo adicionado de rifampicina y natamicina. Los estudios se realizaron tanto a 22°C como 15°C debido a que son temperaturas promedio que ocurren en la región donde se obtuvo el aguamiel y el pulque. En esta región la empresa DIP participante en el proyecto obtiene aguamiel y pulque.

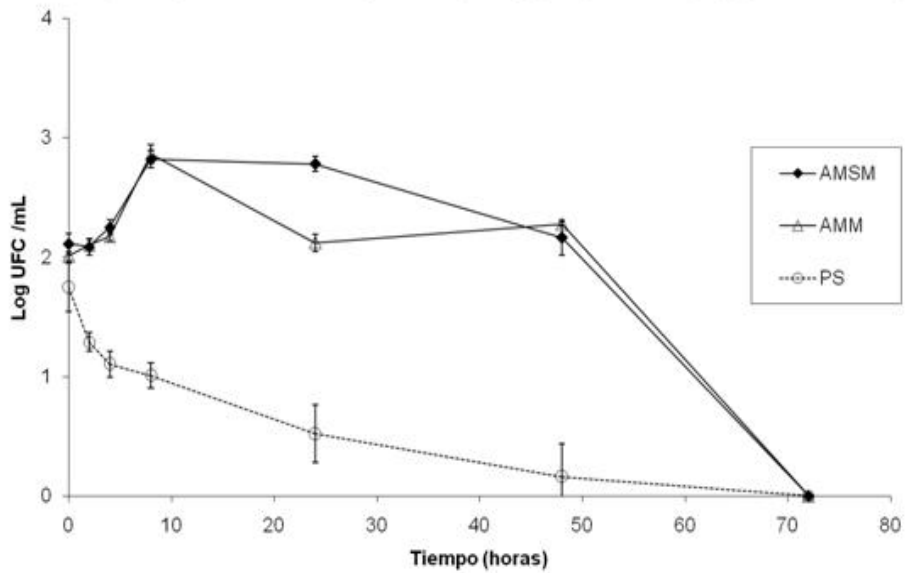
6.1 Comportamiento de los microorganismos patógenos inoculados en AMSM, AMM y PS a 15° y 22°C

Tanto a 15° como a 22°C las cepas R+ de *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* mostraron un comportamiento en general semejante: a 22°C, en PS ninguna de las cepas se multiplicó, por el contrario se inactivaron paulatinamente (Gráficas 1-3). A diferencia; en AMSM como en AMM, las tres cepas se multiplicaron ligeramente dentro de las primeras 12 horas (Gráficas 1-3) y posteriormente se observó una disminución paulatina en la concentración de los patógenos con respecto del tiempo. *L. monocytogenes* mostró mucho más sensibilidad a los tres tipos de sustrato, en PS después de 2 horas de contacto ya no

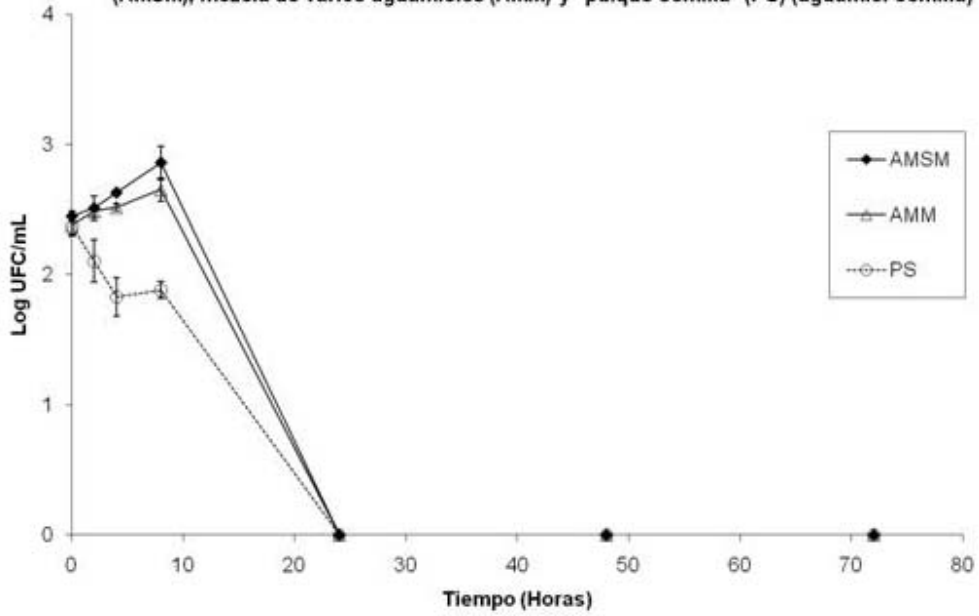
Gráfica 1. Comportamiento de *Salmonella Typhimurium* a 22°C en aguamiel de un solo maguey (AMSM), aguamiel mezcla de varios aguamieles (AMM) y pulque semilla (PS) (aguamiel-semilla)



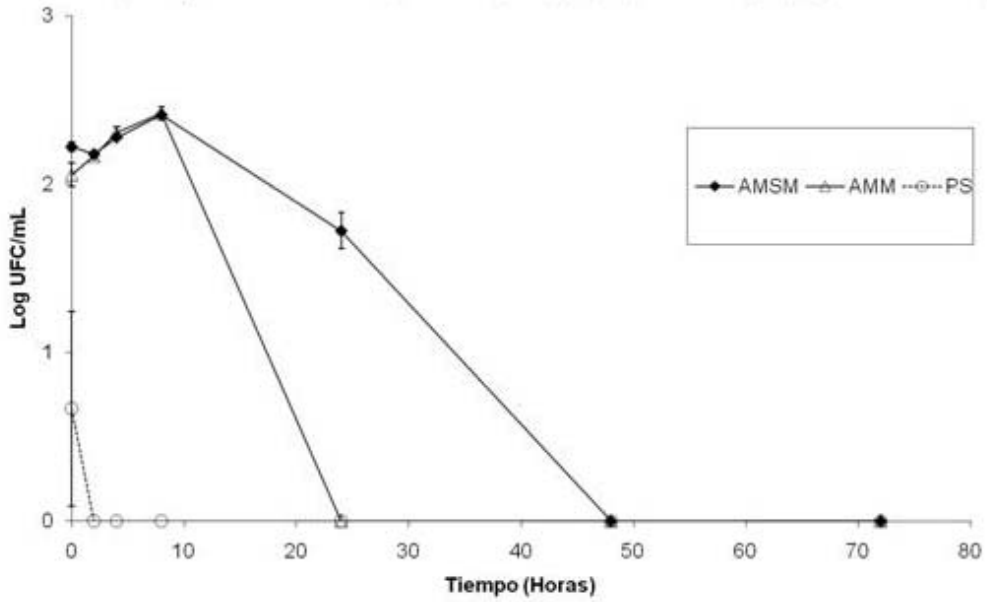
Gráfica 2. Comportamiento de *E. coli* O157:H7 a 22°C en aguamiel de un solo maguey (AMSM), mezcla de varios aguamieles (AMM) y pulque semilla (PS) (aguamiel-semilla)



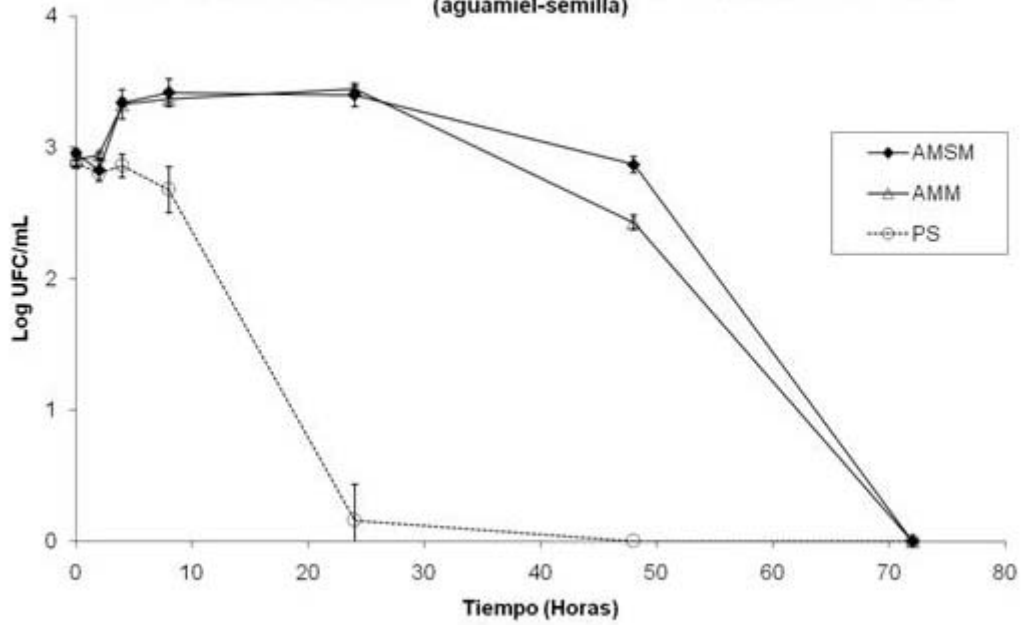
Gráfica 3. Comportamiento de *S. aureus* a 22°C en aguamiel de un solo maguey (AMSM), mezcla de varios aguamieles (AMM) y "pulque semilla" (PS) (aguamiel-semilla)



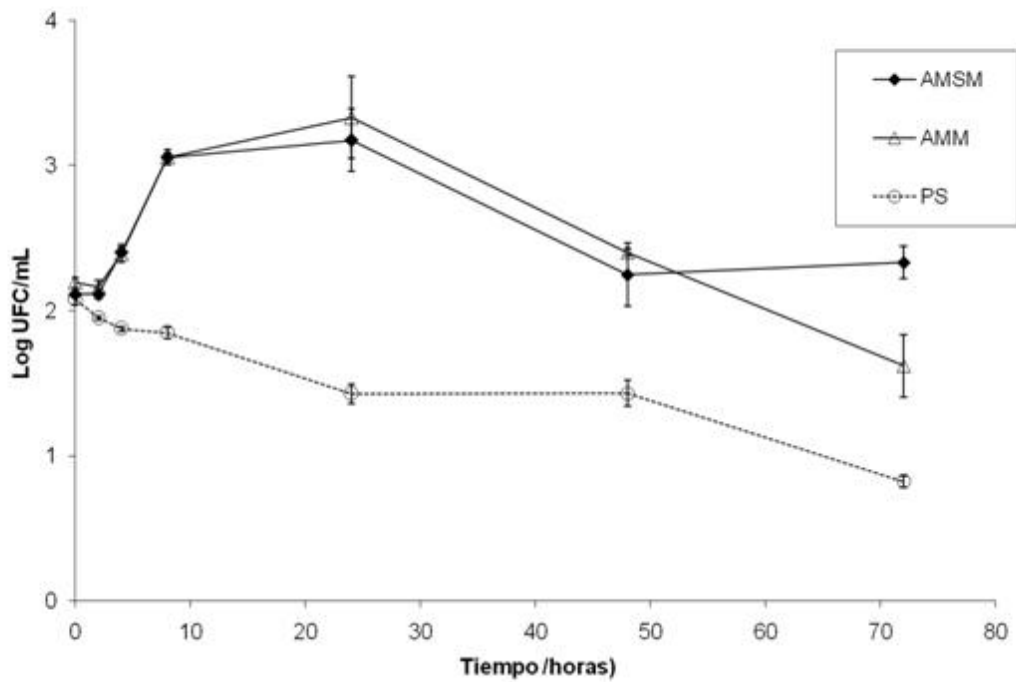
Gráfica 4. Comportamiento de *L. monocytogenes* a 22°C en aguamiel de un solo maguey (AMSM), mezcla de varios aguamieles (AMM) y "pulque semilla" (PS) (aguamiel-semilla)



Gráfica 5. Comportamiento de *Salmonella Typhimurium* a 15°C en aguamiel de un solo maguey (AMSM), mezcla de varios aguamieles (AMM) y pulque semilla (PS) (aguamiel-semilla)



Gráfica 6. Comportamiento de *E. coli* O157:H7 a 15°C en aguamiel de un solo maguey (AMSM), mezcla de varios aguamieles (AMM) y pulque semilla (PS) (aguamiel-semilla)



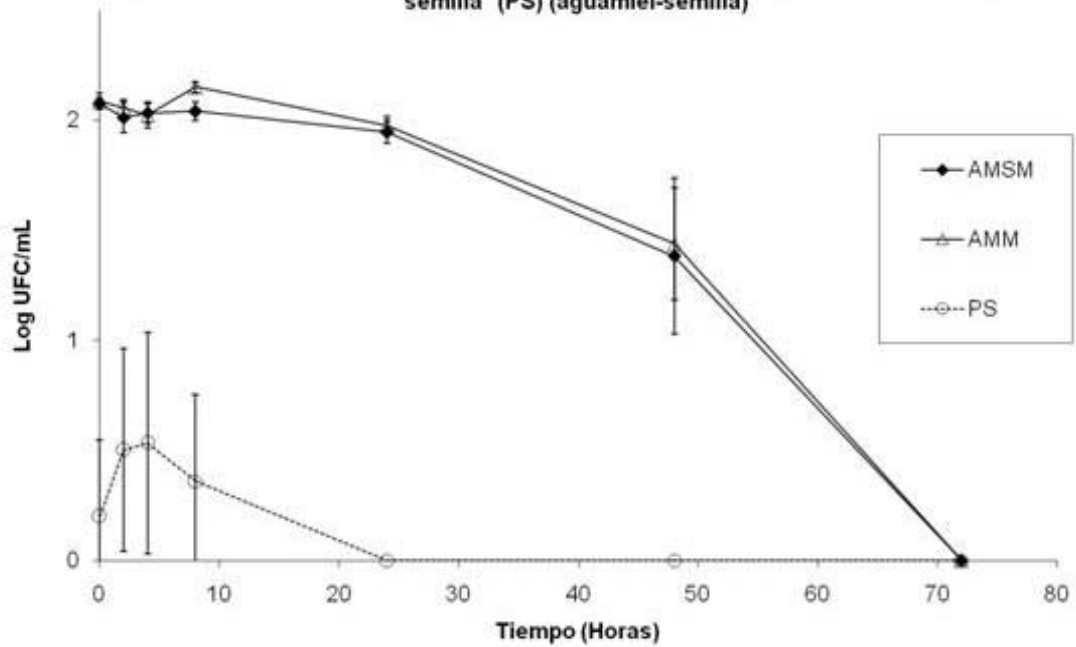
se recuperó al patógeno (Gráfica 4). Y cuando *L. monocytogenes* se inoculó en AMSM, éste sobrevivió más que en AMM, luego de alcanzar la concentración máxima (10 horas) casi inmediatamente se comenzó a inactivar (Gráfica 4).

Cuando los estudios se realizaron a 15°C, las cepas *S. Typhimurium* y *S. aureus*, no se multiplicaron en PS, no obstante la velocidad de inactivación fue más lenta que a 22°C (Gráficas 5-7). Sin embargo *E. coli* O157:H7 a la misma temperatura, sobrevivió al menos 70 horas en PS (Gráfica 6). A 15°C nuevamente *L. monocytogenes* mostró mayor susceptibilidad al PS que los otros microorganismos patógenos bajo estudio (Gráfica 8).

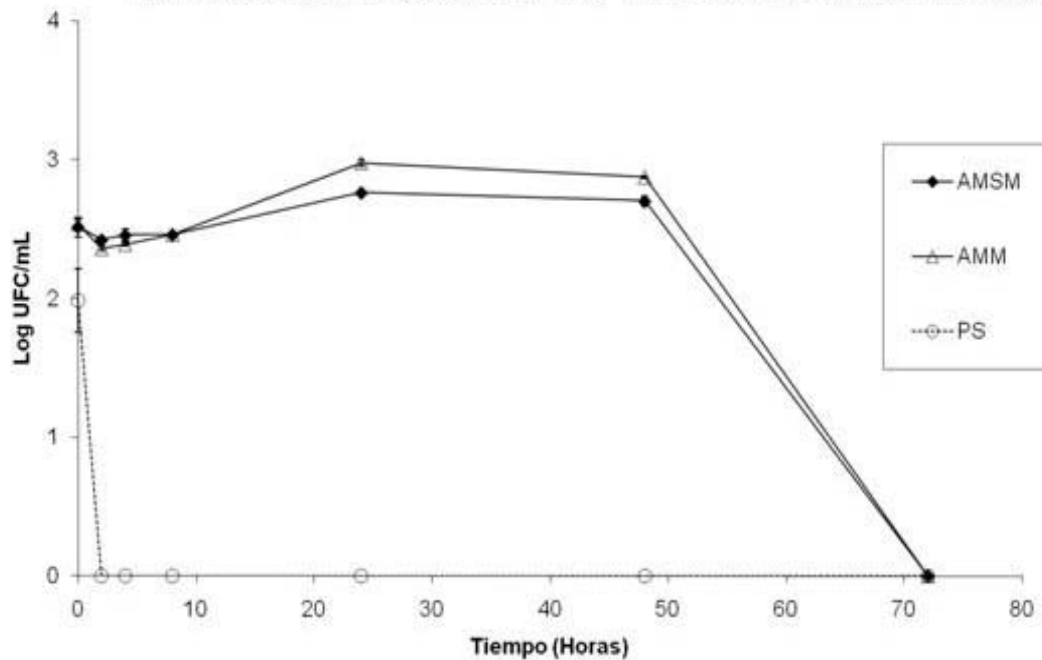
En general, a 15°C las 4 cepas también se multiplicaron ligeramente tanto en AMSM como en AMM pero se requirió mayor tiempo para alcanzar la concentración máxima en comparación con el tiempo requerido a 22°C, posteriormente también se presentó una disminución paulatina en la concentración del patógeno (Gráficas 5-8).

En las gráficas obtenidas tanto a 22° (Gráficas 1-4) como a 15°C (Gráficas 5-8) se aprecia claramente el efecto de la temperatura en el comportamiento microbiano; éste se manifiesta en un incremento en la tasa de desarrollo (tiempo de generación) en la duración de la fase estacionaria, el número o concentración final alcanzada y el tiempo requerido para ello. La respuesta de la actividad microbiana a los cambios de temperatura es más inmediata e intensa que la observada frente a otros factores como por ejemplo la actividad acuosa, potencial redox ó la falta de nutrientes (Fernández, 2000). Es importante destacar que el comportamiento a las

Gáfica 7. Comportamiento de *S. aureus* a 15°C en aguamiel de un solo maguay (AMSM), mezcla de varios aguamieles (AMM) y mezcla de aguamieles más "pulque semilla" (PS) (aguamiel-semilla)



Gráfica 8. Comportamiento de *L. monocytogenes* a 15°C en aguamiel de un solo maguay (AMM), mezcla de varios aguamieles (AMM) y "pulque semilla" (PS) (aguamiel-semilla)



diferentes temperaturas está también determinado por las características intrínsecas de cada microorganismo (Fernandez, 2000). Se aprecia además en las gráficas 1-8, que luego del discreto desarrollo se presenta una disminución paulatina en la concentración del patógeno, ésta puede ser una respuesta configurada por la funcionalidad (a bajas temperaturas) inherente de las enzimas que le son propias al microorganismo y de la disminución de la funcionalidad de la membrana celular (Leyer y Jonson, 1992; Leyer., 1995; Hill y col., 1995). Los microorganismos reaccionan a las bajas temperaturas incrementando la proporción de ácidos grasos no saturados que muestran fluidez a bajas temperaturas; el cambio permite mantener la funcionalidad de la membrana celular (Cronan, 1978; Monteoliva-Sanchez y col., 1988; Fernández, 2000).

Si bien es cierto que la temperatura ejerce el mayor efecto en la actividad microbiana, otros factores también tienen influencia (y en algunos casos mayor que la temperatura), por ejemplo, hay que considerar que en el medio donde se encuentran los patógenos de estudio (aguamiel) se están generando compuestos con actividad antimicrobiana tales como ácidos orgánicos (lactico, por ejemplo) (Ruvalcaba, 1983), etanol y posiblemente bacteriocinas, los cuales tienen gran efecto en la sobrevivencia y desarrollo microbiano. Todos estos efectos explicarían en parte las diferencias observadas en el comportamiento de los microorganismos estudiados, por ejemplo, el contraste entre *E. coli* O15:H7 (Gráficas 2 y 6) contra *L. monocytogenes* (Gráficas 4 y 8).

Es importante destacar que además, algunos microorganismos naturalmente son más resistentes a los ácidos y pueden desarrollar mayor acidotolerancia y

sobrevivir por mucho más tiempo e incluso multiplicarse aun en éstas condiciones (Hsin-Yi y Chou, 2001). La posible adaptación ácida de *E. coli* y *Salmonella* en alimentos de bajo pH y en alimentos fermentados, ha sido estudiada en varias investigaciones (Leyer y Jonson, 1992; Leyer y col., 1995; Hill y col., 1995). Por ejemplo, se ha observado sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 en sidra hasta por 31 días a 8°C (Zaho y col., 1993). *S. aureus* en otros productos de fermentación como yogurt, puede sobrevivir por varios días (ICMSF, 1998). Por el contrario patógenos como *V. cholerae* O1, se inactivan en pocos minutos al encontrarse en alimentos de bajo pH como jugo de naranja o en alimentos fermentados como el yogurt (Fernández, 2000).

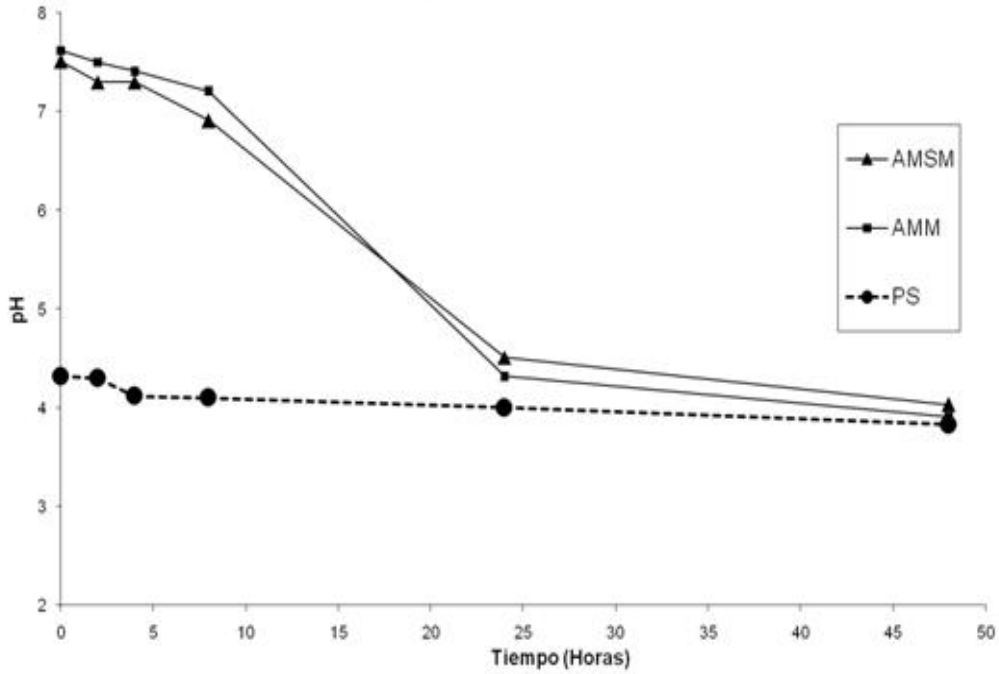
No obstante la tolerancia a los medios ácidos o fermentados, depende también del tipo de sustrato, por ejemplo *E. coli* O157:H7 sobrevive más tiempo en jugos fermentados almacenados a baja temperatura que en leches fermentadas (Hsin-Yi, Chou, C, 2001).

En nuestro estudio, las cepas de los 4 tipos de microorganismos se inactivaron más rápidamente en PS que en AMSM y AMM (Gráficas 1-8). Este efecto podríamos relacionarlo con el pH. El pH del PS al momento de la inoculación presentó un valor cercano a 4 mientras que en los otros sustratos el valor promedio fue de 7.5 (Gráficas 9 y 10). Es sabido que valores de pH como el observado desde el inicio en el PS es desfavorable para el crecimiento y sobrevivencia de los microorganismos; por el contrario, los valores de pH que presentaron el AMSM y el AMM son valores que favorecen tanto la sobrevivencia como el desarrollo microbiano. Se observó también que el pH en el PS se modificó

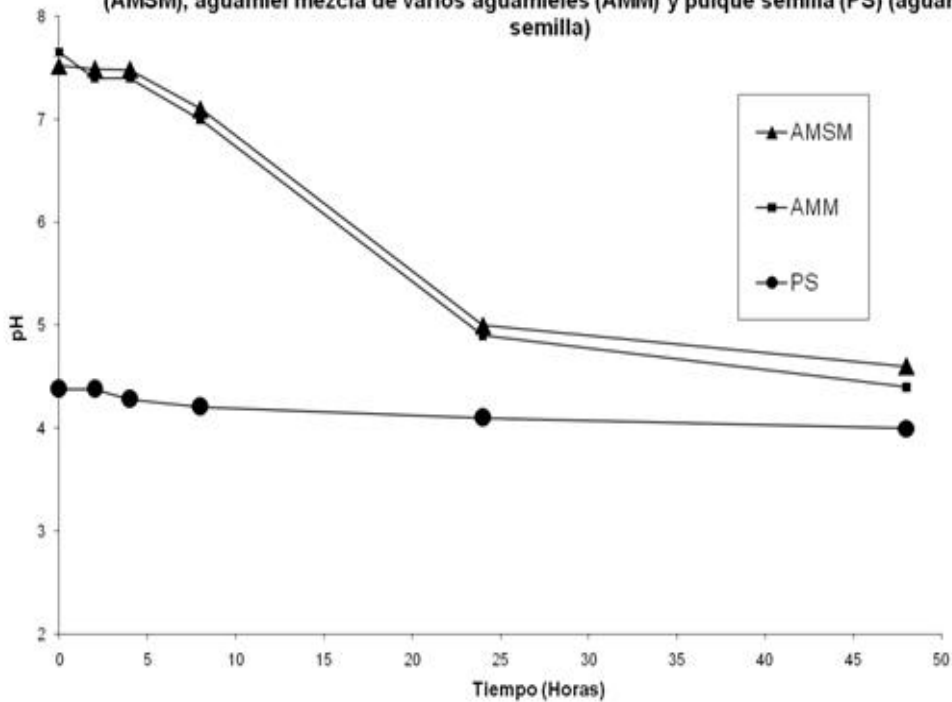
ligeramente durante fermentación, mientras que en el AMSM y AMM fue disminuyendo paulatinamente durante la fermentación; y una mayor caída de pH se observó a partir de las primeras 10 horas de desarrollo (Gráficas 1-10), esto es coincidente con el momento en el que se alcanzó el mayor desarrollo de los microorganismos, lo cual sugiere que los microorganismos dejaron de multiplicarse por los cambios drásticos de pH que se presentaron en el medio. Además, se aprecia en las gráficas 9 y 10 que a las 24 horas se alcanzó un pH 5 en AMSM y AMM; este momento y valor de pH coincide con el momento en el cual comienza la mayor inactivación de los microorganismos patógenos que previamente se habían multiplicado en estos sustratos (Gráficas 1-8). En otras palabras, los datos muestran que al alcanzarse un pH 5 se inicia un mayor efecto sobre la viabilidad de los patógenos.

En diferentes estudios se ha reportado que *L. monocytogenes* presenta cierta ácido resistencia o tolerancia ácida en alimentos ácidos (Kroll y Patchett, 1992); sin embargo, en los estudios que efectuamos con aguamiel y pulque observamos un efecto contrario; esto sugiere que muy posiblemente para este microorganismo el principal efecto inhibitorio no sea el pH sino otros factores tales como ácidos orgánicos, el etanol generado ó incluso bacteriocinas (Fernández, 2000).

Gráfica 9. Valores de pH a 22 °C en muestras de aguamiel de un solo maguey (AMSM), aguamiel mezcla de varios aguamieles (AMM) y pulque semilla (PS) (aguamiel-semilla).



Gráfica 10. Valores de pH a 15 °C en muestras de aguamiel de un solo maguey (AMSM), aguamiel mezcla de varios aguamieles (AMM) y pulque semilla (PS) (aguamiel-semilla).



6.2 Comportamiento de *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *L. monocytogenes* y *S. aureus* durante ciclos de fermentación de pulque semilla

En los estudios anteriores, *E. coli* O157:H7 presentó la mayor sobrevivencia y el mayor desarrollo tanto a 15° como a 22°C, durante las primeras horas de incubación en todos los sustratos, en comparación con los otros patógenos (Gráficas 2 y 6). Posteriormente, aunque disminuyó de manera considerable su número, en ningún caso o estudio se tuvo un pulque completamente exento de este patógeno dentro de las primeras 50 horas de fermentación; cosa que no ocurrió a una temperatura de 22°C con los otros patógenos cuya población si se inactivó por completo en el pulque o producto final de la fermentación del aguamiel dentro del mismo periodo que para *E. coli* O157:H7 (Gráficas 1, 3 y 4). Tal comportamiento de *E. coli* O157:H7, sugería una posible adaptación ácida del patógeno, la cual pudo ser desarrollada durante la fermentación del aguamiel, como ocurre con otros patógenos en otros alimentos (Foster y Hall, 1990; Gorden, 1993; Miller, 1994). Para explorar esta posibilidad, se realizaron dos tipos de experimentos:

a) Se inoculó al patógeno en aguamiel recién excretado por el maguey (recolectado inmediatamente después de raspar el maguey), se dejó 14 horas a temperatura ambiente en contacto el patógeno con el aguamiel y finalmente este aguamiel inoculado se adicionó con “pulque semilla” (en una proporción de 85% pulque semilla y 15% del aguamiel contaminado) para obtener el producto final (pulque). Todo éste procedimiento lo denominamos como “ciclo de fermentación de pulque semilla”.

b) Se monitoreo el comportamiento del patógeno durante varios ciclos de fermentación. Para este caso, después del primer ciclo de fermentación (descrito en el punto 6.2 inciso a), se utilizó ahora como sustrato aguamiel no contaminado en una proporción del 15% de este y 85% de “pulque semilla” contaminado que resulto como producto del ciclo anterior. Éste procedimiento se mantuvo de forma continua por 3 ciclos de fermentación más.

Para el primer caso, lo que se pretendía era acercarse lo más posible a las condiciones en que artesanalmente se produce el pulque. En los primeros estudios utilizamos aguamiel (de un solo maguey o aguamiel mezcla de varios magueyes) pero este aguamiel lo recolectamos en la empresa participante del proyecto. Este aguamiel con el que se trabajó (primeros estudios, Gráficas 1-8) tenía en promedio 14 horas, ya que es el tiempo que en promedio transcurre desde que el maguey se “raspa” (para estimular la liberación de la sabia o aguamiel) y se colecta del maguey. Muy posiblemente el comportamiento de los microorganismos patógenos no será el mismo si éstos ingresan en el aguamiel al primer momento en que el tlachiquero está raspando el maguey (estudios durante ciclos de fermentación de pulque semilla, punto 6.2, incisos a y b), que si ingresan en aguamiel de 14 horas. Si desde el momento en que se esta rapando el maguey el tlachiquero contamina al maguey internamente, inevitablemente los primeros volúmenes de aguamiel que excrete la planta se contaminaran con los patógenos presentes y en consecuencia, estos patógenos estarían en contacto con el aguamiel 14 horas antes de ser recolectado del maguey. Diferentes eventos pueden ocurrir en tal situación, por ejemplo; que los microorganismos nativos del

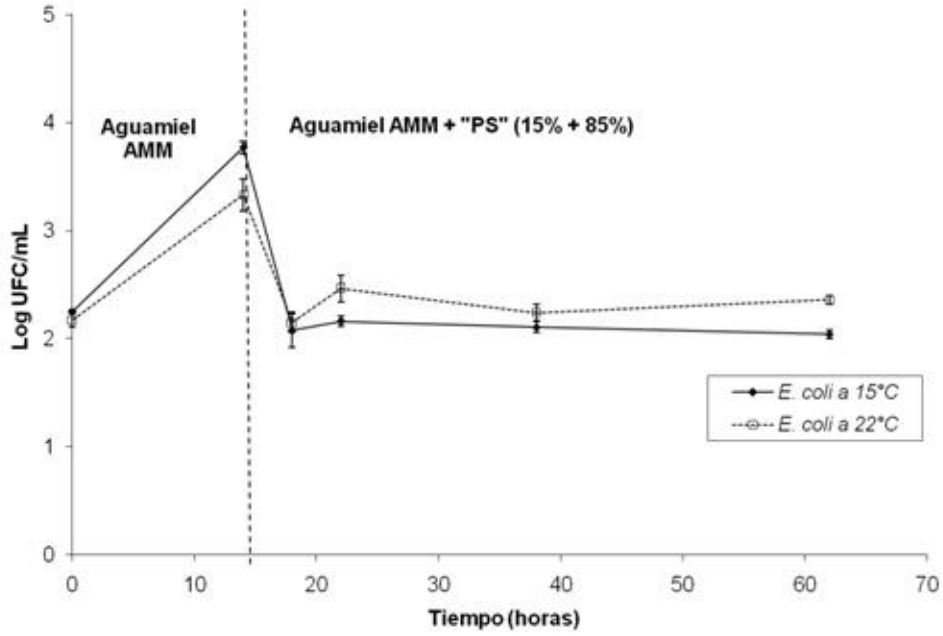
aguamiel se comiencen a multiplicar e inhiban el desarrollo de los patógenos ó viceversa como ocurre en varios alimentos (Fernández, 2000); o bien, que los microorganismos nativos comiencen a fermentar el aguamiel y las condiciones ácidas generadas no provoquen la muerte de los patógenos, si no que los induzcan a desarrollar mayor tolerancia (de la natural) a la acidez, tal como se ha reportado en varios alimentos ácidos (Leyer y col., 1995), por tal motivo se utilizó AMSM (recolectado inmediatamente después de raspar el maguey), (punto 6.2 inciso a).

En estos estudios del primer ciclo de fermentación, dentro de las primeras 14 horas se observó un incremento de 1.5-2 Log, 1 Log y 0.3 Log de UFC/mL en aguamiel para *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*, respectivamente (Gráficas 11, 12 y 13). *S. aureus* por el contrario, se inactivó por completo en éste período (Gráfica 14). Después de mezclar el aguamiel contaminado con el “pulque semilla” se presentó una inactivación progresiva y marcada en *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* (Gráficas 12 y 13); para *L. monocytogenes* la completa inhibición en la mezcla aguamiel-“pulque semilla” (APS) incubada a 15°C, se presentó aproximadamente 4 horas después de realizarse la mezcla APS (Gráfica 12), mientras que en la mezcla de APS que se incubó a 22°C una completa inhibición se presentó hasta las 8 horas (Gráfica 12). Para el caso de *S. Typhimurium* la completa inhibición se presentó a las 8 horas después de mezclarse el APS e incubarse a 15° ó 22°C. Por el contrario, *E. coli* O157:H7, sobrevivió al menos 50 horas después de mezclarse el APS e incubarse tanto a 15° como a 22°C (Gráfica 11). Es importante señalar que 24 horas

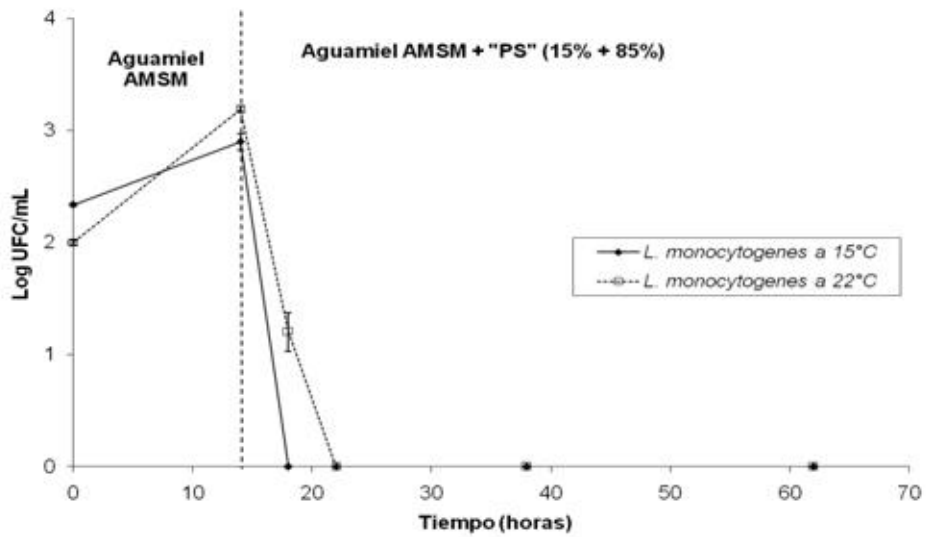
después de haberse realizado la mezcla APS, ya se ha formado el pulque, tanto en aquella mezcla incubada a 15°C como en la de 22°C. En ese momento el pulque tiene ya una concentración aproximada de etanol de 5.4 %, (Rubalcaba, 1983) y un pH de alrededor de 4 (Gráfica 15). Este comportamiento de *E. coli* O157:H7 nos sugiere la posibilidad de que el patógeno esté desarrollando no solamente ácido tolerancia en el pulque, si no también tolerancia al etanol generado durante la fermentación del aguamiel y además se está adaptando a todas las condiciones prevalentes en el pulque. El comportamiento manifestado por *E. coli* O157:H7 nos lleva a pensar en la posibilidad de que bajo condiciones reales de trabajo este comportamiento se repita.

Por otro lado, tanto a nivel artesanal de pequeños productores como a nivel industrial, por lo general para producir el pulque utilizan como “semilla” (inóculo) pulque de aproximadamente 48 horas de fermentación que ha sido producido por ellos mismos, éste lo mezclan con el aguamiel y la mezcla la dejan fermentar por alrededor de 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente separan la mayor parte del pulque y una pequeña proporción la almacenan para que continúe la fermentación por aproximadamente 24 horas más; transcurrido este tiempo se tiene una nueva semilla que se inoculará a nuevo aguamiel para producir nuevamente pulque. Según los resultados que obtuvimos, si el aguamiel se contamina con *E. coli* O157:H7 desde el campo, es muy posible después del proceso de producción del pulque (primer ciclo) que sobreviva el patógeno y además que la “semilla” producida a partir de este pulque también este contaminada. No obstante, cabe

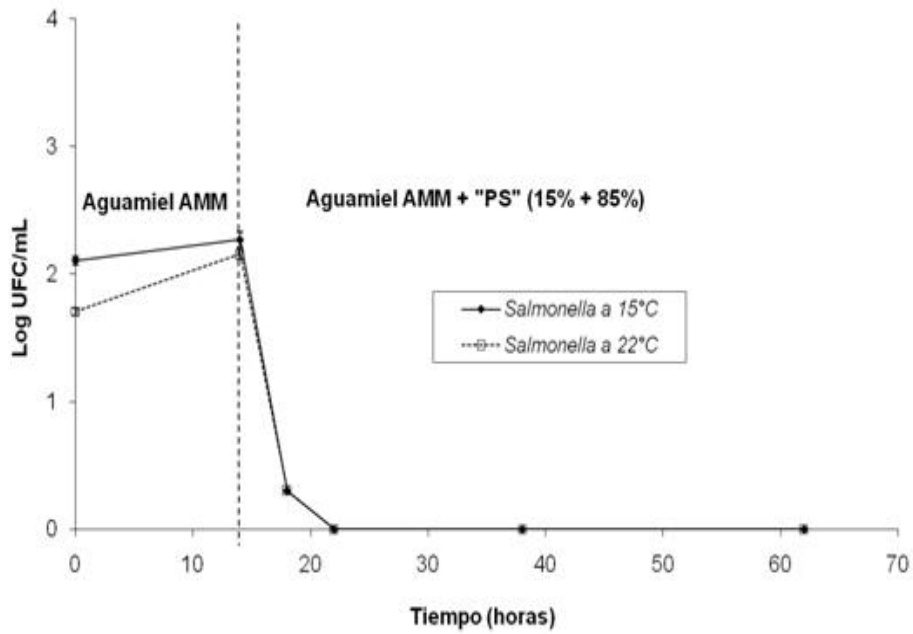
Gráfica 11. Comportamiento de *E. coli* O157:H7 en aguamiel (AMM) A y en posterior mezcla de ese aguamiel A con "pulque semilla" (PS) a dos temperaturas (15° ó 22° C) de almacenamiento de las muestras



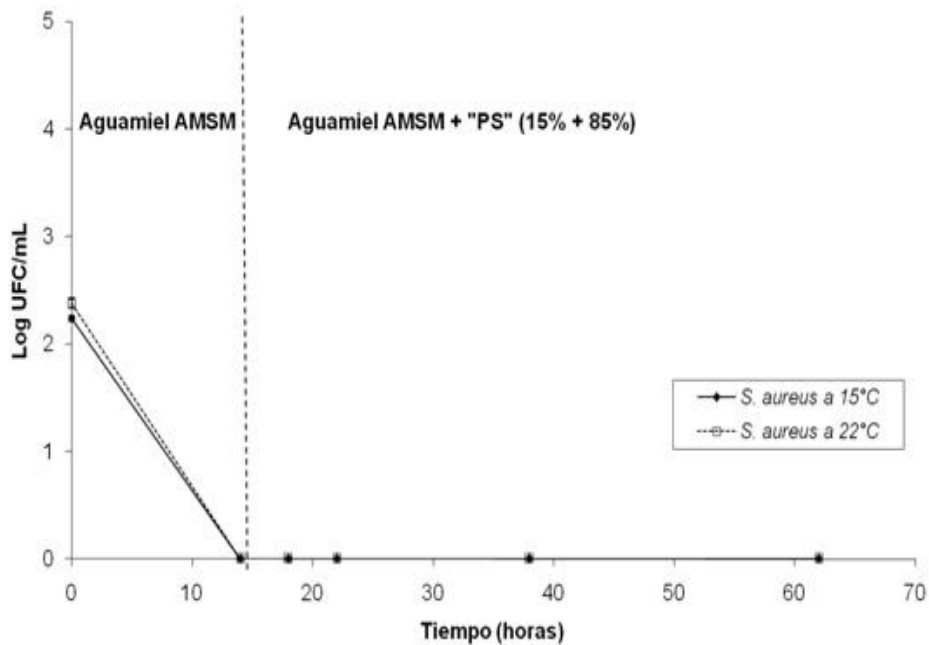
Gráfica 12. Comportamiento de *L. monocytogenes* en aguamiel (AMM) y en posterior mezcla de ese aguamiel (AMM) con "pulque semilla" (PS) y a dos temperaturas (15° ó 22° C) de almacenamiento de las muestras



Gráfica 13. Comportamiento de *S. Typhimurim* en aguamiel (AMM)(A) y en posterior mezcla de ese aguamiel A con "pulque semilla" (PS) a dos temperaturas (15° ó 22° C) de almacenamiento de las muestras



Gráfica 14. Comportamiento de *S. aureus* en aguamiel (AMM) y en posterior mezcla de ese aguamiel (AMM) con "semilla" (PS) y a dos temperaturas (15° ó 22° C) de almacenamiento de las muestras

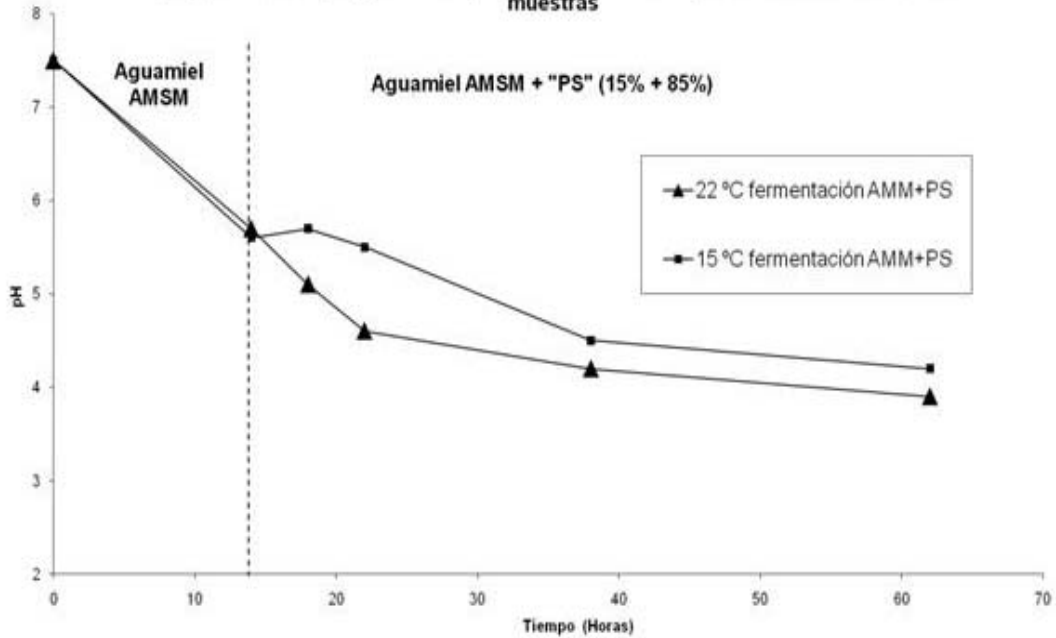


señalar que la forma en que se prepara la “semilla” varia según el productor, algunos la obtiene luego de 48 horas continuas de fermentación del aguamiel, otros, a una porción de pulque de 24 horas de fermentación le adicionan una pequeña cantidad de aguamiel (15%) cada 24 horas hasta que se completen 48, 72, 96 ó 120 horas más y después de este tiempo el productor ya tiene su semilla. Como una forma de explorar si *E. coli* O157:H7 podría sobrevivir durante el proceso de preparación u obtención de semilla de pulque, preparamos “semilla” de pulque comenzando con aguamiel contaminado tal como lo realizamos en el estudio anterior (primer ciclo), y lo sometimos a 3 ciclos más (punto 6.2 incisos a y b).

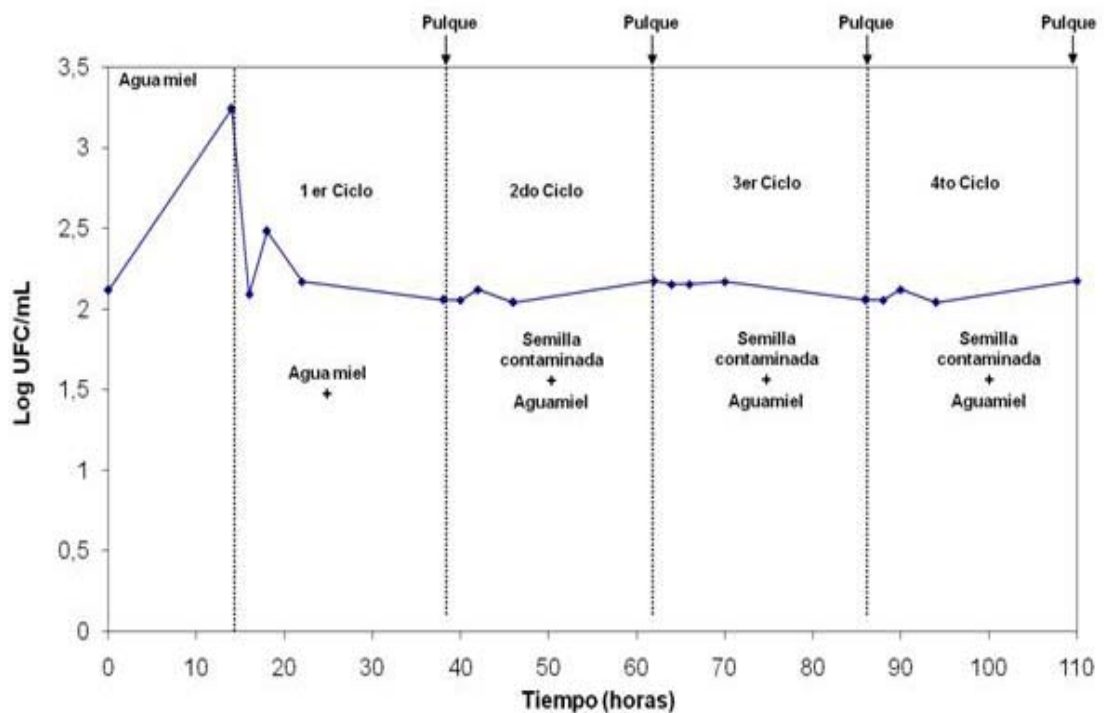
Tal como se esperaba, después del primer ciclo de fermentación *E. coli* O157:H7 sobrevivió prácticamente sin cambios en su concentración durante al menos 3 ciclos más, registrando una concentración final de alrededor de 2 Log de UFC/mL en “semilla” (Gráfica 16). Bajo esta situación es posible que ésta semilla ahora se convierta en fuente de contaminación para el aguamiel y el pulque producido con esta mezcla muy posiblemente esté contaminado.

Este último estudio, nos da mayores bases para pensar que *E. coli* O157:H7 ha desarrollado adaptación al ácido y al alcohol del pulque y uqe también se ha adaptado a todas las condiciones prevalentes en la semilla (potencial redox oxidado, flora nativa, limitada concentración de nutrientes, entre otros).

Gráfica 15. Valores de pH en aguamiel (AMM) y en posterior mezcla de ese aguamiel con "pulque semilla" (PS) y a dos temperaturas (15° ó 22° C) de almacenamiento de las muestras



Gráfica 16. Comportamiento de *E. coli* O157:H7 durante 4 ciclos de fermentación de pulque realizados con "semilla" PS contaminado



El fenómeno de adaptación microbiana a la acidez, esta siendo estudiado por varios investigadores en todo el mundo (Glass, 1992; Massa, 1997; Miller, 1994; Semanchek, 1996; Zhao y col., 1994). Se ha publicado por ejemplo, que *E. coli* activa tres sistemas de sobrevivencia que son inducidos a bajo pH (Lin y col. 1995). Un sistema involucra el metabolismo oxidativo de la bacteria cuando ésta crece en un medio de cultivo complejo; este sistema protege a *E. coli* de valores de pH de hasta 2.5. Este sistema aparentemente no ocurre cuando se desarrolla el metabolismo fermentativo (cuando crecen en medios ricos en glucosa). Los otros dos sistemas también le protegen contra valores hasta de pH 2.5; no obstante, estos mecanismos solo ocurren en medios que contienen arginina ó glutamato, ya que se presume que estos aminoácidos intervienen en la ácido resistencia de la bacteria.

Por otro lado, se ha mencionado que en este proceso de ácido resistencia interviene un gen regulador, conocido como *rpoS*. El gen *RpoS* es un factor sigma alternante (σ^s) que participa en la regulación de la expresión de diversos genes involucrados en la respuesta al estrés celular (Nguyen y col. 1993; Lange, 1991; McCann, 1991; Hengge-Aronis, 1993). En *E. coli* O157:H7 se ha identificado que el factor alternante σ^{38} es el que participa en el proceso de ácido resistencia (Lee, 1994; Slonezewski, 1987).

La adaptación ácida ha sido estudiada muy ampliamente en *S. Typhimurium* (Foster, 1991; Foster, 1990; Foster y Hall, 1991; Lee, 1994). Foster y Hall (1990, 1991) demostraron que *S. Typhimurium* desarrolla tolerancia o adaptación al ácido cuando el patógeno es colocado en un medio con pH de 5.5 a 6. Estos

investigadores señalan que la adaptación a la acidez involucra la expresión de 18 proteínas distintas, las cuales tienen como función mantener la homeostasis del pH y la viabilidad celular. Esta adaptación previa o contacto previo protege a la célula del patógeno de condiciones más bajas de pH. Este mecanismo probablemente también ocurra en otras bacterias entéricas incluyendo *E. coli* y *Shigella* (Goodson, 1989; Slonezewski y col. 1987; Small y col., 1994).

Finalmente, la participación de *E. coli* O157: H7 en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos asociados con el consumo de alimentos ácidos, tales como sidra de manzana, salchicha fermentada, yogur y/o mayonesa (Besser y col., 1993; CDC., 1995a; Morgan, 1993) ha llamado la atención sobre las propiedades de ácido resistencia de éste patógeno. Además, varios estudios recientes han demostrado que esta bacteria puede sobrevivir en una gran variedad de alimentos ácidos (Calicioglu y col., 1997; Glass, 1992; Massa, 1997; Miller y Kaspar , 1994; Semanchek, 1996; Zhao y Doyle., 1994). Otros estudios han demostrado que la adaptación previa a las condiciones ácidas puede aumentar la sobrevivencia de *E. coli* O157: H7 en alimentos de bajo pH ó alimentos ácidos (Leyer y col., 1995a; Tsai e Ingham, 1997). Leyer y col., (1995b) encontraron que células de *E. coli* O157:H7 adaptadas a las condiciones ácidas sobrevivieron mejor que las no-adaptadas en salchicha fermentada, en salami seco y sidra de manzana. Tsai e Ingham (1997) observaron que la adaptación al ácido confirió mayor sobrevivencia a *E. coli* O157: H7 en la salsa de tomate, pero no en mostaza ó vinagre.

Es importante resaltar que la ácido adaptación además de incrementar la sobrevivencia microbiana en los alimentos de bajo pH, puede ofrecer protección cruzada contra diferentes factores tales como el calor, la salinidad, los conservadores y la irradiación de los alimentos (Buchanan y col., 1999; Cheville y col., 1996; Garren y col., 1998; Ryu y Beuchat, 1998). Además, en varios artículos se ha reportado que la ácido adaptación de *E. coli* O157: H7 se incrementa ó mantiene durante el almacenamiento en refrigeración (Cheng y Kaspar, 1998; Clavero y Beuchat, 1996; Faith y col., 1998; Lin y col., 1995; Miller y Kaspar, 1994). Por último, se creó que la ácido resistencia y/o la inducción de la tolerancia a la acidez, podrían permitir la sobrevivencia de los microorganismos patógenos a la acidez gástrica, incrementando con ello la virulencia microbiana, y en consecuencia causar enfermedad con mayor facilidad (Arnold y col., 1995; Diez-González y col., 1998; O'Driscoll y col., 1996; Gorden y Small, 1993).

Es evidente que la ácido resistencia y el desarrollo de la tolerancia a la acidez de los alimentos (como el pulque) por las bacterias patógenas, puede ser un factor importante en varias etapas durante la elaboración de los alimentos (de la granja a la mesa).

En consecuencia es importante que se comprenda cómo el medio ambiente y las condiciones que ocurren durante el procesamiento de los alimentos pueden afectar la ácido tolerancia de microorganismos patógenos como *E. coli* O157:H7. Esto a fin de elaborar mejores estrategias para prevenir o controlar crecimiento y la sobrevivencia de estos microorganismos en los alimentos.

VII. CONCLUSIONES

1. Los 4 microorganismos patógenos se multiplicaron discretamente en el aguamiel recolectado en la empresa cuando este se incubo tanto a 15° como a 22°C.
2. A excepción de *E. coli* O157:H7, los demás patógenos se inactivaron dentro de las primeras 24 horas de contacto con la “semilla” de pulque proporcionado por la empresa, cuando este se incubó a 22°C.
3. Todos los patógenos se multiplicaron en aguamiel fresco (recolectado inmediatamente después de haber sido raspado el maguey) cuando éste se almacenó a temperatura ambiente; sin embargo, solo *E. coli* O157:H7 sobrevivió el ciclo de fermentación del pulque.
4. *E. coli* O157:H7 sobrevivió al menos 48 horas en pulque mantenido tanto a 15° como 22°C.
5. *E. coli* O157:H7 sobrevivió al proceso de obtención de la “semilla” de pulque; en la “semilla” la concentración del patógeno fue de aproximadamente 2 Log UFC/mL.
6. El estudio sugiere que *E. coli* O157:H7 tiene potencial para desarrollar tolerancia a la acidez y al etanol del pulque.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams M. R. y Moss M. O., 1997. Microbiología de los alimentos. The Royal Society of Chemistry, 1995. Ed. Acribia, S. A., Apartado 466 50080, Zaragoza, España.
2. Aguirre, R. J. R., Charcas, S. H., y Flores, F. J. L. 2001. El Maguey Mezcalero Potosino. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología, Gobierno del Estado de San Luís Potosí, Instituto De Investigación de zonas desérticas, Universidad Autónoma de San Luís Potosí.
3. Archer D.L., y Kvenberg J.E., 1985. Incidence and cost of foodborne diarrheal disease in the United States J. Food. Prot. 48:10887-894.
4. Arnold, K. W., y C. W. Kaspar. 1995. Starvation- and stationary-phaseinduced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. 61:2037–2039.
5. Backstrand J. R., Allen L. H., Martinez E., y Pelto G. H. 2001. Maternal consumption of *pulque*, a traditional central Mexican alcoholic beverage: relationships to infant growth and development. Pub. Health Nutr. Cambridge University Press. 4:883-891.
6. Beckers H.J., 1986. Incidence of Foodborne disease in the Netherlands- Annual summary 1981. J. Food. Protect. 49:924-931.
7. Besser, R. E., S. M. Lett, J. T. Weber, M. P. Doyle, T. J. Barrett, J. W. Wells, and P. M. Griffin. 1993. An outbreak of diarrhea and haemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. JAMA 269:2217–2220.

8. Beuchat, L.R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce- J. Food Prot. 59:204-216.
9. Black, R.E., Brown, K.H. Y Beker, S., 1982. Longitudinal studies of infectious diseases and physical growth of children in rural Bangladesh. Incidence of diarrhea and association with known pathogens. Am. J. Epidemiol. 115:315-324.
10. Bryan F.L., 1978. Impact of foodborne diseases and methods of evaluating control program. J. Environ. Health. 40(6):315-323.
11. Buchanan, R. L., S. G. Edelson, and G. Boyd. 1999. Effects of pH and acid resistance on the radiation resistance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J. Food Prot. 62:219-228.
12. Buchanan, R.L. and Doyle, M.P.1997. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli* Food Technol. 51(10):69-76.
13. Burgeois, M., Mescue, J.F., Zucca., 1994. Microbiología alimentaria. Editorial Acribia. Zaragoza España.
14. Calicioglu, M., N. G. Faith, D. R. Buege, and J. B. Luchansky. 1997. Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented semidry low-temperature-cooked beef summer sausage. J. Food Prot. 60:1158–1162.
15. Cary, J.W., Linz, J.E., Bhatnagar, D. (Eds) 2000. Microbial Foodborne Diseases. Technomic P. Co. Inc. Lancaster, Pe. U.S.A.
16. Center for Disease Control. 1975. *Salmonella Typhimurium* outbreak traced to a commercial apple cider-New Jersey. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 25:87-88.

17. Center for Disease Control and Prevention. 1995a . Enhanced detection of sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infections—New Jersey, July 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 44:417-418.
18. Centers for Disease Control and Prevention. 1995b. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami—Washington and California, 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 44:157–160.
19. Cheng Hsin-Yi, Cheng-Chun C, Chou. 2001 Acid Adaptation and temperature effect on the survival of *E. coli* O157:H7 in acid fruit juice and lactic fermented milk product. *International J. Food Microbiol.* 70:189-195.
20. Cheng, C. M., and C. W. Kaspar. 1998. Growth and processing conditions affecting acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 15: 157–166.
21. Cheville, A. M., K. W. Arnold, C. Buchrieser, C.-M. Cheng, and C. W. Kaspar. 1996. RpoS regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1822–1824.
22. Clavero, M. S., and L. R. Beuchat. 1996. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity, and temperature and suitability of media for its recovery. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2735–2740.
23. Cronan, J.E. 1978. Molecular biology of bacterial membrane lipids. *Annu. Rev. Biochem.* 47:163-189.
24. Devriese L.A., 1984. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 215-220.

25. Diez-Gonzalez, F., T. R. Callaway, M. G. Kizoulis, and J. B. Russell. 1998. Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Science* 281:1666–1668.
26. Doyle, M.P. and Shoeni, J.L. 1984. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:855-856.
27. Faith, N. G., N. Parniere, T. Larson, T. D. Lorang, C. W. Kaspar, and J. B. Luchansky. 1998. Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in salami following conditioning of batter, fermentation and drying of sticks, and storage of slices. *J. Food Prot.* 61:377–382.
28. Farmer, J.J. and Davis, B.R. 1985. H-7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* 22:620-625.
29. Fernández E. E. *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. 2000. Editorial Universidad Autónoma de Querétaro. México.
30. Foster, J : E., and H.K. Hall. 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. *J. Bacteriol.* 172:771-778.
31. Foster, J : E., and H.K. Hall. 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium *J. Bacteriol.* 172:771-778.
32. Foster, J. W. 1991. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptative acid tolerance response. *J. Bacteriol.* 173(21):6896-6902.
33. Foster. 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3094–3100.

34. Frazier, W.C., Westhuff, D.C. 2000. Microbiología de los alimentos. 4ta edición. Edición española. Zaragoza España.
35. García M., y Galvan V. 1995. "Riqueza de las familias agavaceae y nolinaceae en México". Boletín de la Sociedad Botánica de México". 55: 7-24.
36. Garren, D. M., M. A. Harrison, and S. M. Russell. 1998. Acid tolerance and acid shock response of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates provide cross protection to sodium lactate and sodium chloride. J. Food Prot. 61:158–161.
37. Gentry, 1982. Agaves of Continental North America. Ed. Universidad Arizona, 1re edición, USA.
38. Glass, K. A., M. Loeffelholz, J. P. Ford, and M. P. Doyle. 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented dry sausage. Appl. Environ. Microbiol. 58:2513–2518.
39. Goodson, M., and R. J. Rowbury. 1989. Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sub-lethal acid pH value. Lett. Appl. Microbiol. 8:77-79.
40. Gordon, J., and P. L. C. Small. 1993. Acid resistance in enteric bacteria. Infect. Immun. 61:364-367.
41. Granados Sánchez Diódoro, 1999. "Los agaves en México", Universidad Autónoma Chapingo Primera reimpresión, México.

42. Griffin, P.M. 1995. Escherichia coli O157:H7 and other enterohemorrhagic Escherichia coli: 739-761. In: Infections of the Gastrointestinal Tract. Blaser, M.J., Smith, P.D., Ravdin, J.I., et al. (Eds.) Raven Press Ltd, N.Y.
43. Hatcher, W.S., Weihe, J.L., Splittstoesser, D.F., et al. 1992. Fruit Beverages: 953-960. In: Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F. (Eds). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Am. Pub. Health Assoc., Washington. DC.
44. Hengge-Aronis, R. 1993. Survival of hunger and stress: the role of rpoS in early stationary phase gene regulation in E. coli. Cell 72:165–168.
45. Hill, C., O’Driscoll, B., Booth, I., 1995. Acid adaptation and food poisoning microorganisms. Int. J. Microbiol. 28: 245,-254.
46. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., et al. 1994. Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. William and Wilkins Co., Baltimore.
47. International Association of Milk Food and Environmental Sanitarians. 1991. Procedures to Implement the Hazard Analysis Critical Control Point System. IAMFES. Iowa, USA.
48. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1996. Microorganisms in Foods. 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens. Blackie Acad. And Professional, London.
49. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1986. Microorganisms in Foods. 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications. 2nd Ed. Univ. Toronto Press, Toronto.

50. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1998. Microorganisms in food. 6. Microbial Ecology of Foods Commodities. Blackie Acad. And Profess. Press, London.
51. Jay, J.M. 2002. Microbiología moderna de los alimentos. 4ta. edición. Editorial Acriba SA. España.
52. Joklik, W.K., Willett, H.P., Amos, B.D. and Wilfert, C.M. (Eds). 1988. Zinsser Microbiology. 19th Ed. Appleton and Lange.
53. Kaspar, C.W., and M.L. Tamplin, 1993. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and Shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2425-2429.
54. Kauffmann, S.H.E. 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 11:129-163.
55. Khakhria, R., Duck, D. and Lior, H. 1990. Extended phage typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol. Infect.* 105:511-520.
56. Klima, R.A. y Monteville, T.J. 1995. The regulatory industrial responses to listeriosis in the U.S.A.: A paradigm for dealing with emerging foodborne pathogens. *Trends Food Sci. Technol.* 6:87-93.
57. Kroll, R. G., Patchett, R.A., 1992. Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 14: 224-227.
58. Lange, R., and R. Hengge-Aronis. 1991. Identification of a central regulator of stationary phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5:49-59.

59. Lee, I. S., J. L. Slonezewski, and J. W. Foster. 1994. A Low-pH. Inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Salmonella* Typhimurium. *J. Bacteriol.* 176. 1422-1426.
60. Leyer, G. J., L.-L. Wang, and E. A. Johnson. 1995a. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3752–3755. Lin, J., M. P. Smith, K. C. Chapin, H. S. Baik, G. N. Bennett, and J. W.
61. Leyer, G.J., Johnson, E.A., 1992. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. In cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2075-2080.
62. Leyer, G.J., Wang Lih-Ling and Jonson, E.A. 1995b. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acid foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(10):3752-3755.
63. Lin, J., I. S. Lee, J. Frey, J. L. Slonczewski, and J. W. Foster. 1995. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella* typhimurium, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177:4097–4104.
64. MacKanes, G.B. 1962. Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* 116:381-406.
65. Madden, J.M., 1992. Microbial Pathogens in fresh produce the regulatory perspective. *J. Food. Prot.* 55:821-823.
66. Martínez, M. 1979. Catalogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Primera edición, 3ra Reimpresión 1994, Fondo de cultura económica. México.

67. Massa, S., C. Altieri, V. Quaranta, and R. De Pace. 1997. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4°C. *Lett. Appl. Microbiol.* 24:347–350.
68. McCann, M. P., J. P. Kidwell, and A. Matin. 1991. The putative sigma factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173:4188–4194.
69. Miller, L.G., and C.W. Kaspar. 1994. *Escherichia Coli* O157:H7 Acid tolerance and survival in apple cider. *J. Food Prot.* 57:460-464.
70. Minor T.E., and Marth E.H., 1976. *Staphylococco* and their significance in foods. Elsevier scientific publishing company- PO box 211, Amsterdam,. 297p.
71. Monteoliva-Sanchez, M., Ferrer, M.R., Ramos-Cormenzana, A., et al. 1988. Cellular fatty acid composition of *Deleya halophila* effect of growth temperatura and salt concentration . *J. Gen. Microbiol.* 134:199-203.
72. Moreno,R., Morales, J.A. y Mora, R. 2004. Cambios físicos, químicos y sensoriales durante el almacenamiento de una bebida funcional con base en aguamiel. Departamento de Graduados en Alimentos. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N. Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición.
73. Morgan, D., C. P. Newman, D. N. Hutchinson, A. M. Walker, B. Rowe, and F. Majid. 1993. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with consumption of yogurt. *Epidemiol. Infect.* 111:181–187.
74. Mossel D.A.A., 1982. *Microbiology of Foods*, The University of Utrech, , 188 pages.

75. Nguyen, L. H., D. B. Jensen, N. E. Thompson, D. R. Gentry, and R. R. Burgess. 1993. In vitro functional characterization of overproduced *Escherichia coli* katF/rpoS gene product. J. Biochem. 32:11112–11117.
76. Nieto R. D. y Maecke M. 1948. Contribución al estudio bacteriológico del aguamiel y del pulque I *Lactobacillus patroniri* sp. Anales del Instituto de Biología. Tomo IX: 25-48. UNAM. México.
77. 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.
78. O'Driscoll, B., C. G. M. Gahan, and C. Hill. 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. Appl. Environ. Microbiol. 62:1693-1698.
79. Orozco, R.L. 1999. Algunos factores que afectan la inocuidad microbiana del queso Oaxaca durante su elaboración y almacenamiento. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
80. Ortiz de Montellano, Bernard. 1990. Aztec Medicine, Health and Nutrition. New Brunswick: Rutgers University Press, 1990, pg. 217.
81. Pontello, M., Sodano, L., Nastasi, A. 1998. A community based outbreak of salmonella enterica serotype Typhimurium associated with salami consumption in Northern Italy. Epidemiol. Infect. 120:209-214.
82. Ramirez L.A. 1963. Distribución de los Agaves en México. Anales del Instituto de Biología. vol.VII: 17-29. UNAM. México.

83. Ries, A.A., Zaza, S., Langkop, C.. 1990. A multistate outbreak of *salmonella* chester linked to imported cantaloupe. Prog. Abst. 30th Interscience Conf. Antimicrob. Agents Chemother., Am. Soc. Microbiology. Abst915.
84. Ruvalcaba M. J. 1983. El maguey manso historia y presente de Epazoyucan, Hgo. Universidad Autónoma Chapingo. México.
85. Ryu, J.-H., y Beuchat L. R. 1998. Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. Int. J. Food Microbiol. 45:185–193.
86. Rzedowski R. J, R G Calderón, 1990. Flora Fanerogámica del Valle México: Instituto de Ecología. Michoacán, México. 394 p.
87. SAGARPA. 12 de octubre del 2007 (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación). <http://www.siap.gob.mx/>
88. Schelch W.F., Laugne, P.M., Bortoluss R.A., Allen, A., Haldane, E.U., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nichols, E.S., Broome, C.U. 1983. Epidemic listeriosis. Evidence for transmisión by food. N. Engl. J. Med. 308(4):203-206.
89. Seeliger, H.P.R. and Jones, D. 1986. *Listeria* spp.: 1235-1245. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Vol. 2. 9th Ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (Eds.). William and Wilkins, Baltimore.
90. Semanchek, J. J., and D. A. Golden. 1996. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during fermentation of apple cider. J. Food Prot. 59:1256–1259.
91. Silliken, J.H., 1986, *Listeria monocytogenes*. Food Technol. 40 (8): 24-25.

92. Slonezewski, J. L., T. N. Gonzalez, F. M. Bartholomew, and N. J. Holt. 1987. Mu d. directed LacZ fusions regulated by low pH in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 169:3001-3006.
93. Small, O., D. Blankenhorn, D. Welty, E. Zinder, and J. L. Slonezewski. 1994. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Sigella flexneri*: role of rpoS and growth pH. J. Bacteriol. 176: 1729-1737.
94. Tauxe, R.T., 1991. *Salmonella*: a postmodern pathogen. J. Food Prot. 54:563-568.
95. Thompson, J.S., Hodge, D.S. and Borczyk, A.A. 1990. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. J. Clin. Microbiol. 28:2165-2168.
96. Tsai, Y.-W., and S. C. Ingham. 1997. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella spp.* in acidic condiments. J. Food Prot. 60:751–755.
97. Watkin, J. and Sleath, K.P. 1981. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge, and river waters. J. Appl. Bacteriol. 50:1-9.
98. Weagant, S.D., M.L. Bryant, and D.H. Park. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. J. Food Prot. 57:629-631.
99. Zhao, T., and M. P. Doyle. 1994. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. J. Food Prot. 57:780–783.
100. Zhao, T., M.P. Doyle and R.E. Besser. 1993. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. Appl. Environ. Microbiol. 59:2526-2530