



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

---

---

**CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS**

**FRECUENCIA Y COMPORTAMIENTO DE  
MICROORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE Y  
*Salmonella* EN JUGO DE BETABEL**

**TESIS**

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

**LUIS ALBERTO RAMÍREZ TEJEDA**

**ASESOR: DR. JAVIER CASTRO ROSAS**

<b>INDICE</b>	<b>Pág.</b>
Índice de tablas.....	i
Índice de diagramas.....	ii
Índice de figuras.....	iii
Abreviaturas.....	iv
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II.- ANTECEDENTES.....	4
2.1 Enfermedades microbianas transmitidas por alimentos (ETAs).....	4
2.2 Microorganismos indicadores de higiene.....	9
2.2.1 Coliformes.....	11
2.2.2 Significado de coliformes en los alimentos.....	11
2.2.3 Significado de coliformes fecales en los alimentos.....	14
2.3 <i>Escherichia coli</i> .....	15
2.3.1 Características generales.....	15
2.3.2 Grupos patógenos de <i>E. coli</i> .....	16
2.3.3 <i>Escherichia coli</i> entopatógena (ECEP).....	17
2.3.4 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ECET).....	18
2.3.5 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (ECEI).....	20
2.4 <i>Salmonella</i> .....	21
2.4.1 Características generales.....	22
2.4.2 Hábitat y comportamiento en los alimentos.....	22
2.5 Microbiología de jugos.....	24

2.5.1 Jugos de frutas y verduras.....	24
2.6 Betabel.....	27
2.6.1 Características y producción.....	27
II.- JUSTIFICACIÓN.....	30
IV.- OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivo general.....	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
V.- METODOLOGÍA.....	32
5.1 Frecuencia de OC, CF, <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> en jugo de betabel.....	34
5.1.1 Recolección de muestras.....	34
5.1.2 Análisis microbiológico.....	34
5.1.3 Recuento de organismos coliformes.....	34
5.1.4 Recuento de coliformes fecales y <i>E. coli</i> .....	37
5.1.5 Cuantificación de <i>E. coli</i> .....	39
5.1.6 Determinación de <i>Salmonella</i> .....	40
5.2 Comportamiento de tres grupos patógenos de <i>E. coli</i> Rif (+) ( ECEP, ECEI, ECET) y <i>Salmonella</i> en jugo de betabel almacenado a temperatura ambiente y de refrigeración.....	42
VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
VII.- CONCLUSIONES.....	63
VIII.- SUGERENCIAS.....	65
IX.- REFERENCIAS.....	66
X.- ANEXO.....	79

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Pág.</b>
1.- Jugos de frutas relacionados con brotes de ETAs de origen microbiano....	7
2.- Criterios propuestos para coliformes/ <i>E. coli</i> .....	13
3.- Composición nutritiva de 100 g de betabel.....	28
4.- Producción anual de betabel.....	29
5.- Frecuencia y positividad de los grupos microbianos en jugo de betabel....	45
6.- Valores mínimos, medianas y máximos en jugo de betabel.....	46

## ÍNDICE DE DIAGRAMAS

<b>Diagrama</b>	<b>Pág.</b>
1.- Preparación de la muestra para su análisis microbiológico.....	35
2.- Cuantificación de organismos coliformes.....	36
3.- Cuantificación de coliformes fecales y <i>E. coli</i> .....	38
4.- Determinación de <i>Salmonella</i> .....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Pág.</b>
1.- Principales microorganismos patógenos involucrados en brotes por consumo de frutas y vegetales en USA de (1988-1998).....	8
.	
2.- Comportamiento de tres grupos patógenos de <i>E. coli</i> en jugo de betabel a temperatura ambiente ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).....	52
3.- Comportamiento de <i>Salmonella</i> en jugo de betabel a temperatura ambiente ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).....	54
4.- Comportamiento de tres grupos patógenos de <i>E. coli</i> en jugo de betabel a temperatura de refrigeración ( $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).....	57
5.- Comportamiento de <i>Salmonella</i> en jugo de betabel a temperatura de refrigeración ( $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).....	59

## I.- INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) ocupan un lugar preponderante como causa de mortalidad (American Public Health Association, 1985) en todo el mundo. Una baja sanidad del medio, aunado a la desnutrición, son los principales factores a la que se les atribuye. En todos los grupos de población, las enfermedades diarreicas son considerables y constituyen un problema de salud pública, no solo en países en vías de desarrollo, sino también en países desarrollados (Fernández, 2000). Una proporción importante de estos cuadros diarreicos, ciertamente se asocian al consumo de alimentos contaminados con agentes patógenos de naturaleza microbiana.

En México, se ha estimado que el número de casos de enfermedades, de etiología microbiana, asociadas al consumo de los alimentos (ETAs) es de aproximadamente 300 millones de casos (Fernández, 2000).

*Salmonella* es uno de los microorganismos que con mayor frecuencia se asocia con brotes causados por el consumo de alimentos. Dentro de estos, los productos cárnicos, huevos y productos lácteos son las fuentes más comúnmente implicadas (Harris y col., 2003).

Sin embargo, en los últimos años las frutas frescas, verduras y jugos de vegetales se han visto implicados, en grado creciente, con brotes asociados a su consumo (FDA, 2000). Muchas frutas y verduras se preparan en forma de jugo para consumo inmediato, éstos son elaborados en Industrias, hogares, servicios de alimentos y mercados públicos, (La mayoría de estos jugos son consumidos crudos) Los riesgos implicados en su consumo son esencialmente distintos. En la preparación del jugo fresco por lo común se incide en

prácticas deficientes de higiene que propician la contaminación con microorganismos patógenos (Fernández, 2000).

El consumo de jugos no pasteurizados se ha asociado a un gran número de brotes de enfermedades por microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Listeria* y *Escherichia coli* O157:H7 (APHA, 1985).

Es importante destacar que el riesgo de enfermar por el consumo de jugos no pasteurizados, no sólo está en función de la presencia del microorganismo en el alimento, sino también en la capacidad que tiene para sobrevivir y multiplicarse en el mismo. Cualquier factor que prolongue la sobrevivencia o incremente los niveles del patógeno en el alimento, aumenta el riesgo para el consumidor (Fernández, 2000).

En nuestro país el jugo de betabel es una bebida muy popular entre varios sectores de la población. Este se consume crudo, ya sea solo o mezclado con otros vegetales. El jugo, de color púrpura muy característico, se obtiene a partir de la raíz de la planta. Debido a la naturaleza de su cultivo, en la raíz de esta hortaliza podría existir un riesgo a la salud por la presencia de microorganismos patógenos. Con frecuencia, el tubérculo no recibe un tratamiento antimicrobiano que asegure la eliminación de los microorganismos potencialmente presentes. Además, en atención a las malas prácticas de higiene que en general se aplican en la preparación de los jugos, tanto en los que se comercializan en la vía pública como en los de mercados e incluso en los restaurantes bien establecidos y con higiene adecuada, es posible la contaminación del jugo con patógenos intestinales.



Para producir alimentos seguros y de bajo riesgo, es necesario contar con información que permita elaborar programas destinados a reducir los riesgos microbianos en el consumo de jugos no pasteurizados.

En México, la información sobre la incidencia de microorganismos patógenos y sobrevivencia en jugos es limitada; más aún, no existe información sobre la frecuencia y comportamiento de microorganismos patógenos en jugo de betabel.

Por tal motivo, en este trabajo se investigó la frecuencia y comportamiento de algunos microorganismos indicadores de higiene y *Salmonella* en jugo de betabel, provenientes de los mercados públicos y vendedores ambulantes de la ciudad de Pachuca, Hidalgo.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Enfermedades microbianas transmitidas por alimentos (ETAs)

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) constituyen un problema de salud común en todo el mundo (CDC, 1991).

Las ETAs son el resultado de la falta de inocuidad de los alimentos, La cual se traduce en un alto número de brotes de intoxicación alimentaria principalmente de origen microbiano. Por ejemplo, en los EUA el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) calcula que 76 millones de personas sufren de enfermedades transmitidas por alimentos cada año, representando 325,000 casos de hospitalización y más de 5,000 muertes (Archer y Kvenberg, 1985). En los países en vías de desarrollo, el problema es más acentuado; se ha estimado que en México el número de casos asciende a 300 millones por año (Fernández, 2000).

Las ETAs pueden clasificarse de acuerdo con diferentes criterios. Ciertas características ecológicas, genéticas y fisiológicas de los microorganismos patógenos determinan rasgos epidemiológicos singulares de los padecimientos a que dan lugar. (Fernández, 2000).

Las enfermedades causadas exclusivamente por el consumo de alimentos contaminados pueden acontecer a través de tres mecanismos principales, a) infeccioso, b) toxigénico y c) toxiinfeccioso (Cliver, 1990; Fernández, 1997):

a) En el caso del mecanismo infeccioso, el microorganismo tiene que librar una serie de barreras del sistema digestivo, como la acidez gástrica, la acción de las enzimas digestivas e implantarse en las células de la mucosa intestinal. Esto implica evadir los sistemas de defensa humorales y celulares del organismo como la acción de anticuerpos, fagocitos, linfocitos, células K, así como la motilidad intestinal y su microflora. Una vez implantado, dependiendo del microorganismo, puede continuar un proceso invasivo. Este proceso se observa en microorganismos que penetran las paredes del intestino y se multiplican dentro de las células del tejido o tejidos subyacentes; es frecuente la ulceración. Algunos microorganismos como *S. typhi* o *Entamoeba histolytica*, son capaces de llegar hasta los capilares sanguíneos y diseminarse a diversos órganos y tejidos. Otros como *Shigella* o *Yersinia enterocolitica* raramente se diseminan. Como resultado de la necrosis, se genera un cuadro diarreico ya sea por la destrucción de las células intestinales o por producción de toxinas. Los microorganismos no invasivos como *Giardia lamblia* son incapaces de penetrar las paredes intestinales; se multiplican en el lumen intestinal y provocan un cuadro diarreico.

b) En el mecanismo toxigénico, el efecto patógeno es producido por una o varias toxinas que sintetiza y libera el microorganismo en el alimento. Son de naturaleza proteica y resultan del metabolismo secundario de estas bacterias. Ingresan al individuo a través de los alimentos y según su naturaleza, actúan a nivel de las células de la mucosa intestinal provocando un cuadro diarreico (toxina estafilocócica), ó se absorben y diseminan hacia órganos como el hígado

(aflatoxinas), o el sistema nervioso (botulismo), en donde finalmente ejercerán su efecto. Dentro de esta clasificación podemos encontrar bacterias como *Clostridium botulinum* y *Staphylococcus aureus*, u hongos como *Aspergillus parasiticus* y *A. niger*.

c) En el mecanismo toxiinfeccioso, los microorganismos al igual que los infecciosos deben de multiplicarse en el intestino, pero además sintetizar y liberar toxinas que son las responsables de las manifestaciones clínicas. Estas toxinas, como las de *Vibrio cholerae* o *Bacillus cereus*, actúan sobre las células de la mucosa intestinal provocando la salida de iones (cloruro, sodio, bicarbonatos) y agua; característico del síndrome diarreico.

Estas ETAs se producen generalmente por la contaminación de los alimentos por los agentes responsables, seguida de un abuso de temperatura de conservación, que trae como consecuencia la multiplicación de los microorganismos (Fernández, 2000).

Desde 1990 el consumo mundial de frutas y vegetales se ha incrementado, a la par, los casos de ETAs asociándose a estos productos también se han incrementado (Tauxe y col., 1997).

Los jugos crudos de frutas y vegetales son un vehículo potencial para la transmisión de microorganismos patógenos (PHLS, 1996). Las verduras o frutas pueden contaminarse en cualquiera de las etapas de producción: cosecha, transporte, proceso, distribución, venta y preparación del alimento por vendedores de la calle, e incluso en el hogar (Fernández, 2000).

El principal sitio de contaminación sin embargo, puede estar ocurriendo en el campo (Hedberg y col., 1994). Esto debido al uso de las aguas residuales empleadas para irrigar los cultivos y al uso de estiércol no tratado como nutriente para el cultivo de frutas y vegetales, originando con ellos la contaminación de los cultivos con bacterias, virus, hongos o parásitos (Cliver, 1997; Speer, 1997).

En la siguiente tabla se mencionan algunos jugos implicados en enfermedades transmitidas de origen microbiano (WHO, 1998).

**Tabla 1.** Jugos de frutas relacionados con brotes de ETAs de origen microbiano.

<b>PRODUCTO</b>	<b>ORÍGEN DEL JUGO</b>	<b>PAÍS DONDE SE PRESENTÓ EL BROTE</b>	<b>ORGANISMO CAUSANTE DEL BROTE</b>	<b>REFERENCIA</b>
Jugo de manzana	EUA	EUA	<i>E. coli</i> 0157:H7	(Tauxe y col.,1997)
Jugo de manzana	EUA	EUA	<i>S. typhimorium</i>	(Tauxe y col.,1997)
Jugo de manzana	EUA	EUA	<i>Criptosporidium spp.</i>	(Tauxe y col.,1997)
Jugo de naranja	No reportado	EUA	<i>S. hartford</i>	(Tauxe y col.,1997)
Jugo de naranja	No reportado	EUA	<i>S. anatum</i>	(FDA, 2000)
Jugo de naranja	No reportado	EUA	<i>S. typhi</i>	(FDA, 2000)
Jugo de naranja	No reportado	EUA	<i>S. muenchen</i>	(FDA, 2000)
Jugo de naranja	No reportado	EUA	<i>S. anatum</i>	(FDA, 2000)
Jugo de naranja	No reportado	EUA	<i>Bacillus cereus</i>	(FDA, 2000)

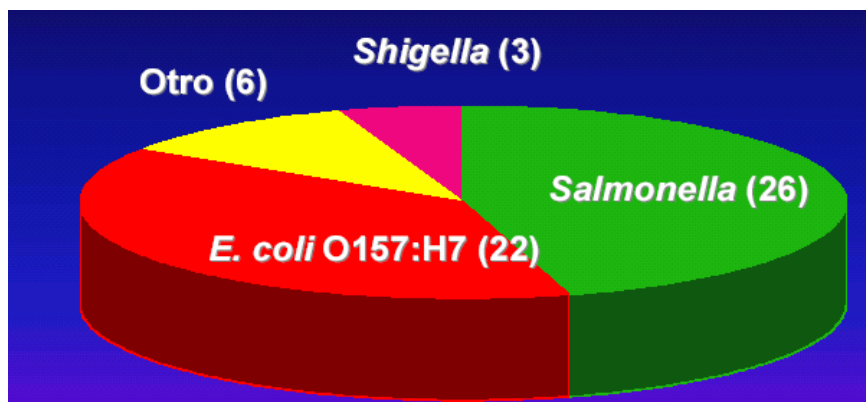
Las ETAs, causadas por frutas y vegetales contaminados son frecuentes en varios países; en algunas áreas causan una proporción importante de enfermedad (FDA, 2000). Sin embargo, debido a la carencia de investigación y de vigilancia de las ETAs; en la mayoría de estos países, generalmente los brotes pasan desapercibidos (Noguera, 2005).

En el periodo 1995-1996, solamente el 2 % de los brotes de ETAs en América latina fueron relacionados con las frutas y vegetales (Moreno, 1982; CDC, 1991).

De acuerdo con el CDC en el periodo entre 1973-1987 y 1988-1992, el agente etiológico asociado a más de un 50 % de enfermedades por consumo de jugos en los Estados Unidos fue *Salmonella*, ligada a jugos de manzana y de naranja no pasteurizados y *E. coli* 0157:H7 asociada con jugo de manzana (Buck y col., 2003).

En la siguiente figura se describen los principales microorganismos patógenos involucrados en brotes por consumo de frutas y vegetales en USA.

**Fig. 1.** Principales microorganismos patógenos involucrados en brotes por consumo de frutas y vegetales en USA de 1988-1998 (CDC, 1991).



## 2.2 Microorganismos indicadores de higiene

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

Estos microorganismos indicadores de higiene pueden ser empleados para reflejar la calidad microbiana de los alimentos con respecto a la durabilidad del producto o su inocuidad como consecuencia de la presencia de patógenos transmitidos por alimentos (Jay, 2000).

Los microorganismos tienen acceso a los alimentos a través de una diversidad de fuentes y mecanismos. En ellos, pueden simplemente sobrevivir sin dar lugar a modificaciones aparentes en sus características sensoriales (Fernández, 2000).

La diversidad permite agruparlos en función de la actividad o potencialidad que exhiben de manera más prominente en los alimentos. Eventualmente algunos se encuadran en más de un grupo. Por ejemplo, ciertos patógenos tienen valor como indicadores (*S. aureus*, *E. coli*); los coliformes funcionan como indicadores de algunos alimentos y son deterioradores en otros (Fernández, 2000).

Teóricamente, un indicador de la inocuidad de los alimentos debe satisfacer los criterios siguientes (Fernández, 2000):

- Ser detectable con facilidad y con rapidez
- Ser fácilmente diferenciable de otros representantes de la flora microbiana del alimento

- Tener unos antecedentes de asociación constante con el patógeno cuya presencia tiene que indicar
- Estar presente siempre que esté presente el patógeno de interés
- Ser un organismo cuyos números, teóricamente, se deben correlacionar con los del patógeno de interés
- Tener necesidades de crecimiento y una velocidad de crecimiento semejante a la del patógeno de interés.
- Tener una rapidez de desaparición que, por lo menos, sea paralela a la del patógeno y que teóricamente persista durante algún tiempo más que el patógeno de interés.

Estos criterios se aplican a la mayoría, si no a todos los alimentos que pueden servir como vehículo de microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos. En el uso histórico de los indicadores de higiene, se supuso que los patógenos de interés son de origen intestinal, resultantes de contaminación fecal directa o indirecta. Así, estos indicadores de higiene fueron usados en tiempos pasados para detectar la contaminación fecal de las aguas y con ello la presencia posible de patógenos intestinales. El primer indicador fecal fue *Escherichia coli* cuando se aplicó el concepto de indicadores fecales a los alimentos (Jay, 2000).

La presencia/ausencia de microorganismos se usa para evaluar la higiene de los alimentos. Si un indicador de inocuidad está ausente, se considera que el producto es inocuo con respecto al peligro para el cual se usa el indicador. Por otra parte, un producto



puede contener cantidades extremadamente bajas de un indicador de inocuidad y sin embargo no suponer un peligro (Jay, 2000).

### **2.2.1 Coliformes**

El término coliforme no tiene valor taxonómico; sin embargo, representa un grupo de especies de manera general como: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacte*, *Aeromonas* y *Serratia*. Las razones de agruparlos juntos son las muchas características que tiene en común (Bibek, 2001).

Los organismos coliformes (OC) son bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que producen gas y ácido a partir de lactosa dentro de las 24-48 horas de incubación a 35°C (Fernández, 1981). De igual modo que otras bacterias Gram-negativas, los coliformes crecen bien en una gran cantidad de medios y en muchos alimentos. Se ha observado que pueden crecer a temperaturas tan bajas como -2°C y tan elevadas como 50°C y a intervalos de pH de 4.4-9.0. A diferencia de la mayoría de las demás bacterias son capaces de fermentar lactosa con producción de gas, y esta característica es suficiente para realizar determinaciones presuntivas (Griffin y Stuart, 1940).

### **2.2.2 Significado de coliformes en los alimentos**

Los organismos coliformes son el grupo indicador con mayor tradición en la microbiología sanitaria. Su presencia en los alimentos resulta de la exposición al medio ambiente (lo que equivale a decir, a los desperdicios orgánicos, cadáveres, desechos animales, excretas humanas, tierra, fauna nociva, aguas negras, residuos en utensilios y

equipo); su hallazgo en los alimentos no involucra necesariamente a la materia fecal (Fernández, 2000).

Números elevados de coliformes en los alimentos son inaceptables, no obstante, es prácticamente imposible eliminarlos todos, tanto de los alimentos frescos como de los congelados. En alimentos de riesgo se permite una pequeña cantidad de coliformes en cifras que varían desde 1 hasta no más de 100 UFC/g o 100 UFC/mL. Estos criterios reflejan su factibilidad como parámetros de seguridad.

En la tabla 2. Se relacionan algunos productos para los cuales los criterios para coliformes han sido recomendados por la Comisión Internacional para las Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos (ICMSF). En la tabla la letra “n” significa el número de muestras que se deben analizar, la “m” el límite inferior o deseable y la “M” el límite superior; la letra “c” indica el número de muestras de “n” que pueden estar por arriba del límite “m” pero por debajo de “M”. Así por ejemplo, para el primer alimento de la tabla, se deben analizar 5 muestras de leche desecada, 4 de ellas no deben tener más de 10 UFC /g y se tolera que 1 contenga una concentración superior de 10, pero no mayor a 100 UFC.

En algunos casos la presencia de coliformes no guarda relación con las condiciones sanitarias bajo las cuales un alimento ha sido elaborado. Un ejemplo notorio es el jugo de naranja procesado. Pueden extremarse las condiciones de sanidad para su obtención, incluido el lavado y desinfección prolongado de la fruta, previo a la extracción del jugo, sin que se logre en todos los casos un producto exento de coliformes.

**Tabla 2.** Criterios propuestos para coliformes/*E. coli* (ICMSF, 1986).

Indicador	Productos	Plan	n	c	m	M
		de clase				
1.coliformes:	Leche desecada	3	5	1	10	10 <sup>2</sup>
2.coliformes:	Ovoproductos líquidos pasteurizados, congelados y desecados	3	5	2	10	10 <sup>3</sup>
3. coliformes:	Alimentos para bebés, para niños, y algunos alimentos dietéticos	3	5	2	10	10 <sup>2</sup>
4. coliformes:	Productos desecados, e instantáneos que requieren reconstrucción	3	5	1	10	10 <sup>2</sup>
5. coliformes:	Productos desecados que requieren desde calentamiento hasta ebullición	3	5	3	10	10 <sup>2</sup>
6. coliformes:	Carne de cangrejo cocida	3	5	2	100	5.0
7. coliformes:	Camarones cocidos listos para comer	3	5	2	100	10 <sup>3</sup>
8. <i>E. coli</i> :	Pescado fresco, congelado, ahumado en frío; crustáceos cocidos congelados	3	5	3	11	500
9. <i>E. coli</i> :	Pescado precocinado empanado; crustáceos cocidos congelados	3	5	2	11	500
10. <i>E. coli</i> :	Carne de cangrejo cocida, enfriada congelada	3	5	1	1	500
11. <i>E. coli</i> :	Hortalizas/frutas, pH > 4.5	3	5	2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
12. <i>E. coli</i> :	Moluscos bivalvos frescos/congelados	3	5	0	16	---
13. <i>E. coli</i> :	Agua embotellada	3	5	0	0	---

**n**= numero de muestras, **c**= numero de muestras por arriba de “m” pero por debajo de “M”, **m**= límite inferior, **M** = límite superior

*Nota:* los puntos 6 y 7 son recomendaciones de la National Advisory Commit on the Microbiological Criteria for the foods, USDA/FDA, enero de 1990. Y los criterios indicados son para la integridad del tratamiento. Todos los demás puntos son de la ICMSF.

Comúnmente los coliformes son nativos de la naranja y se encuentran colonizándola; la gran irregularidad de la cáscara de la naranja favorece la colonización en sitios en los cuales el lavado-desinfección (que resulta adecuado en otros frutos o verduras) de la naranja no logra disminuir la concentración de los coliformes debido a que el agua y la solución desinfectante no tienen acceso a los microorganismos alojados en tales irregularidades de la cáscara. En consecuencia, aun después del tratamiento de desinfección la concentración de coliformes se mantiene casi constante. Al exprimir la naranja para obtener el jugo, gran cantidad de coliformes son expulsados de las irregularidades depositándose en el jugo (Fernández, 1981). Debido a ello, la presencia de estas bacterias en el jugo de naranja procesado se ha rechazado sistemáticamente como un indicador de su calidad sanitaria (Fernández, 2000).

### **2.2.3 Significado de coliformes fecales en los alimentos**

Los coliformes fecales se identifican con el resto de los coliformes en lo que se refiere a la fermentación de lactosa a temperaturas de 44-45°C, su resistencia al medio ambiente, agentes químicos y factores que favorecen o impiden su desarrollo. El principio que sustenta la idea de utilizar este grupo como indicador más confiable que los coliformes totales, se apoya en la observación de que un porcentaje más elevado de coliformes aislados de materia fecal humana y de animales de sangre caliente fermenta la lactosa a estas temperaturas, con respecto a los coliformes provenientes de fuentes no fecales (Fernández, 2000).

Sin embargo, la presencia de coliformes fecales en algunos alimentos tiene un valor más meritorio como un grupo marcador de patógenos intestinales, tal es el caso en los

moluscos y las aguas en las que prosperan, debido a que la presencia de patógenos como *Salmonella* en estos productos tiene una mayor correlación con el contenido de coliformes fecales, ya que la presencia de coliformes fecales en bivalvos, ostiones y en aguas de esteros parece seguir un patrón con la presencia de microorganismos patógenos (Fernández, 2000).

## **2.3 *Escherichia coli***

### **2.3.1 Características generales**

*E. coli* pertenece al grupo de los coliformes fecales. Su hábitat natural es el contenido intestinal del hombre y animales superiores. El microorganismo se dispersa en el medio ambiente, y según el sustrato en el cual finalmente se deposite, tiene tres perspectivas: sobrevive, desarrolla o muere (Fernández, 1981).

*E. coli* coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera de flora normal. Las distintas cepas de *E. coli* suelen ser resistentes a las temperaturas extremas y a los ácidos débiles. El pH mínimo de crecimiento se cree que es 4.5 pero algunas cepas poseen la capacidad de sobrevivir en productos de bajo pH como mayonesa, yogurt y jugos de frutas y vegetales (Rodríguez, 2002).

Las bacterias de *E. coli* son representantes de la familia *Enterobacteriaceae*. Como tales, los organismos son bacilos cortos Gram-negativos, catalasa positivos, oxidasa negativos y anaerobios facultativos. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa aunque algunas cepas son fermentadoras lentas de este azúcar y algunas son aerogénicas (Ramis, 1996). Típicamente, la especie es rojo de metilo positiva y Vogues-Proskawer negativa y

no crece en el medio de citrato de Simmons, produciendo indol la mayoría de las cepas (IMViC + + - -) (Levita y col., 1979; Ramis, 1996).

La mayoría de las cepas no son patógenas. Algunas sin embargo, causan infecciones en el hombre. En los años 1940 se señaló por primera vez como causa de brotes intrahospitalarios de diarrea en niños (Rodríguez, 2002).

El hallazgo de *E. coli* en los alimentos es sugestiva de contaminación fecal reciente considerando que en ausencia de materia fecal no suele existir en estos productos y que muy pobremente, si acaso, se multiplica en ellos, más bien tiende a morir (Fernández, 2000).

En la leche la situación es distinta. Esta bacteria eventualmente existe en residuos de suciedad sobre el equipo mal sanitizado usado contiene la leche ya tratada térmicamente. Aun puede multiplicarse si el nivel de humedad se lo permite. La leche al contacto con esa suciedad se expondrá permanentemente a la contaminación por el germen. Si tal situación se mantiene por días, el producto exhibirá con regularidad su presencia, ocurrirá entonces la situación de leche pasteurizada con elevado contenido de *E.coli*. Por tal motivo su presencia debe alertar al responsable de calidad de tomar acciones enérgicas de control. Con todo es el indicador más confiable de contaminación fecal en alimentos, especialmente aquellos que han recibido un tratamiento antimicrobiano severo (Fernández, 2000).

### **2.3.2 Grupos patógenos de *E. coli***

Hay descritos seis grupos de *E.coli* patógena (Rodríguez, 2002), los cuales se clasifican en base a sus características de virulencia, mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos y características de antígenos. Señalando los siguientes grupos:

enterotoxigénica (ECET), enterohemorrágica (ECEH), enteropatógena (ECEP), enteroinvasiva (ECEI), enteroagregativa (ECEA) y de adherencia difusa (ECAD) (Doyle y col., 1997).

Una cualidad elemental pero sobresaliente en la diferenciación de las cepas patógenas de *E. coli* con respecto a las no patógenas es la limitada capacidad de fermentar la lactosa.

Ciertos perfiles serológicos de *E. coli* se encuentran asociados con formas de infección bien definidas. Se conocen cuadros diarréicos severos en animales causados por serovares de *E. coli* que son diferentes de los asociados con los humanos, y parecen tener cierta especificidad de huésped (Fernández, 2000).

### **2.3.3 *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP)**

*Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad (Rodríguez, 2002). Las cepas de (ECEP) son la causa principal de diarrea en los países pobres, y llevan a la muerte de cerca de un millón de niños por año (Rodríguez, 2002).

ECEP afecta especialmente a niños menores de dos años y dado que la dosis infectante estimada para esta edad es reducida (aunque no es conocida con precisión) se transmite habitualmente por vía fecal-oral, a través de manos contaminadas, fomites, alimentos, etc. (Costin y col., 1964; Viljanen y col., 1990).

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

El cuadro clínico que produce ECEP se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mal absorción (Rodríguez, 2002).

Las pruebas sobre el potencial patógeno de *E. coli* enteropatógena provienen de estudios con voluntarios humanos y animales de laboratorio. Un componente importante es la adhesión a las células de la mucosa intestinal mediada por un plásmido, a la que se asocia la producción de una toxina similar a la colérica, incluso una endotoxina que interfiere en procesos metabólicos de absorción celular (Robins-Browne, 1987). Las lesiones hispatológicas que provoca son similares en los diferentes serogrupos, pero distintas de las causadas por la ECEI y la ECET (Fernández, 2000).

El lavado escrupuloso de las manos acompañado de desinfección completa es una medida primaria de prevención, desde luego, la protección de fuentes de agua contra la contaminación por materia fecal directa o descargas de aguas negras, así como la desinfección sistemática del agua a base de cloro o un agente germicida igualmente efectivo, son también medidas obligadas de prevención (Fernández, 2000).

#### **2.3.4 *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET)**

*Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) es un agente que provoca diarrea aguda en niños de regiones pobres, y también de enfermedad esporádica o epidémica de origen alimentario (Svennerholm y Lindbland, 1985). Las ECET son importantes en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis



meses de vida. La frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno de *E.coli* en niños con diarrea es de 10 a 30% (Rodríguez, 2002).

ECET se aloja sobre las células epiteliales del intestino delgado por medio de fimbrias proteicas de diversa composición antigénica y estructural y allí produce sus toxinas. En niños de edad escolar y adultos puede ser asintomático y poco frecuente de producir la diarrea del viajero, como los microbiólogos del hemisferio norte le llaman (Rodríguez, 2002).

La enfermedad tiene un periodo de incubación de 14 a 50 h el cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presenta fiebre y vómito. La diarrea producida por ECET puede ser leve, breve y autolimitada pero también puede ser grave. Las cepas de ECET suelen corresponder a diversos serogrupos de *E. coli* O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O115, O128, O139, O148, O159 y O167; donde, la contaminación fecal de agua y alimentos es la principal fuente de infección, siendo la dosis infectiva de  $10^8$  UFC (Rodríguez, 2002).

En nuestro país, ECET es el segundo grupo de *E. coli* que sigue en frecuencia a ECEP como agente de diarrea aguda en los niños (Svennerholm y col, 1985). Las infecciones por esta bacteria confieren inmunidad, según se demostró en voluntarios humanos. Levita y col. (1979) sugieren que anticuerpos locales contra los factores de adhesión del germen podrían proteger el proceso infeccioso en las células epiteliales del intestino delgado proximal (Fernández, 2000).

### 2.3.5 *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI)

Este grupo especialmente, demuestra semejanzas bioquímicas y posee antígenos que comparte con *Shigella*. Una proporción elevada de cepas de ECEI son anaerogénicas y fermentan la lactosa dentro de 48 h. (Fernández, 2000).

Las cepas de ECEI pueden invadir las células epiteliales del colon, proliferar dentro de ellas y destruirlas, el mecanismo de patogenicidad de ECEI es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posteriormente la multiplicación de ECEI dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes (Rodríguez, 2002).

El proceso conduce a una necrosis con heces fluidas, sanguinolentas y cargadas de moco. Aparte de la diarrea, la persona afectada puede presentar fiebre y tenesmo, con un cuadro muy similar al de la disentería bacilar. Ocasionalmente aparece vómito. También se observan formas moderadas del padecimiento similares a las correspondientes de la shigelosis causada por *Shigella sonnei*.

El periodo de incubación en los brotes es de 2 a 48 horas con mediana de 18 horas, la diferencia de la virulencia entre las cepas de *E. coli* enteroinvasiva y *Shigella*, se aprecia en la dosis infectante de una y otra: mientras la primera requiere millones de células viables, en la segunda suelen ser suficientes menos de 100 (Fernández, 2000). Resulta interesante señalar, además, que *E. coli* enteroinvasiva como *Shigella* es inmóvil (Fernández, 2000).

## 2.4 *Salmonella*

El género *Salmonella* es uno de los más extensamente estudiados entre los patógenos que pueden ser aislados de los alimentos. El nombre dado a este microorganismo fue introducido por Lignieres en 1900 en honor al doctor Salmon, co-descubridor del microorganismo (Fernández, 2000).

El esquema de antígenos para clasificar *Salmonella* reconoce más de 2300 serovares, en el cual sólo 200 son asociados a enfermedades transmitidas por alimentos (Di'Aoust, 1997).

Desde el punto de vista epidemiológico (WHO, 1988) *Salmonella* se puede clasificar en tres grupos:

1. Las que infectan únicamente a las personas: incluyen *S. tiphy* y *S. paratiphy* A y C. A este grupo pertenecen los agentes causantes de las más graves de las enfermedades producidas por *Salmonella*: las fiebres tifoideas y paratifoideas.
2. Las serovariedades adaptadas a hospedadores, algunas de ellas patógenas para el hombre y que pueden ser transmitidas a través de alimentos, especialmente a partir de carnes.
3. Serovariedades inadaptadas, patógenas para las personas y para otras especies animales. Incluyen la mayoría de las serovariedades.

Las salmonelas se han aislado de muchos tipos de frutas y de vegetales crudos (Beuchat, 1996). Algunos casos severos de salmonelosis se han asociado al consumo de frutas frescas, verduras e incluso con el consumo de jugos no pasteurizados. En 1979 y 1991, algunos brotes causados por *Salmonella* fueron ligadas al consumo de sandía

(Blostein, 1993; CDC, 1979). En 1990 melones del sur de México fueron asociados a infecciones de *S. chester* (Ries y col., 1990). Y en 1991 rebanadas de melón originarias de Texas fueron ligadas a infecciones por *S. poona* (CDC, 1991).

#### **2.4.1 Características generales**

La descripción del género *Salmonella* corresponde al típico bacilo Gram-negativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Generalmente son móviles, aerobios o facultativos anaerobios (Fernández, 2000) fermentan el dulcitol pero no la lactosa, producen sulfuro de hidrógeno, son mesofílicos, con una temperatura óptima de crecimiento entre 35 y 37°C; pero generalmente presentan un rango de crecimiento de 5 a 46°C (Kapperud y col., 1990; Bibek, 2001).

La mayoría de las cepas, con excepción de *S. typhi*, son aerógenas, utilizan el citrato como única fuente de carbono. La reacción de rojo de metilo es positiva, la prueba de Voges-Proskauer es negativa y la prueba de indol es negativa (Ramis, 1996).

#### **2.4.2 Hábitat y comportamiento en alimentos**

*Salmonella* se encuentran en todas partes y están reconocidas universalmente como agentes zoonóticos. Se han identificado numerosos reservorios animales. Algunos alimentos, especialmente los de origen animal y los que están expuestos a contaminación por aguas residuales, se han identificado como vehículo para la transmisión de estos patógenos a los seres humanos.

La mayoría de los representantes de la familia se encuentran en el tracto gastrointestinal del hombre y de los animales. Algunas serovariedades (por ej., *S. typhi*, *S.*

*paratyphi* A., *S. paratyphi* C y *S. sendai*) están adaptadas al hombre como hospedador y generalmente causan un síndrome septicémico-tifoideo en los seres humanos (Ramis, 1996).

La sobrevivencia de la *Salmonella* fuera del cuerpo humano y de los animales está afectada por el grado de humedad ambiental y temperatura, la exposición a agentes germicidas y a la composición del material en que se encuentren.

De manera natural los vegetales se pueden contaminar con *Salmonella*, a partir del contacto directo o indirecto con materia fecal o humana. Se le detecta en cereales, frutas y verduras en la precosecha, e incluso en especias y granos de cocoa (Fernández, 2000).

Se ha observado que *S. typhi* puede sobrevivir en la tierra húmeda al menos dos años. El factor más decisivo es precisamente el grado de humedad prevalente, lo que guarda relación con la intensidad de la lluvia, la temperatura, los vientos y el tipo de tierra involucrado. Quizá el 50% de las células mueren durante las primeras 48 h (Fernández, 2000). La información anterior contribuye a explicar las dificultades que en la práctica hay que superar para mantener en un mínimo la probabilidad de que materias primas y alimentos se encuentren libres de esta bacteria (Fernández, 2000).

Teóricamente casi cualquier tipo de alimento puede convertirse en vehículo de *Salmonella*, una vez que este se expone a contaminación fecal, en algunos productos se configuran riesgos mayores si el microorganismo sobrevive o es capaz de proliferar en él ante condiciones propicias para que tal ocurra. El conocimiento de los factores que modulan este comportamiento es de valor primario en el análisis de riesgos para prevenir brotes de gastroenteritis. *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 (Fernández, 2000).

En los alimentos congelados *Salmonella* pueden sobrevivir durante varios meses, como ocurre con muchos microorganismos, pero la composición del alimento en el cual se encuentran influye en la tasa de sobrevivencia. Sin embargo, el comportamiento de una cepa de laboratorio, puede diferir de manera notable, con respecto a las cepas silvestres (Fernández, 2000).

## **2.5 Microbiología de jugos**

### **2.5.1 Jugos de frutas y verduras**

El consumo de frutas y vegetales al igual que el de jugos se ha incrementado en los últimos años, Sin embargo, en la preparación de jugo fresco por lo común se incide en prácticas de higiene deficientes que propician la contaminación por microorganismos patógenos. La contaminación principal de los jugos se da por la parte externa de las frutas y verduras (alfalfa, zanahoria, brotes de leguminosas). Aunque no suelen existir oportunidades para el desarrollo microbiano sobre las verduras, los microorganismos pueden sobrevivir por tiempos prolongados (Fernández, 2000). El efecto del bajo pH en algunas frutas o de otras sustancias antimicrobianas naturales no llega a ser significativo a favor de la inocuidad (Fernández, 2000).

Sobre las frutas y verduras suele encontrarse una diversidad de géneros y especies microbianas. En estudios realizados en jugos de manzana, naranja, uva, cereza y piña, los géneros y especies más frecuentes encontrados fueron: *Saccharomyces cerevisiae* 24.7%, *Candida stellata* 22.1%, *Zimmomonas rouxii* 14.3% y nueve géneros con 21 especies más,

destacando con 3.8% cada una, *Torulaspota delbrueckii*, *Rhodotorula mucilaginoso*, *Issatchenkia elongisporus*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Hanseniospora guillermondii*, *Candida glabrata* y *Pichia anomala* (Deak y Beuchat, 1993). En el jugo de naranja concentrado son frecuentes *Candida*, *Saccharomyces* y *Rhodotorula*; también especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* fueron reportadas por Paris e Higgins (1989). Un contenido elevado de hongos sugiere un equipo mal sanitizado, el empleo de frutas deterioradas o tratamientos antimicrobianos deficientes. Ante esta última condición, debe considerarse la presencia de hongos termorresistentes como: *Byssochlamys spp.* o *Neosartorya fisheri* (Hatcher y col., 1992).

En la microbiología de jugos merecen ser destacados dos microorganismos; uno de ellos es el nuevo género, *Alicyclobacillus*, (Wisotzkey y col., 1992) esporulado, móvil, acidófilo, que se suma a la lista de agentes causantes de deterioro en estos alimentos. Se aísla de jugos deteriorados procesados. El microorganismo crece en límites de pH 2.5-6.0. Esta bacteria pertenece al grupo de bacilos esporulados termófilos, los cuales son comunes en tierra, frutas lavadas y sin lavar, y jugos (Wisse y Paris, 1998).

El otro microorganismo de interés es el hongo *Byssochlamys*, con dos especies (*B. fulva* y *B. nivea*), que provocan descomposición de frutas y jugos de frutas envasadas. La fuente de contaminación más importante es la tierra, de manera que los vegetales que llegan a las plantas procesadoras pueden ser portadores del microorganismo; en los jugos de frutas éste puede usarse como indicador de las condiciones higiénicas bajo las cuales fueron procesados (Fernández, 2000).

Sin embargo, en los últimos años aparte de los microorganismos mencionados se han aislado microorganismos patógenos intestinales en jugos no pasteurizados causando un

gran número de ETAs en los Estados Unidos de Norte América (USA) (Paris y col., 1997). Los principales patógenos asociados a enfermedades por el consumo de jugos incluyen: *Escherichia coli* O157:H7, *Cryptosporidium parvum*, y algunos serotipos de *Salmonella* (e.g., *S. typhi*, *S. Hartford*, *S. Muenchen* y *S. enteritis*) (Paris y col., 1997; Cody y col., 1999).

Otro caso fue notificado por el (CCHD) (Cortland County Health Department) de USA, donde 10 casos de criptosporidiosis se registraron en el periodo del 10 al 15 de agosto de 1995 causados por el consumo de jugo de manzana no pasteurizado (DuPont y col., 1995; Millard y col., 1994).

Desde 1990, en Norte América han sido 14 casos de enfermedades ligadas al consumo de jugos no pasteurizados, dentro de los cuales se incluyen: jugo de manzana, jugo de naranja, jugo de sandía, jugo de zanahoria (FDA, 2000).

La FDA calcula que aproximadamente cada año hay entre 16,000 y 48,000 casos de ETAs involucradas por el consumo de jugos no pasteurizados contaminados por microorganismos patógenos. En 1996, *Escherichia coli* O157:H7 fue asociada a ETAs por el consumo de jugo de manzana no pasteurizado, donde el jugo de manzana enfermó a más de 70 personas en USA y Canadá, causando infección de Síndrome Urémico Hemolítico a dos personas (FDA, 2000). Al igual que *Salmonella muenchen* en el mismo año, fue causa de 423 enfermedades en 20 estados y 3 provincias de Canadá por el consumo de jugo de naranja no pasteurizado y *Salmonella enteritis* en el 2000 como causa de 88 enfermedades en seis estados de USA (FDA, 2000).



## **2.6 Betabel**

### **2.6.1 Características y producción**

Entre los alimentos que forman parte de la dieta habitual de una proporción importante de la población mexicana, se encuentran las verduras, las hortalizas, entre ellos el betabel, también conocido como remolacha, que son de enorme interés por su composición y riqueza en micronutrientes y fibra (Belitz y Grosch, 1997; Pattee, 1985; Rangana, 1986; Torija y Camara, 1999).

Algunos carbohidratos sencillos fácilmente utilizables como glucosa, fructosa, sacarosa y en algunos casos almidón, se encuentran principalmente en raíces y tubérculos. Según Wills y col. (1999) en el betabel el contenido de glucosa y fructosa es inferior al 1 %/100 g, mientras que el de sacarosa es de 8 % (Belitz y Grosch, 1997).

En la (tabla 3) se presenta el contenido nutricional de 100 g betabel (Gebhardt y Matthews, 1988).

En varios países el betabel o remolacha representa el cultivo que más valor nutritivo produce en relación a la unidad de superficie, pues las hojas y la raíz son un alimento muy rico en nutrientes (F.A.O., 2001).

El betabel es ampliamente cultivado y consumido en varios países (Tabla 4). Aunque en México también se cultiva betabel, no se tiene cifras confiables sobre el volumen de producción.

**Tabla 3.** Composición nutritiva de 100 g de betabel (Gebhardt y Matthews, 1988).

<b>componente</b>	<b>contenido</b>	<b>Unidad</b>
Agua	91,00	%
Carbohidratos	8,00	g
Proteínas	1,00	g
Lípidos	trazas	
Calcio	11,00	mg
Fósforo	31,00	mg
Hierro	0,60	mg
Potasio	312,00	mg
Sodio	49,00	mg
Vitamina A	10,00	UI
Tiamina	0,03	mg
Riboflavina	0,01	mg
Niacina	0,30	mg
Ácido ascórbico	6,00	mg
Valor energético	30,00	cal

**Tabla 4.** Producción anual de betabel (F.A.O., 2001).

PAÍSES	PRODUCCIÓN AÑO 2001 (toneladas)
Francia	29.504.000
Alemania	24.397.896
Estados Unidos	23.363.640
Ucrania	15.489.000
Federación de Rusia	14.239.000
Polonia	13.000.000
Italia	12.500.000
China	8.900.000
Reino Unido	7.250.000
España	6.899.100
Países Bajos	5.300.000
Bélgica-Luxemburgo	6.500.000
República islámica de Irán	4.300.000
Japón	4.000.000
Chile	3.169.210
Marruecos	3.106.168
Dinamarca	3.100.000
Egipto	2.900.000
Grecia	2.900.000
Hungría	2.900.000
República Checa	2.800.000
Suecia	2.602.200
Austria	2.559.613
República Federal de Yugoslavia	2.500.000
Irlanda	1.700.000
República de Moldova	1.138.000
Suiza	1.100.000
Finlandia	1.070.000

### III.- JUSTIFICACION

En México, el betabel es ampliamente consumido principalmente en forma de jugo; en ocasiones es consumido también en ensaladas mezclado con otras verduras. Sin embargo, cualquiera que sea la forma de consumo, por lo general, es consumido crudo y sin un tratamiento antimicrobiano efectivo que disminuya el riesgo de contener microorganismos patógenos. Existen numerosas publicaciones que muestran la participación de los jugos crudos en brotes de enfermedad. Para el caso del betabel no hay datos registrados de su participación en brotes de enfermedad, ni de la frecuencia y comportamiento de microorganismos patógenos en el betabel o subproductos. No obstante, debido a la falta de higiene que por lo general se tiene durante todas las etapas de su cultivo, transporte y comercialización, es de esperar la participación del betabel en brotes de enfermedad por su consumo.

Por lo anterior, en el presente trabajo se investigó la frecuencia y comportamiento de microorganismos indicadores de higiene y *Salmonella* en jugo de betabel como una forma de evaluar el riesgo a la salud que representa el consumo de este tipo de jugo.

## IV.- OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar la frecuencia de microorganismos indicadores de higiene y *Salmonella*. Y el comportamiento de grupos patógenos de *E. coli* y *Salmonella* en jugo de betabel

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar la frecuencia de *Salmonella* y la frecuencia y concentración de OC, CF y *E. coli* en jugo de betabel.
- ❖ Estudiar el comportamiento de tres grupos patógenos de *E. coli* (ECET, ECEI, ECEP) y *Salmonella* en jugo de betabel almacenado a temperatura ambiente y de refrigeración.

## V.-METODOLOGÍA

### **Equipo y Materiales**

Autoclave eléctrica SM 200 Yamato Scientific ®

Baño maría con circulación Riosa (0-120°C)

Balanza analítica PC 2000 Mettler ®

Cuenta colonias American Optical Quebec ®

Horno para esterilización Craft (0-250°C)

Incubadora bacteriológica Blue M ®

Lámpara de luz UV ENF-240C, Spectroline ®

Stomacher 400 Circulator Seward ®

Termómetros

Vortex 2-genie Scientific Industries

Bolsas de polietileno en rollo sin marca comercial

Material de uso común en el laboratorio de microbiología

### **Medios de cultivo**

Agar de bilis y rojo violeta (ABRV) BD Bioxon ®

Agar citrato de Simmons (AC) BD Bioxon ®

Agar hierro-lisina (LIA) BD Bioxon ®

Agar *Salmonella-Shigella* (ASS) BD Bioxon ®

Agar sulfito de bismuto (ASB) BD Bioxon ®

Agar de eosina y azul de metileno (EMB) BD Bioxon ®

Agar soya tripticasa (AST) BD Bioxon ®

Agar triple azúcar y hierro (TSI) BD Bioxon ®

Agar verde brillante (AVB) BD Bioxon ®

Base de caldo tetrionato (BCT) BD Bioxon ®

Caldo lactosado (CL) BD Bioxon ®

Caldo lactosado verde brillante fluorocult (CLF) BD Bioxon ®

Caldo selenito cistina (CSC) BD Bioxon ®

Caldo soya tripticaseína (CST) Merck (KGaA)

Caldo urea (CU) BD Bioxon

Diluyente de peptona (DP) Bioxon ®

### **Reactivos**

Hidróxido de sodio (NaOH)

Reactivo de Kovacs Merck (KGaA)

Solución yodo-yoduro; Técnica Química, S. A. de C. V.

## **5.1. Frecuencia de OC, CF, *E. coli* y *Salmonella* en jugo de betabel**

### **5.1.1 Recolección de muestras**

Los jugos fueron comprados en diferentes mercados públicos y de diferentes vendedores ambulantes en la ciudad de Pachuca Hgo. Se analizaron 80 muestras de jugo, exclusivamente de betabel, recolectadas a lo largo de 4 meses. Las muestras fueron transportadas al laboratorio bajo condiciones asépticas y se procesaron dentro de 2 horas posteriores a la recepción.

Las muestras se obtuvieron en el empaque de venta y se transportaron al laboratorio como lo establece la legislación sanitaria en México (NOM-109-SSA1-1994).

Se realizó la cuantificación de coliformes totales y fecales, *E. coli* y la presencia de *Salmonella* con base en los manuales especializados (FDA/JFSAN, 2001; Vanderzant y Splittstoesser, 1992; NOM-112-SSA1-1994; NOM-113-SSA1-1994; NOM-114-SSA1-1994), con las siguientes variantes:

### **5.1.2 Análisis microbiológico**

#### **Preparación de la muestra para su análisis microbiológico (Diagrama 1)**

Un volumen de 50 mL de jugo de betabel se colocó en bolsas estériles de polietileno. Adicionando un volumen de 450 mL de caldo lactosado (CL) (dilución  $10^{-1}$ ), posteriormente se homogeneizó en un Stomacher a 260 rpm durante 1 min.

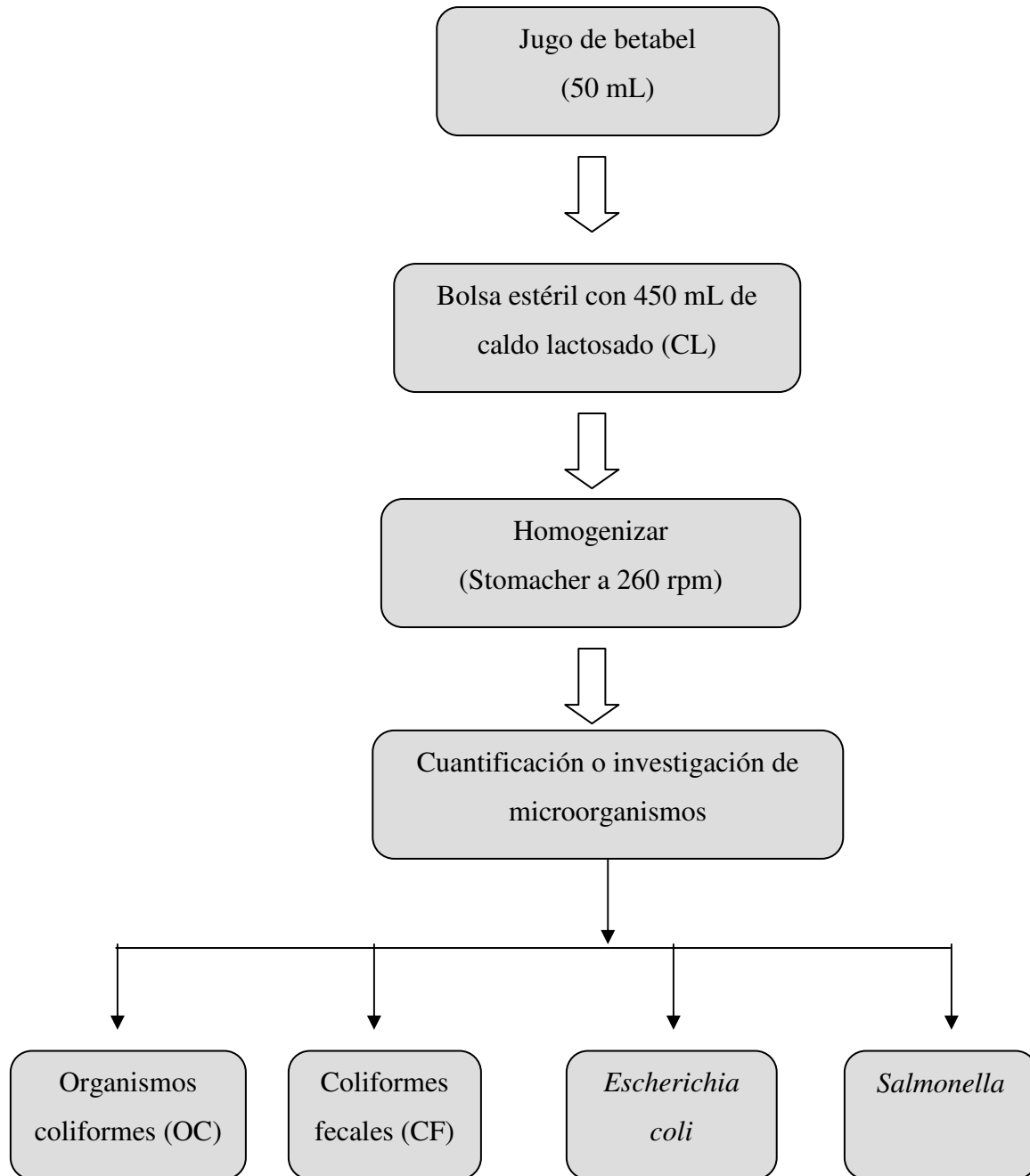
### **5.1.3 Recuento de organismos coliformes (Diagrama 2)**

La cuantificación de los OC se realizó mediante la técnica de vaciado en placa. A partir del jugo de betabel diluido en CL se realizaron seis diluciones decimales en diluyente

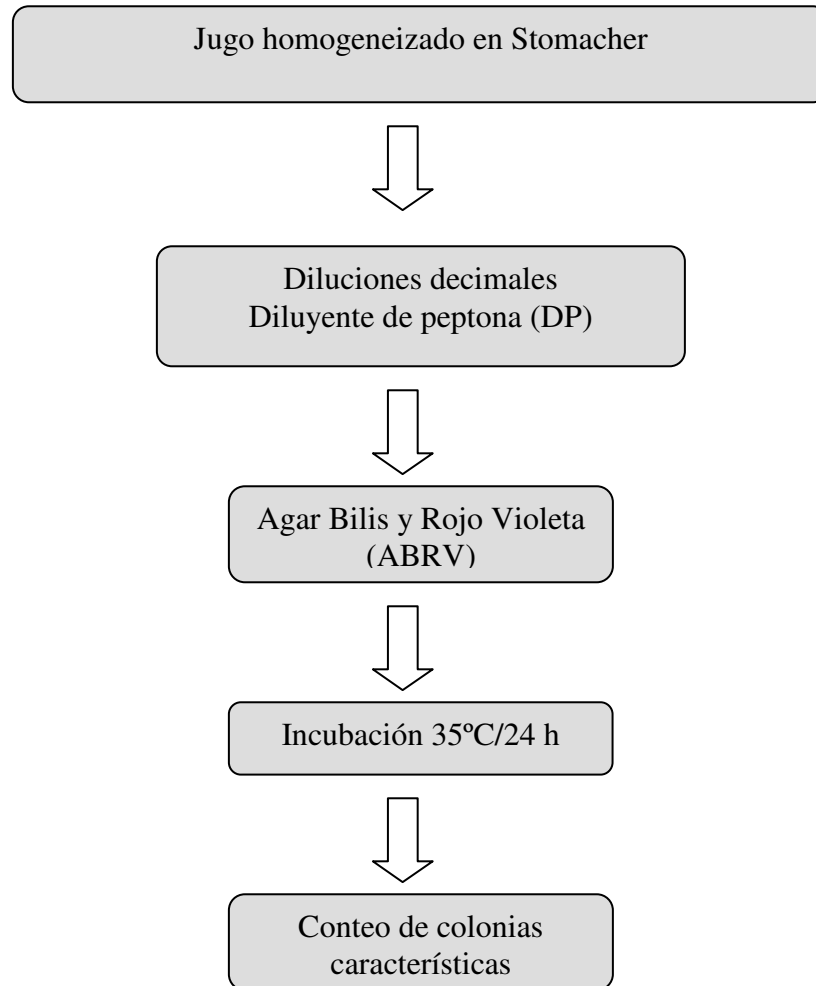


### DIAGRAMA 1

#### Preparación de la muestra para su análisis microbiológico



**DIAGRAMA 2**  
**Cuantificación de organismos coliformes**



de peptona. Un mL de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  fue colocado en cajas de petri vacías. Posteriormente se agregó aproximadamente 15 mL agar de bilis y rojo violeta (ABRV) a las cajas de petri inoculadas. Se homogeneizó y dejó solidificar; finalmente, se adicionó una sobrecapa de 5 mL del mismo medio, se dejó solidificar y se incubaron las cajas a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Se contaron las colonias rojas o guindas con o sin precipitación de sales biliares y de un tamaño mayor (en la caja contable) de 0.5 mm.

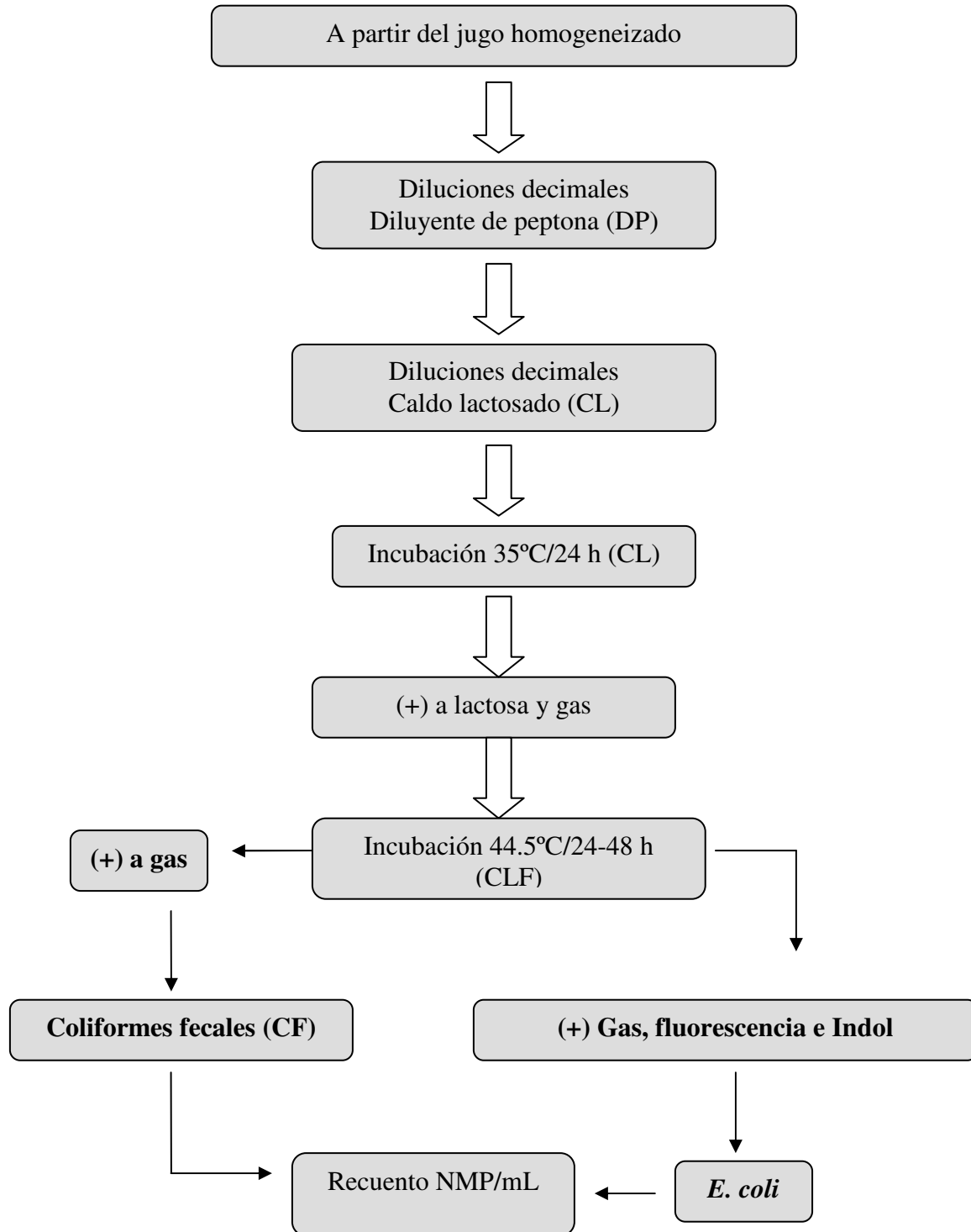
#### **5.1.4 Recuento de coliformes fecales y *E. coli* (Diagrama 3)**

##### **Coliformes fecales**

La cuantificación de los CF se realizó mediante la técnica del Numero Más Probable (NMP). Del jugo de betabel homogenizado en el Stomacher (dilución  $10^{-1}$ ), se realizó una dilución decimal más en DP (dilución  $10^{-2}$ ). A partir del jugo original ( $10^0$ ) se inoculó 1 mL en cada uno de tres tubos conteniendo CL y campana Durham. La misma operación se realizó a partir de las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  del jugo. Los 9 tubos de CL inoculados fueron incubados a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Una “asada” de los tubos que presentaron desarrollo y producción de gas, se transfirió en tubos conteniendo caldo lactosado bilis verde brillante fluorocult (CLF) y campanas Durham. Los tubos de CLF se incubaron a  $44.5^{\circ}\text{C}$  / 24-48 horas. Los tubos de CLF que presentaron desarrollo y producción de gas se tomaron como positivos para la cuantificación de coliformes fecales. El cálculo de la concentración de CF se realizó con base en las tablas del NMP multiplicando por un factor de 10 el valor expresado en las tablas correspondientes. Esto debido a que las tablas están construidas considerando las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , y en nuestro se utilizaron las diluciones  $10^0$ ,  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ . Esta operación es recomendada en

**DIAGRAMA 3**

**Cuantificación de coliformes fecales y *E. coli***



los manuales de análisis microbiológicos correspondientes (Vanderzant y Splittstoesser, 1992).

### **5.1.5 Cuantificación de *Escherichia coli*.**

Para la cuantificación de *E. coli*, los tubos que resultaron positivos a coliformes fecales en el CLF se les determinó la presencia de fluorescencia bajo luz ultravioleta y producción de indol (FDA/CFSAN, 2001).

*E. coli* posee la enzima  $\beta$ -D glucuronidasa, que actúa sobre el 4-metil-umberiferil- $\beta$ -D-glucurónido (MUG) presente en el medio de cultivo de (CLF), liberando el 4-metil-umberiferona que emite fluorescencia azul/verde cuando se ilumina con luz ultravioleta. En los tubos positivos a fluorescencia se investigó la producción de indol; el CLF es rico en triptofano por lo que permite la investigación de producción de indol por los microorganismos a partir de este aminoácido. La producción de indol se reveló mediante el reactivo de Kovacs. Los tubos de CLF que presentaron un anillo púrpura en la superficie del caldo luego de la adición del reactivo fueron considerados como positivos.

Todos aquellos tubos que presentaron las siguientes características fueron determinados como positivos a *E. coli*:

- Producción de gas por fermentación de lactosa a 44.5° C
- Producción de Indol
- Producción de fluorescencia azul/verde

Para el cálculo de *E. coli* se empleó la misma fórmula que para los coliformes fecales. El valor obtenido se expresó como NMP/mL de *E. coli* presente en jugo de betabel.

#### **5.1.6 Determinación de *Salmonella* (Diagrama 4)**

Las muestras de jugo mezcladas con CL y homogeneizadas en el Stomacher se incubaron a 35° durante 24 horas, Posteriormente se transfirió 1 mL de la muestra a tubos conteniendo 9 mL de caldo selenito cistina (CSC) o 9 mL de caldo tetrionato (CT), los cuales se incubaron a 35°C/24 h y 43°C/24 h respectivamente.

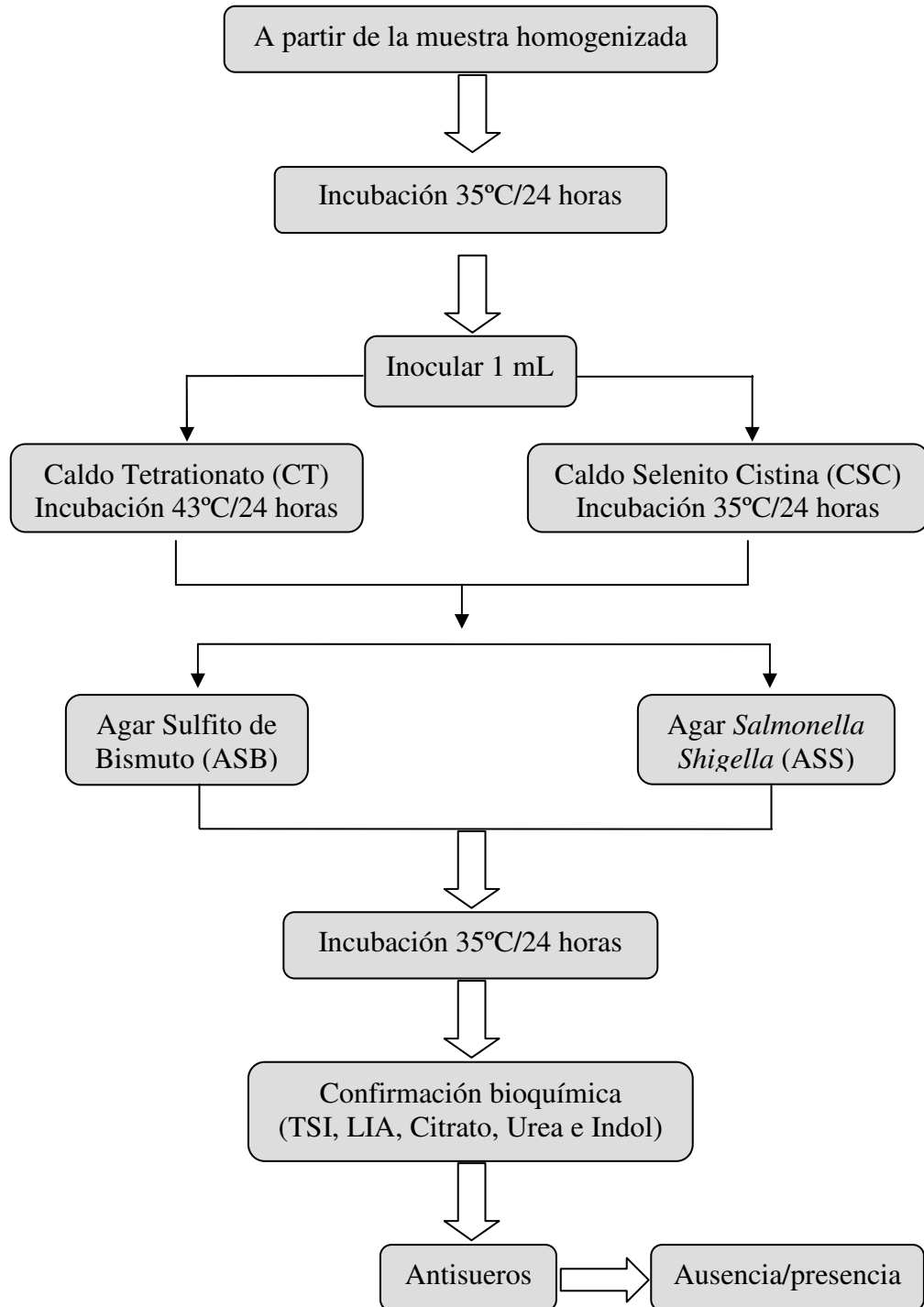
Por separado, cada tubo se sembró por estría en los medios selectivos: agar *Salmonella Shigella* (ASS) y agar sulfito de bismuto (ASB); las cajas inoculadas se incubaron a 35°C/24 h.

Al menos tres colonias con morfología típica de *Salmonella* de cada medio de cultivo se sometieron a pruebas bioquímicas empleando agar hierro y triple azúcar (TSI), agar hierro lisina (LIA), caldo urea, caldo triptona (para producción de indol) y agar citrato de Simmons.

Las colonias con pruebas bioquímicas típicas de *Salmonella* se confirmaron serológicamente con antiseros polivalentes demostrando como ausencia/presencia de *Salmonella*.

**DIAGRAMA 4**

**Determinación de *Salmonella***



## **5.2 Comportamiento de tres grupos patógenos de *E. coli* Rif (+) (ECEP, ECEI, ECET) y *Salmonella* en jugo de betabel almacenado a temperatura ambiente y de refrigeración.**

### **5.2.1 Cepas:**

Se trabajó con tres cepas de *E. coli* enteroinvasiva (ECEI): 4VC81-5, 323GM894, TL3, tres cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ECET): 1620 TL 326, 10 ET, 150 TL 419, y tres cepas de *E. coli* enteropatógena (ECEP): 872 TL 489, 873 TL 489, 52 GM 291, y tres cepas de *Salmonella typhimorium*. Todas las cepas fueron donadas por el departamento de Biomedicina Molecular, del CINVESTAV-IPN, México D.F. Todas las cepas se marcaron con resistencia a Rifampicina Rif (+).

### **5.2.2 Resistencia a Rifampicina**

Para marcar la resistencia de cepas a Rifampicina a partir de un cultivo desarrollado durante 6 horas a 35°C en CST, se centrifugó y resuspendió en SSI a una concentración final de  $10^9$  UFC/mL. Se extendió por separado un mL de la suspensión de cada cepa en tres placas de AST conteniendo 100 ppm de Rifampicina (AST-Rif). Las placas inoculadas se incubaron a 35°C/48-72 horas, las colonias teóricamente resistentes fueron estriadas en nuevas placas de AST-Rif para asegurar la resistencia. Todas las cepas se mantuvieron de 4-7°C en AST con transferencias quincenales y se activaron mediante tres transferencias sucesivas en CST incubando a 35°C/24 horas. La resistencia al antibiótico se mantuvo en las nueve cepas a lo largo del estudio. En lo sucesivo las cepas resistentes a Rifampicina serán referidas como Rif (+).



### 5.2.3 Jugo

Se compraron raíces de betabel (bulbos) en un mercado público de la ciudad de Pachuca. En el laboratorio los bulbos fueron lavados perfectamente con agua para eliminar todas las impurezas como basura, tierra, polvo e insectos. Una vez limpio se procedió a la obtención del jugo utilizando un extractor. El jugo se recuperó en un matraz estéril y se distribuyó en tubos de ensaye estériles para su estudio.

### 5.2.4 Preparación del inóculo

Las doce cepas (nueve de *E. coli* y tres de *Salmonella*) resistentes a Rifampicina Rif (+), fueron cultivadas en CST a 37°C/18-24 horas, bajo estas condiciones de cultivo las cepas alcanzan una concentración de aprox. 9 Log<sub>10</sub> UFC/mL. Todos los cultivos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 25 min. Y resuspendidos en SSI al 0.85% en dos ocasiones.

Por separado, las tres cepas de cada grupo patógeno de *E. coli* y las de *Salmonella* fueron mezcladas en un tubo de ensaye estéril en volúmenes iguales, obteniendo una sola mezcla representativa de cada grupo patógeno de *E. coli* y *Salmonella*. Posteriormente se prepararon diluciones decimales en DP para obtener el nivel de inóculo deseado (10<sup>2</sup> ó 10<sup>3</sup> UFC/mL).

### 5.2.5 Monitoreo

En un tubo de ensaye que contenía 15 mL de jugo de betabel se inoculó, por separado, cada una de las mezclas de *E. coli* y *Salmonella* a una concentración final de (100 UFC/mL) y se agitó en el Vortex 10 segundos; los tubos se dejaron a temperatura

ambiente ó en refrigeración. Periódicamente, se efectuaron recuentos, a partir de cada uno de los tubos, mediante la técnica de vertido en placa empleando Agar Soya Trypticaseina adicionado de 100 ppm de Rifampicina. Las cajas inoculadas fueron incubadas a 35°C por 24-48 horas. Todos los estudios se efectuaron por triplicado.

## VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Frecuencia de microorganismos en jugo de betabel

Se analizaron 80 muestras de jugo de betabel obtenidas de mercados públicos y vendedores ambulantes de la ciudad de Pachuca. Los OC estuvieron presentes en todas las muestras; los CF y *E. coli* se aislaron con una frecuencia de 68.7 y 42.5%, respectivamente; *Salmonella* fue positiva en el 1.25 % de los jugos (Tabla 5).

Los límites de OC, CF y *Escherichia coli* fueron de  $1.7 \times 10^4$  a  $2.0 \times 10^7$  UFC/mL, <3.0 a 1100 NMP/mL, y de <3.0 a 150 NMP/mL, respectivamente (Tabla 6).

En general, los resultados obtenidos revelan pobre calidad higiénica de los jugos de betabel.

**Tabla 5.** Frecuencia y positividad de los grupos microbianos en jugo de betabel.

Microorganismo o grupo Microbiano	No. de muestras	Muestras (+)	Frecuencia (%)
OC	80	80	100
CF	80	55	68.75
<i>E. coli</i>	80	34	42.5
<i>Salmonella</i>	80	1	1.25

Es importante señalar que los sitios donde se compraron los jugos, presentaban visualmente falta de higiene. Debe entenderse que la falta de higiene se refiere a diferentes aspectos: no desinfección de betabel o inadecuada desinfección antes de la obtención del jugo, la utilización de utensilios mal sanitizados, mala higiene personal de los vendedores y una intensa exposición a la contaminación durante su comercialización (betabel en contacto con el suelo, con la tierra, etc).

**Tabla 6.** Valores mínimos, medianas y máximos en jugo de betabel.

<b>Microorganismo o grupo microbiano</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Mediana</b>	<b>Máximo</b>
OC (a)	$1.7 \times 10^4$	$5.2 \times 10^6$	$2.0 \times 10^7$
CF (b)	<3.0	27	1100
<i>E.coli</i> (b)	<3.0	6.6	150

(a) UFC/mL

(b) NMP/mL

Aparte de nuestro estudio, no existen datos disponibles en la literatura sobre la calidad microbiológica de jugos de betabel que nos permitan comparar nuestros resultados. Sin embargo, los niveles de OC y CF que encontramos en los jugos fueron similares a los reportados en Sonora a partir de alimentos que se venden en las calles (Fuentes, 2005).

Además son semejantes a los encontrados por Caballero y col., (1998) y Pao y Brown (1998) en jugos de naranja no pasteurizados de expendio comercial.

A diferencia de *E. coli*, a los OC no se les reconoce valor indicativo de contaminación fecal en los alimentos, como ocurre con el agua (Fernández, 1981). Su presencia en los alimentos no implica un riesgo a la salud (Fernández, 1981). Los OC son frecuentes en vegetales crudos (Duncan y Razzell, 1972; Geldreich y Clarke, 1966; Hargrove y col., 1969; Khan y col., 1992; Prokopowich y Blank, 1991; Solomon y Kautter 1988).

Más comúnmente se emplean como indicadores de la eficiencia de los procesos de desinfección de materiales y equipo (como más adelante se verá). Las altas cuentas de OC en el jugo de betabel revelan más bien un alimento de pobre calidad microbiana (F.A.O., 1989). Estos niveles pueden explicarse de dos maneras: una intensa exposición a la contaminación durante la cosecha, recolección, transporte y comercialización sin posterior desarrollo; o una discreta contaminación y en función de su riqueza en nutrientes, alta humedad, y temperatura ambiente, que favorece la multiplicación de los microorganismos. Este desarrollo puede ser tan activo que rápidamente alcancen su concentración máxima en el alimento. La segunda opción parecería la más viable, si bien en las condiciones prevalentes de producción y comercialización del jugo de betabel, es posible la ocurrencia de ambas. Este señalamiento es de especial significado cuando los microorganismos involucrados tienen carácter patógeno, ya que se puede estar propiciando la contaminación y su desarrollo en el alimento.

En cuanto al hallazgo de *E. coli* en el jugo de betabel, es sabido que su presencia indica contaminación fecal directa o indirecta; su hallazgo, implica la posibilidad de que un

patógeno pueda estar presente (Geldreih y Clarke, 1966; Andrews y col., 1976). También, números considerables de *E. coli* en alimentos sugiere en general carencia de higiene y de inapropiadas manipulaciones así como un mal almacenamiento (Noguera, 2005).

Cabe señalar que aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas, existen algunas que sí lo son tal como *E. coli* O157:H7 cuya dosis mínima infectante es muy baja (10-100 células). Considerando la forma en cómo se obtienen y comercializan los jugos de betabel, es posible que algunas de las cepas de *E. coli* que encontramos sean patógenas

Desafortunadamente, en nuestro país no existe norma para jugos de betabel o jugos de verduras crudas, sin embargo, de acuerdo a los límites establecidos por la ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) para jugos en general, los niveles de OC, CF y *E. coli* de la mayoría de las muestras que analizamos están fuera de norma, ya que establece como límite permisible (100 NMP/mL) para coliformes fecales y (100,000 UFC/mL) para coliformes totales.

Respecto a *Salmonella*, sólo una de las muestras estuvo contaminada. Considerando la forma como se cultiva el betabel y en la forma en como se obtiene y comercializa el jugo y además los niveles elevados de microorganismos indicadores encontrados en las muestras analizadas, sería de esperar una mayor número de muestras contaminadas con el patógeno. La baja frecuencia de *Salmonella* en los jugos de betabel podría explicarse por algunas causas adicionales:

a) Que el patógeno se encuentre presente en una baja concentración y con desigual distribución en el alimento de tal forma que es posible que las porciones analizadas no contenían al patógeno.

b) El microorganismo puede encontrarse en una condición que se conoce como "viable no cultivable", es decir que estando presente la bacteria de interés no es posible su recuperación en los medios de cultivo ordinarios (Hug y Cowell, 1995).

c) Pérdida de la viabilidad ante la intensa actividad de la flora asociada, o al menos, pérdida de capacidad del patógeno para competir favorablemente con ellos en el alimento.

A pesar de la baja frecuencia de *Salmonella* en los jugos, su presencia es inaceptable en cualquier alimento listo para el consumo. La razón es que este patógeno muestra una dosis infectante muy baja de al rededor de 10 células (Cliver, 1990).

Por otro lado, cualquier incremento en la concentración de *Salmonella* en los jugos de betabel incrementa el riesgo de enfermedad. Es bien sabido que *Salmonella* puede multiplicarse si las condiciones ambientales tales como el contenido de nutrientes, el valor de pH y la actividad de agua favorecen su crecimiento (Noguera, 2005).

En este sentido, se reconoce la necesidad de mejorar los programas de regulación y vigilancia de alimentos que se venden en las calles ya que estos representan un riesgo elevado de enfermedad a los consumidores. Cabe mencionar que las medidas encaminadas a solucionar estos problemas, deben involucrar el incremento de la educación sanitaria de los manipuladores y consumidores, así como elevar la capacitación técnica de los inspectores y personal encargado de la regulación de los establecimientos de alimentos que se venden en mercados y en la vía pública. Es importante señalar la necesidad de eliminar o disminuir la interferencia de grupos políticos en la producción de alimentos en los mercados, ya que por lo general impiden que las autoridades de Salud efectúen

adecuadamente la vigilancia y la regulación de la producción de alimentos; favoreciendo con ello la elaboración de alimentos con baja calidad higiénica. Finalmente, se ha mencionado la factibilidad de aplicar el sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP, por sus siglas en inglés: Hazard Analysis and Critical Control Point), como alternativa para garantizar la inocuidad de los alimentos que se venden en la vía pública (Brayan, 1988; RLAC. 1990; Caballero y col., 1998).

## **6.2. Comportamiento de tres grupos patógenos de *E. coli* (ECEP, ECEI, ECET) y *Salmonella* en jugo betabel.**

En general, la presencia de un microorganismo patógeno en un producto es razón suficiente para condenarlo. La razón es que algunos como *Shigella*, muestran dosis infectante muy baja (Cliver, 1990). Por otra parte, la mayoría de los microorganismos patógenos suelen manifestar potencial para desarrollar en los alimentos, lo que depende de una variedad de factores ecológicos (ICMSF, 1980). Debe entenderse que este proceso no es estático, y que tales factores suelen variar (actividad acuosa, por ejemplo) durante la elaboración, fabricación, comercialización o almacenamiento del alimento. Su efecto sobre el destino de un microorganismo en particular, puede ser positivo (sobrevivencia / desarrollo) o negativo (inactivación) dependiendo de las condiciones prevalentes al momento de ingresar al alimento y de su manejo ulterior. En consecuencia, un alimento es más o menos peligroso dependiendo del tipo de microorganismos patógenos que contenga y de las facilidades que presente para su eventual desarrollo. Consecuentemente, como una forma de evaluar este riesgo, se estudió el comportamiento de algunas bacterias enteropatógenas en el jugo de betabel.



### 6.2.2 Comportamiento a temperatura ambiente.

Para evaluar el comportamiento de los tres grupos patógenos de *E. coli* y *Salmonella* se emplearon cepas resistentes al antibiótico Rifampicina, el cual es de amplio espectro. Se recurrió a la utilización de cepas resistentes a Rif (+) debido a que la flora nativa (psicrotrófos, mesófilos, bacterias lácticas, levaduras, etc.) de los jugos eran capaz de crecer en los medios de cultivo selectivos para *E. coli* y *Salmonella* interfiriendo de esta manera en el monitoreo del comportamiento de las cepas patógenas utilizadas.

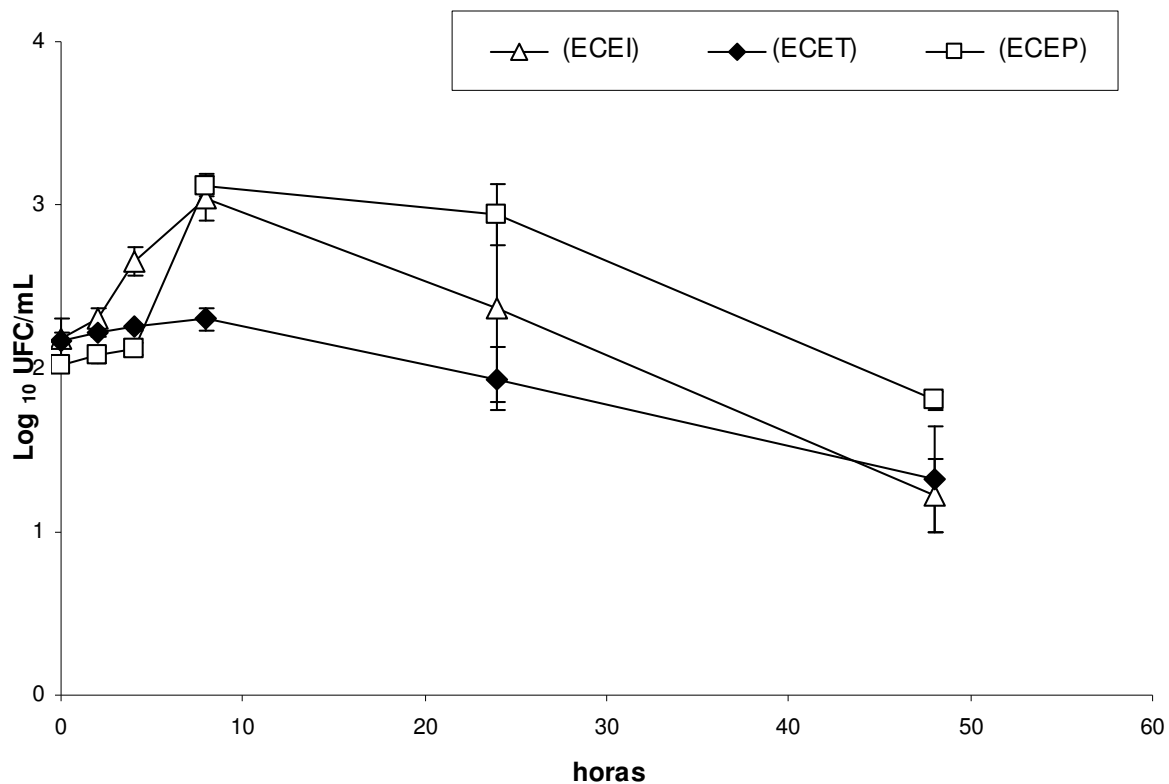
Se prepararon cepas patógenas de *E. coli* y *Salmonella* resistentes a 100 ppm de Rifampicina. Esta concentración del antibiótico fue suficiente para inhibir por completo la flota interferente.

El recurso de emplear cepas resistentes a un antibiótico para monitorear su comportamiento en diversos materiales, es muy utilizado para abatir la interferencia de la flora asociada (Castillo y col., 1997; Beuchat 1998; Sofos y col., 1998; Meza, 2000; Jay 2000). En todos los estudios se trabajó con mezclas de cepas de *E. coli* del mismo grupo patógeno. Esto permite conocer un mayor rango del comportamiento de los microorganismos que el utilizar una sola cepa para cada microorganismo.

Cuando se inocularon las cepas de *E. coli* en el jugo de betabel a temperatura ambiente, en general los tres grupos patógenos de *E. coli* se multiplicaron en las primeras horas (Figura 1).

El número de microorganismos aumentó dentro de las primeras ocho horas. Las cepas de ECEI Y ECEP incrementaron su concentración de 2 hasta aproximadamente 3 Log<sub>10</sub> UFC a las 10 horas. No obstante, después de éste incremento los tres grupos patógenos tienden a inactivarse.

La rápida multiplicación de ECEI y ECEP en las primeras horas sugiere que el jugo de betabel es buena fuente de nutrientes para *E. coli*; de hecho el betabel posee una gran cantidad de nutrientes que pueden favorecer el desarrollo microbiano (tabla 3). De igual manera, Es sabido que los jugos contienen una adecuada concentración de vitaminas (A, D, E, K, entre otras) y minerales (sodio, potasio, hierro, entre otros), azúcares y bajo contenido de proteínas (F.A.O., 2001).



**Fig. 2** Comportamiento de tres grupos patógenos de *E. coli* en jugo de betabel a temperatura ambiente ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

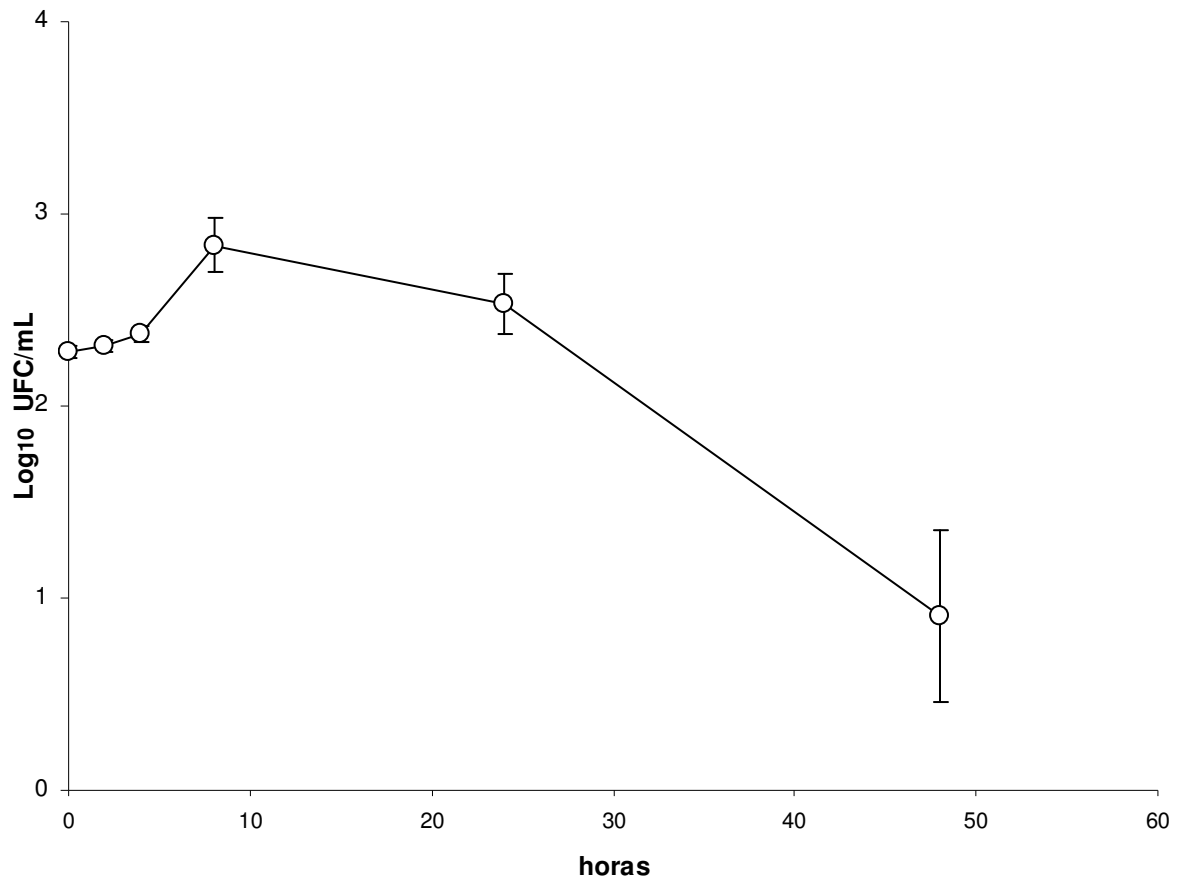
Las cepas de ECET presentaron un comportamiento distinto al de las ECEI y ECEP; prácticamente no hubo desarrollo de las cepas de ECET (Figura 2). Es sabido que en una población de microorganismos cada cepa tiende a caracterizarse por su propio potencial para reproducirse y adaptarse al medio en que están, esto debido a un nivel de expresión de un conjunto de genes, en respuesta a cualquier cambio ambiental, llamado Sistema Global de Regulación (SGR), tal sistema permite a las bacterias mantener la coordinación entre un metabolismo eficiente de nutrientes, la replicación del DNA y a división celular para reproducirse y adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Ramírez y col., 2001). En este caso ECET mostró un nivel de adaptación menor que las cepas de ECEI y ECEP en el jugo de betabel.

En lo referente al comportamiento de *Salmonella*, de igual forma se observó un crecimiento de aprox. 1 Log<sub>10</sub> UFC de la población en las primeras 10 horas (Figura 3). No obstante, después de las 10 horas de desarrollo el microorganismo también tiende a inactivarse.

Desafortunadamente, no existen reportes en la literatura sobre comportamiento de grupos patógenos de *E. coli* y *Salmonella* en jugo de betabel. No obstante, existen diversas publicaciones sobre el comportamiento de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 (enterohemorrágica) en otros tipos de jugos. Por ejemplo, se ha observado potencial de desarrollo de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 en jugos de naranja no pasteurizados (Millar y Kaspar, 1994; Splittstoesser, 1996; OPS/OMS, 1994; Parish y col., 1997; Rojas y Castillo, 2003). Se ha observado además que tanto *Salmonella* como *E. coli* pueden sobrevivir por largos periodos, hasta cuatro semanas en jugos mantenidos a temperatura ambiente y aún con un pH por debajo de 4 (Miller y Kaspar, 1994; Splittstoesser, 1973).

Cabe señalar que conforme transcurrió el tiempo en los estudios de comportamiento de los patógenos a temperatura ambiente, la viscosidad del jugo de betabel se fue incrementando con respecto a la que presentaba al inicio del estudio. Además, la coloración del jugo también se afectó con respecto al tiempo; a las 24 horas del estudio el jugo adquirió un color más oscuro.

Es importante destacar que aunque el crecimiento tanto de *Salmonella* como el de los grupos patógenos de *Escherichia coli* en jugo de betabel fue de 2 a 3 Log<sub>10</sub> aprox. La concentración que alcanzaron los microorganismos patógenos alrededor de las 8 horas es suficiente para provocar un padecimiento. Se reporta que la dosis mínima infectante de *Salmonella* es de alrededor de 10 células y la de *E. coli* enteroinvasiva de 10,000.



**Fig. 3** Comportamiento de *Salmonella* en jugo de betabel a temperatura ambiente ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

Además, hay que considerar que la concentración de los patógenos que se reportan en las gráficas es por mL de jugo; si se considera que en promedio una persona consume 100 mL de jugo de betabel, habría que multiplicar entonces la concentración máxima alcanzada por 100 para conocer la cantidad de microorganismo patógeno que el individuo estaría ingiriendo junto con un jugo contaminado con *Salmonella* o algún grupo patógeno de *E. coli* en donde pudo ocurrir crecimiento.

Es importante señalar que tanto *Salmonella* como *E. coli* patógena han mostrado una actividad semejante de crecimiento en jugo de betabel, incluso en algunos caso no se multiplicó. Estudios realizados con *E. coli* O157:H7 en jugos de manzana demuestran una sobrevivencia del patógeno de hasta 18 días después de ser inoculado el jugo (Miller y Kaspar, 1994). Parish y Higgins (1989) mencionan que *Listeria* y *E. coli* O157:H7 pueden sobrevivir hasta 24 días en jugo de naranja no pasteurizado, en ambos estudios tanto en jugo de manzana como el jugo de naranja a un pH de 4.6 se logran observar reducciones en la concentración de microorganismos después del primer día de estudio (Splittstoesser y col., 1996). Otro estudio realizado por Parish (1998) con *Listeria* y *Salmonella* en jugos de naranja con pH inferiores de 4.0 demuestran que ambos patógenos no logran tener actividad. En otros estudios con *E. coli* 057 :H7 y *Listeria* se observó que no logran sobrevivir en jugos de lima y limón después de un día (FDA, 2000).

La inactivación que presentaron tanto las cepas de *E.coli* como las de *Salmonella* después de las diez horas de desarrollo en jugo de betabel mantenido a temperatura ambiente, posiblemente se debe al efecto de la flora nativa del betabel. Este efecto antimicrobiano puede presentarse por diferentes causas, como por ejemplo, competencia por nutrientes, es sabido que tanto *E. coli* como *Salmonella* no son buenos competidores frente a la flora nativa de los alimentos por los nutrientes disponibles (Fernández, 2000), en consecuencia el desarrollo que muestran los patógenos en estos alimentos será muy discreto y en ocasiones nulo. De igual manera es posible que después de las primeras 10 horas de desarrollo, la flora nativa produzca metabolitos con actividad antimicrobiana en concentraciones importantes y ellos sean los responsables de la inactivación de los

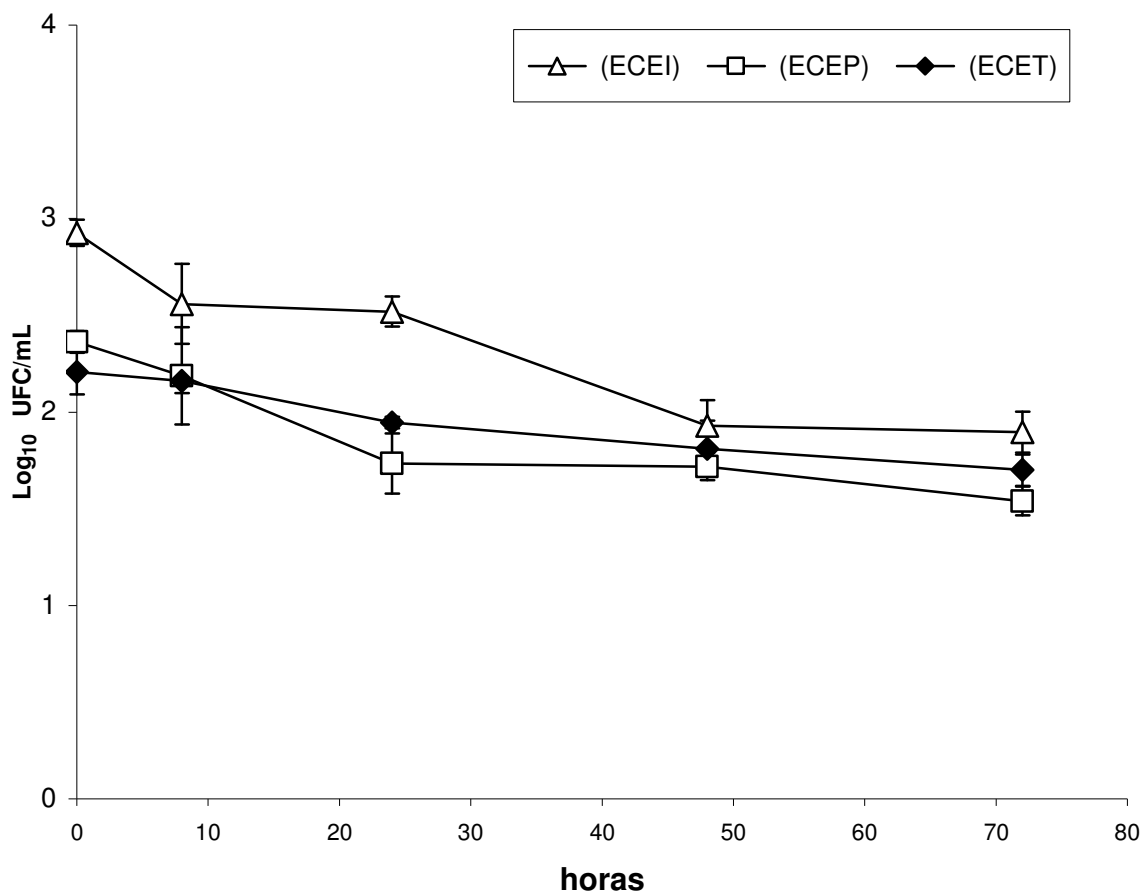
patógenos que se observa en los jugos; metabolitos tales como ácido láctico (Flippim y Mickelson, 1960; Gilliland y Speck, 1972), acético (Sorells y Speck, 1970), diacetilo (Hargrove y col., 1969), agua oxigenada (Gilliland y Speck, 1977), ácidos grasos volátiles (Gilliland y Speck, 1972; Goepfert y Hicks, 1969; Wang y Jonson, 1992) o producción de bacteriocinas (Stevens y col., 1992; Funel y Joyeus, 1993) y antibióticos (Vincent y col., 1959). Cabe señalar que en nuestro estudio no se realizó la cuantificación de los microorganismos nativos del betabel por falta de material.

### **6.2.3 Comportamiento a temperatura de refrigeración.**

En refrigeración tanto las cepas patógenas de *E. coli* como de *Salmonella*, no se multiplicaron (Figura 4); por el contrario, se observó un descenso menor de 1 Log<sub>10</sub> aprox. de las cepas patógenas en las primeras horas de estudio.

El efecto mas notable en el desarrollo microbiano ante un descenso de la temperatura es la prolongación de la fase Lag, pero también se perjudica la tasa de desarrollo y la biomasa final alcanzada en el cultivo (Fernández, 2000).

Es bien sabido que la refrigeración retrasa la actividad microbiana, limitando la capacidad de desarrollo de microorganismos en los alimentos. De igual manera, el llevar a cabo un almacenamiento de un alimento en refrigeración lleva consigo la selección de la flora microbiana en el alimento entre organismos patógenos y organismos psicrótrofos (Fernández, 2000). En general, se ha reportado que *E. coli* patógena tiene capacidad para multiplicarse en refrigeración (Rojas, 2005). Sin embargo, en nuestro estudio con los jugos de betabel observamos un efecto contrario.



**Fig. 4** Comportamiento de tres grupos patógenos de *E. coli* en jugo de betabel a temperatura de refrigeración ( $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

Posiblemente la muerte de los grupos patógenos de *E. coli* se deba al efecto de propia flora competitiva, o a la presencia antimicrobianos naturales en el jugo de betabel. Es sabido que algunas frutas y jugos de frutas contienen de manera natural ácidos orgánicos como, lo es: el ácido málico en manzanas, el ácido tartárico en uvas, entre otros (Samelis, 2003). Por lo general, estos ácidos se encuentran en los jugos en bajas concentraciones, sin embargo, a pesar de que esto influye de manera directa en su actividad, aun así pueden



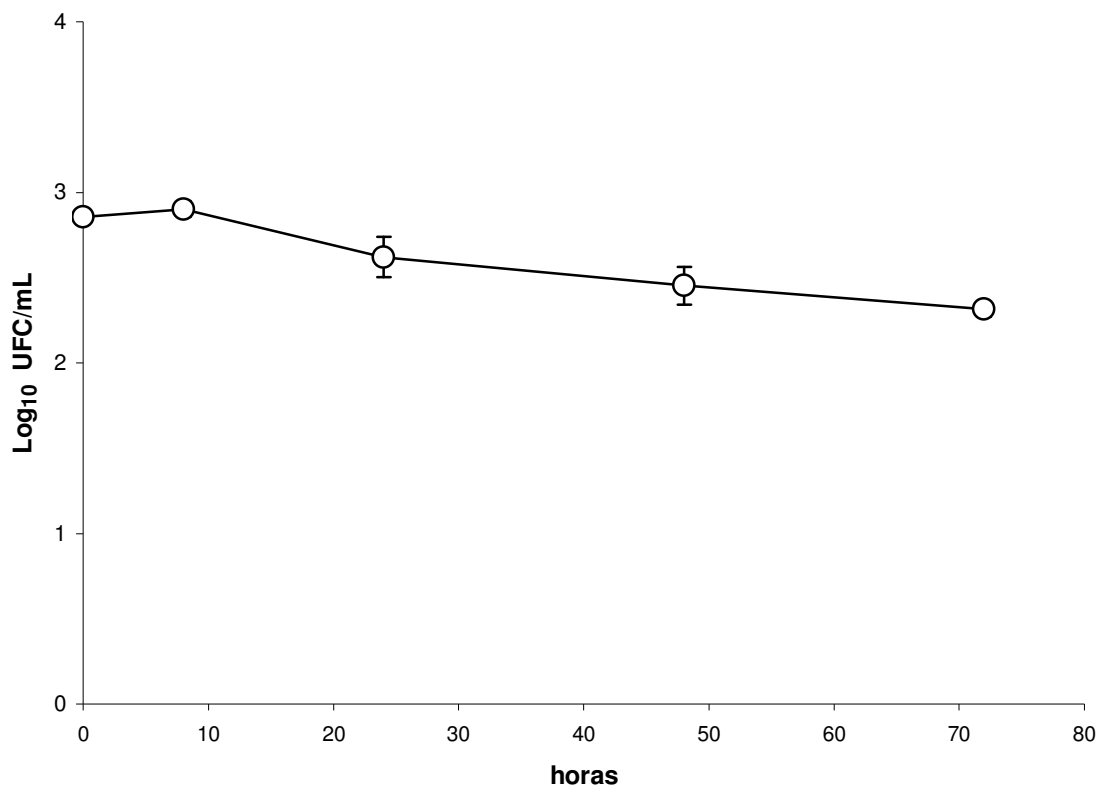
interferir en el crecimiento microbiano. La actividad inhibitoria de estos ácidos está basada en la reducción del pH y en el efecto antimicrobiano que exhibe la parte aniónica del ácido o el ácido sin disociar (Hsin-yi y Chou, 2001; Samelis, 2003).

No existen estudios referentes sobre la capacidad antimicrobiana del jugo de betabel contra patógenos, sin embargo, es sabido que muchos vegetales contienen compuestos antimicrobianos de forma natural diferentes a los ácidos orgánicos. Conner y Beuchat, (1984); Galli y col., (1985) reportan que más de 1300 plantas poseen propiedades antimicrobianas contra microorganismos. Los compuestos con actividad antimicrobiana como aceites esenciales y compuestos fenólicos como: flavonas, isoflavonas, terpenos, entre otros. Estos compuestos han mostrado efecto inhibitorio contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Tassou, 1993; Aryes y col., 1998; Brul y Coote, 1999; Skandamis y Nychas, 2001).

Es posible que en el betabel existan algunos de estos compuestos antimicrobianos que, pudiesen tener un mayor efecto a temperaturas de refrigeración que a temperatura ambiente. Es sabido que la combinación de factores como lo es la refrigeración y la presencia de compuestos antimicrobianos, ayuda a tener un mayor efecto sobre la sobrevivencia de poblaciones microbianas.

Fratamico y col., (1997) han observado también inactivación de cepas no patógenas de *E. coli* en jugos no pasteurizados almacenados en refrigeración

Finalmente observamos que *Salmonella*, tampoco se multiplicó en jugo mantenido en refrigeración (figura 5).



**Fig. 5** Comportamiento de *Salmonella* en jugo de betabel a temperatura de refrigeración ( $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ )

A pesar de la no multiplicación de los patógenos en jugo almacenado en refrigeración y su inactivación progresiva, debe de entenderse que la refrigeración no es un método de destrucción de microorganismos patógenos. La refrigeración, como se ha mencionado, detiene ó disminuye la velocidad de desarrollo microbiano. Por lo que un jugo contaminado con algún microorganismo patógeno aun en refrigeración sigue siendo un alimento de riesgo.

Ante los numerosos brotes que se han presentado asociados al consumo de jugos de frutas no pasteurizados, y sobre todo por la severidad de las infecciones causadas por su consumo, muchos organismos internacionales, entre ellos la FDA, han legislado nuevas reglas y sistemas, con la finalidad de disminuir los riesgos a la salud asociados al consumo de jugos no pasteurizados (Bagamboula y col., 2002). La primera de las regulaciones propuestas, exige que los manufactureros de jugos de frutas y vegetales implementen el sistema (HACCP), para lograr una disminución de 5 Log<sub>10</sub> en los productos terminados, comparados a los niveles que pudieran estar presentes en jugos sin pasteurizar, evitando con ello contaminaciones microbiológicas en jugos. La segunda propuesta, demanda etiquetas de advertencia en todos los productos de jugos empaquetados sin pasteurizar, con ello, se calcula que las acciones que se tomen debido al reglamento prevendrán al menos 6,000 casos de ETAs por año por el consumo de jugos de frutas contaminados (Caballero y col., 1997).

Los resultados obtenidos en la presente investigación y en otros estudios, sugieren que para lograr la inocuidad de este tipo de productos es necesario aplicar algún tratamiento que garantice la disminución o, preferentemente, la eliminación de estos patógenos. Sin lugar a dudas, el tratamiento más adecuado resulta ser la pasteurización. Sin embargo, muchos de estos jugos son obtenidos en restaurantes, supermercados, fondas y puestos de la vía pública lo cual hace difícil que se produzca algún procesamiento térmico luego de la extracción, por lo que es necesario implementar medidas alternas que permitan controlar los riesgos por consumo de jugo crudo.

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

No obstante, se hace difícil lograr la aplicación de este tipo de métodos de control, por cuanto generalmente los expendedores de este tipo de productos, desconocen el problema y, en todo caso, no disponen de una adecuada asesoría que les permita establecer un plan mínimo que logre reducir el riesgo asociado al consumo de jugos no pasteurizados.

Una alternativa que ha planteado el departamento de drogas y alimentos de los EUA (FDA) al consumo de jugos no pasteurizados es la implementación obligatoria del sistema HACCP, Sin embargo, bajo las condiciones de trabajo, espacios y equipo con lo que se cuentan en los sitios donde se prepara jugo de betabel a baja escala, sería muy difícil la implementación del sistema HACCP. Antes de aplicar dicho sistema en los sitios de producción del jugo de betabel es necesario cumplir una serie de prerrequisitos básicos de higiene (Brayan, 1988).

Los resultados de la calidad sanitaria de los jugos de betabel, durante el periodo analizado, representan un riesgo a la salud y la existencia de problemas serios de contaminaciones microbiológicas que deben prevenirse mediante acciones más eficientes para garantizar la salud de los consumidores y con ello prevenir brotes de ETAs.

## VII.- CONCLUSIONES

1. Todos los jugos presentaron mala calidad microbiológica respecto al contenido de OC, CF y *E.coli*.
2. Más del 50% de los jugos presentó contaminación fecal.
3. *Salmonella* solo se aisló en el 1.25 % de las muestras analizadas.
4. Los tres grupos patógenos de *E. coli* y *S. typhimurium* se multiplicaron en jugo de betabel mantenido a temperatura ambiente.
5. Después de las primeras 10 horas de desarrollo de los microorganismos patógenos en el jugo de betabel almacenado a 22°C, se observó inactivación progresiva de los patógenos; esta inactivación posiblemente sea el resultado del efecto antagónico de la flora nativa del betabel.
6. No se observó desarrollo de *S. typhimurium* ni de los tres grupos patógenos de *E. coli* en jugo de betabel almacenado en refrigeración.
7. *S. typhimurium* y los tres grupos patógenos de *E. coli* tienden a morir en jugo de betabel almacenado en refrigeración.

8. Los jugos analizados representan un riesgo para la población consumidora. Es conveniente llevar a cabo una vigilancia más estricta en la elaboración de jugos, tanto de las autoridades como de los productores.
  
9. Como en los países desarrollados, se debe regular la venta y consumo de jugos crudos; la venta de jugo crudo sólo se debería permitir siempre y cuando el producto se haya obtenido bajo sistemas adecuados de higiene tales como el HACCP.
  
10. Mientras no se modifiquen las medidas higiénicas durante la producción y comercialización de jugos de betabel en los sitios analizados, el estudio sugiere no consumir jugo de betabel crudo debido al riesgo potencial que existe.

### **VIII.- SUGERENCIAS**

Debido al aparente efecto antimicrobiano que se observó en el estudio realizado con jugo de betabel, se recomienda iniciar estudios para determinar la presencia de posibles sustancias antimicrobianas en el betabel. Esto con la finalidad de aislarlas y utilizarlas como posibles conservadores naturales en alimentos.

## IX. - REFERENCIAS

1. American Public Health Association. (APHA). 1985. Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th ed. Washington, DC: APHA.
2. Andrews, H. W., Diggs, C. D. Miescier, J. J. Wilson, C. R., Goodwin, C. P. Adams, W. N. Furtari, S. A. y Musselman J. F. 1976. Validity of members of the total coliform and fecal coliform groups for indicating the presence of *Salmonella* in the *Mercenaria mercenaria*. *J. Milk Food Technol.* 39: 322-324.
3. Archer, D. L. y Kvenberg, J. E. 1985. Incidence and cost of foodborne diarrheal disease in the United States. *J. Food Prot.*, 48: 887-894.
4. Aryes, H. M. Payne, D. N. Furr, J. R. y Russell, A. D. 1998. Use of the Malthus-AT system to assess the efficacy of permeabilizing agents on the activity of antibacterial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology* 26, 422.
5. Bagamboula, C. Uyttendaele, M. y Debevere J. 2002. Acid tolerance of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *J. appl. Microbiol.* 93(3):497-486.
6. Belitz, H. D. y Grosch, W. 1997. "Química de los alimentos". 2ª ed. Ed. Acribia. Zaragoza.
7. Benenson, A. S. Ed. 1990. Control of Communicable Diseases in Man. 15th Ed. *Am. Pub. Health Association*, Washington, DC.
8. Beuchat, L. R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.*, 59:204-216.
9. Beuchat, L. R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. World Health Organization, food Safety Unit WHO/FSF/FOS/98.2.



10. Bibek, R. 2001, Salmonellosis by *Salmonella*, Fundamental Food Microbiology. New York, D.C. p. 409-417.
11. Blostein, J. 1993. An outbreak of *Salmonella java* associated with consumption of watermelon. *J. of Food Microbiology*. 56:29-31.
12. Brayan, F. L. 1988. Critical control point of street vended foods. *J. of Food Protect.* 51:373-84.
13. Brul, S. y Coote, P. 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *J. of Food Microbiology* 50, 1–17.
14. Buck, J. W. Walcott, R. R. y Beuchat, L. R. 2003. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. Online. *Plant Health Progress*. 10: 121-134.
15. Caballero, A. T. Legomín, M. F. Monterrey, P. G. y Arcia J. T. 1997. Principios de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control en la venta callejera de alimentos. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. *Rev. Cubana Aliment.* (2): 84-88.
16. Caballero, T. A. Carrera, V. J. y Legomin F. M. 1998. Evaluación de la vigilancia microbiológica de alimentos que se venden en las calles. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. *Rev. Cubana*. 12(1):7-10.
17. Castillo, A. A. Dickson, J. S. Clayton, R. P. y Lucia G. R. 1997. Eficiencia de un método químico de disolución de pelo en la reducción bacteriana de origen fecal en la piel de bovino. XIV Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los alimentos. Guadalajara, Jal. México.
18. CDC. 1979. *Salmonella oranienburg* gastroenteritis associated with consumption of precut watermelons – Illinois. *Morb. Mort. Weekly Rep.* 28:522-523.

19. CDC. 1991. Multistate outbreak of *Salmonella poona* infections – United States and Canada, 1991. *Morb. Mort. Weekly Rep.* 40:549-552.
20. Cliver, D. O 1997. Foodborne viruses. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds.) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, Washington, DC, American Society for Microbiology. p. 437-446.
21. Cliver, D. O. 1990. Foodborne Diseases. Acad. Press.
22. Cody, S. H. Glynn, M. K. y Farrar J. A. 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Ann Intern Med*; 130:202-9.
23. Conner, D. E. y Beuchat, L. R. 1984. Sensitivity of heat-stressed yeasts to essential oils of plants. *Appl. Environmental Microbiology* 47: 229–233.
24. Costin, I. D. Voiculescu, D. y Gorcea V. 1964. An outbreak of food poisoning in adults associated with *Escherichia coli* serotype 086:B7:H34. *Pathol. Microbiol.* 27:68-78.
25. Deak, T. y Beuchat, L. R. 1993. Yeasts associated with juice concentrated, *J. Food Safety Prot.* (50):243-264.
26. Di´Aoust, J. Y. 1997. *Salmonella* species In: Doyle, M. P. Beuchat, L. R. and Montville T. J. (eds.) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington, DC, American Society for Microbiology Press. p. 129-158.
27. Doyle, M. P. Zhao, T. Meng, J. y Zhao S. 1997. *Escherichia coli* O157:H7. In: Doyle, M. P. Beuchat, L. R, and Montville TJ (eds.) *Food Microbiology: Fundamental and Frontiers*. Washington, DC, American Society for Microbiology, p. 171-191.

28. Duncan, D. W. y Razzell, W. E. 1972. *Klebsiella* biotypes among coliform isolated from forest environments and farm produce. *Appl. Microbiol.* 24: 933-938.
29. DuPont, H. L. Chappell, C. L. Sterling, C. R. Okhuysen, P. C. Rose, J. B. y Jakubowski W. 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl J Med*; 332:855-9.
30. F.A.O., 2001. Disponible en:  
[http://www.infoagro.com/herbaceos/industriales/remolacha\\_azucarera.htm](http://www.infoagro.com/herbaceos/industriales/remolacha_azucarera.htm).
31. F.A.O., 1989. La venta de alimentos vendidos en las calles. Estudio F.A.O. Alimentación y nutrición 46. Roma. p. 69-74.
32. FDA US 2000. Experience with Microbial Hazards in Fresh Produce. LeeAnne Jackson, Ph.D. Center for Food Safety and Applied Nutrition Food and Drug Administration. Presented to the EC Scientific Committee for Food, March.
33. FDA/CFSAN., 2001. Bacteriological Analytical Manual Online, <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>. Equivalent a Bacteriological Analytical Manual, 1988, 8<sup>a</sup> ed. AOAC Intern. USA.
34. Fernández, E. E. 1997. Manual de Curso de Microbiología Sanitaria de Agua y Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
35. Fernández, E. E. 1981. Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos. Universidad de Guadalajara, México. p. 209-349.
36. Fernández, E. E. 2000. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, México.

37. Flippim, R. S. y Mickelson, M. N. 1960. Use of *Salmonellae* antagonists in fermenting egg white. *Microbial antagonists of Salmonellae. Appl. Microbiol.* (8): 366- 370.
38. Fratamico, P. M., Deng, M. Y., Strobaugh, T. P. y Palumbo, S.A. 1997. Construction and characterization of *Escherichia coli O157:H7* strains expressing firefly luciferase and green fluorescent protein and their use in survival studies. *J. Food Prot.* 60 (10):1167-1173.
39. Fuentes, A. F. 2005. Calidad sanitaria de alimentos disponibles al público de la ciudad de Obregón, Sonora, México. Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias. Instituto Tecnológico de Sonora.
40. Funel-Ionvaud, A. y Joyeus, A. 1993. Antagonism between lactic acid bacteria of wines: inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*. *J. of Food Microbiol.* 10: 411-419.
41. Galli, A. Franzetti, L. y Briguglio, D. 1985 Antimicrobial properties *in vitro* of essential oils and extract of spices used for food. *Industrial Alimentaries*, 24, 463–466.
42. Gebhardt, S. E. y Matthews, R. H. 1988. Nutritive value of foods. USDA-HNIS, Home and Garden Bull. 72, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, U.S.A., p. 72.
43. Geldreih, E. E. y Clarke, N. A. 1966. Bacterial pollution indicators in the intestinal tract of freshwater fish. *Appl. Microbiol.* 14: 184-187.

44. Gilliland, S. E. y Speck, M. L. 1972. Interactions of food starter cultures and food borner pathogens: lactic streptococci versus staphylococci and *salmonella*. *J. of Food. Milk Technol.* 35: 307-310.
45. Gilliland, S. E. y Speck, M. L. 1977 Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food borne pathogens in associative cultures. *J. of Food. Prot.* 40: 820-823.
46. Goepfert, J. M. y Hicks, R. 1969. Effect of volatile fatty acids on *Salmonella typhimurium*. *J. of Bacteriol.* 97: 956-958.
47. Griffin, A. M. y Stuart. 1940. An ecological study of de coliform bacteria. *J. Bacterial.* 40: 83-100.
48. Hargrove, R. E. Mc Donough, F. E. y Mattingly, W. A. 1969. Factors affecting survival of *Salmonella* in Cheddar and Colby cheese. *J. Milk Food Tecnol.* 32: 480-484.
49. Harris, L. J. Farber, J. N. Beuchat, L. R. Paris, M. E. Suslow, T. V. Garrett, E. H. y Busta F. F. 2003. Outbreaks Associated with fresh produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* p. 83.
50. Hatcher, W. S. Weihe, J. L. y Splittstoesser, D. F. 1992. Fruit Beverages: 953-960. In: Vandederzant, C. and Splittstoesser, D. F. (Eds). Compendium of methods for the microbiological Examination of Foods. Am. Pub. Health Assoc., Washington, DC.
51. Hedberg, C. MacDonald, K. L, y Osterholm M. T. 1994. Changing epidemiology of food-borne disease: a Minnesota perspective. *Clin. Infect. Dis.* 18:671-682.

52. Hsin-Yi C, y Chou C. 2001. Acid adaptation and temperature effect on the survival of *Escherichia coli* 0157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. *Int. J. of Food Microbiology*. 70 (1-2):189-195.
53. Hug, A. y Colwell, R. R. 1995. A microbiological Paradox: Viable but Nonculturable Bacterial with Special Reference to *Vibrio cholerae*. *J. of Food. Prot.* 59 (1): 96-101.
54. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1986. Microorganisms in foods. 2. Sampling for Microbiological analysis: Principles and Specific Application. 2<sup>nd</sup> ed. Toronto: University Toronto Press.
55. ICMSF. (International Commission on Microbiological Specification for Foods). 1980. Microbial ecology of Foods. Factors Affecting Life and Death of Microorganisms. Acad. Press.
56. Jay, M. J. 2000. Indicadores de la calidad e inocuidad microbiana de los alimentos. *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza España, p. 366-369.
57. Kapperud, G. Gustavsen, S. Hellesnes, I. Hasen, A. H. Lassen, J. Hirn, J. Jahkola, M. Montenegro, M. A. y Helmuth, R. 1990. Outbreak of *Salmonella typhimurium* infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60 megadalton virulence plasmid. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2597-2601.
58. Khan, M. R., Saha, M. L. y Kibria, A. H. M. G. 1992. A bacteriological profile of salad vegetables in Bangladesh with special reference to coliforms. Abstract, *Lett. Appl. Microbiol.* 14 (3) 88.
59. Levita, M. M. Nalin, D. R. y Hoove, D. L. 1979. Immunity to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 23: 736-739

60. Meza, G. J. C. 2000. Preservación de la inocuidad del requesón mediante la incorporación de bacterias lácticas Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
61. Millard, P. S. Gensheimer, K. Fy Addiss D. G. 1994. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. 272:1592-6.
62. Miller, L. G. y Kaspar W. 1994. *Escherichia coli* 0157:H7 acid-tolerance and survival in apple cider. *Food Safety*. 57:460-464.
63. Moreno, D. A. 1982. Enfermedades de origen microbiano transmitidas por los alimentos. Microbiología de los alimentos. Zaragoza España.
64. Noguera, U.Y., 2005. Frecuencia de *Salmonella*, *E. coli* y organismos coliformes en ensaladas listas para su consumo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura en Química en Alimentos.
65. Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Procedimiento para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Secretaría de Salud. México.
66. Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del Número Más Probable. Secretaría de Salud. México.
67. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de organismos coliformes totales en Placa. Secretaría de Salud. México.
68. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Secretaría de Salud. México.

69. OPS/OMS. 1994. Evaluación del riesgo microbiológico de los alimentos vendidos en la vía pública de América latina. PAHO/HCV/94/003. ABRIL, 45.
70. Parish, M. E. 1998. Food and Drug Administration Docket, Comment, Dockets Management Branch (HFA-305), Food and Drug Administration, Parklawn Drive, Rockville, M.D. 60: 12420.
71. Parish, M. E. Narciso, J. A. y Friedrich L. M. 1997. Survival of *Salmonella* in orange juice. *J. of Food Safety* 17:273-81.
72. Parish, M.E. y Higgins, D.P. 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *Food Prot.* 52(3):144-147.
73. Pattee, H.E. 1985. "Evaluation of Quality of Fruits and Vegetables". Ed. Avi. Publishing Company, Inc. Westport. Conneticut.
74. Pao, S. y Brown, G. E. 1998. Reduction of microorganisms on citrus fruit surfaces during packinghouse procedures. *J. of Food Prot.* 61(7):903-906.
75. PHLS. 1996. (Public Health Service Laboratory Service), Communicable Disease Reports, Vols. 6. No. 15: 24-37.
76. Prokopowich, D. y Blank, G. 1991. Microbiological evaluation of vegetables sprouts and seeds. *J. of Food Prot.* 54: 560-562.
77. Ramis, V. M., 1996. *Salmonella*, Microbiología de los alimentos. Características de los patógenos microbianos. Zaragoza España, p. 308-321.
78. Ramirez, J. S. Solis, G. G. y Gómez, C. E. 2001. Regulación Genética en Respuesta al Estrés Calórico en *Escherichia Coli*. Asociación Latinoamericana de Microbiología. *Rev. Latinoamericana de Microbiologia.* 43: 51-63.



79. Rangana S. 1986. "Handbook of Analysis and Quality Control for Fruit and Vegetable Products". Mc.Graw-Hill Publishing Company, Ltd. New York.
80. Ries, A.A., Zaza, S. Langkop, C. Tauxe, R.V. y Blake P.A. 1990. A multistate outbreak of *Salmonella* chester linked to imported cantaloupe, abst. 915. Thirtieth Interscience Conf. Antimicrob. Agents Chemother., Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C. p.238
81. RLAC. 1990. Venta callejera de alimentos. RLAC/90/21/NUT-41. Santiago de Chile, 23.
82. Robins-Browne, M.R. 1987. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev. Inf. Dis.* 9:28-53.
83. Rodríguez A. G. 2002. Principales características de diagnóstico de los grupos de *Escherichia coli*. *Salud Pública Méx.* 4:464-467.
84. Rodríguez, J. J. J. 2001. Las Enfermedades de Transmisión Alimentaria.
85. Rojas T, y Castillo Z. 2003. Supervivencia de un aislado de *Escherichia coli* 0157:H7 en jugos de naranja no pasteurizados de expendio comercial. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 23: 1315-2556.
86. Rojas, O. M., 2005. Comportamiento de tres grupos patógenos de *Escherichia* en cuatro grupos de verduras crudas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura en Química en Alimentos.
87. Samelis, J. 2003. National Agricultural Research Foundation, Greece and J. N. Sofos, Colorado State University, USA. Organic acids. Natural antimicrobials for MPF.

88. Skandamis, P. y Nychas, G. J. E. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physicochemical attributes of mince meat stored in air and modified atmospheres 91: 1011–1022.
89. Sofos, J. N Beuchat, L. R. Davidson P. M. y Johnson E. A. 1998. Naturally occurring antimicrobials in food [unknown]: Council for Agric Sci Technol Task Force. *Report* p. 103-132.
90. Solomon, H. M. y Kautter, D. A. 1988. Outgrowth and toxin production by *Clostridium botulinum* in bottled chopped garlic. *J. of Food. Prot.* 51: 862-865.
91. Soreells, K. M. y Speck, M. L. 1970. Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovorum*. *J. Dairy Sci.* 52: 239-241.
92. Speer C. A. 1997. Protozoan parasites acquired from food and water. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds.) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, Washington, DC, *American Society for Microbiology*. p. 478-493.
93. Splittstoesser, D F. 1973. The microbiology of frozen vegetables. How they get contaminated and which organisms predominate. *Food Technol.* 27: 54- 56.
94. Splittstoesser, D.F., McLellan, M.R. y Churey, J. J.1996. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *J. of Food. Prot.* 59(3):226-229.
95. Stevens, A. K. Klapes A. N. Sheldon, W. B. y Klaenhammer, T. R. 1992. Antimicrobial action of nisin against *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide mutans. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1786-1788.
96. Svennerholm A. M, y Lindblad M, 1985. GM1-ELISA method for demonstration of *E. coli* heat-stable enterotoxin. *FEMS Micribiology letters* 30:1-6.

97. Tauxe, R. E. Kruse, H., Hedberg, C., Potter, M., Madden, J., y Wachsmuth, K., 1997. Microbial hazards and emergencig issues associated whith produce: a preliminary report to the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, *J. of Food Prot.*, 60, 1400.
98. Tauxe, R. E. Emergencing foodborne diseases. 1997. An evolving public health challenge, *Dairy Food Environ. Sanit.* 17, p. 788.
99. Tassou, C. C. 1993 Microbiology of olives with emphasis on the antimicrobial activity of phenolic compounds. Ph.D Thesis, University of Bath, Bath, UK.
100. Torija Isasa, M<sup>a</sup>.E. y Camara Hurtado, M<sup>a</sup>.M. 1999. “*Hortalizas, verduras y frutas*”. En: Hernández, M. y Sastre, A.: Tratado de Nutrición. Ed. Díaz de Santos. Madrid.
101. Uljas H. e Inghan S. 1999. Combinations of intervention treatmens resulting in 5-Log-unit reductions in numbers of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimorium* DT104 organisms in aapple cider. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(5):1924-1929.
102. Vanderzant, C. y Splittstoesser, D. F. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3rd ed. American Public Health Assoc. Washington CD.
103. Viljanen, M. K. T. Peltola, T. Junnila, S. T. Olkkonen, L. Jarvinen, H. Kuistila, M. y Huovinen, P. 1990. Outbreak of diarrhea due to *Escherichia coli* 0111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. *Lancet* 336:831-835.
104. Vincent, J. G., Veonett, R. C. y Riley, R. G. 1959. Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. *Food Safety. Bacteriol.* 78: 477-484.

105. Wang Ling-Lih y Johnson, A. E. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 624-628.
106. WHO expert Committee.1988. Salmonellosis control: The role of animal and product hygiene. *Tech. Report Series 774*, Geneva: World Health.
107. Wisotzkey, J. D. y Jurtshuk, P. Fox, G. E. 1992. Comparative sequence analysis on the 16SrRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldartius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* *gen. Nov. Inf. J. System.Bacteriol.* 42: 263-269.
108. Wisse, C. A. y Parish M. E. 1998. Isolation and enumeration of sporeforming, thermoacidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments. *Dairy Food Environ. Sanit.* 18:504-509.
109. Wills, R. McGlasson, B. Graham, D. y Joyce, D .1999. “Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales”. Ed. Acribia S.A. Zaragoza.

**X. - ANEXO 1**

**FRECUENCIA DE MICROORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE Y *Salmonella* EN JUGO DE BETABEL**

Número de Muestra	Grupo Microbiano			
	OC (UFC/mL)	CF (NMP/ mL)	<i>E. coli</i> (NMP/mL)	<i>Salmonella</i> (+/-)
1	5.2x10 <sup>4</sup>	3	3	-
2	7.0x10 <sup>4</sup>	6.1	6.1	-
3	6.0x10 <sup>4</sup>	3.6	<3	-
4	6.10x10 <sup>4</sup>	9.3	9.3	-
5	8.0x10 <sup>4</sup>	15	9.3	-
6	5.0x10 <sup>4</sup>	6.1	<3	-
7	7.0x10 <sup>4</sup>	3.1	<3	-
8	2.1x10 <sup>4</sup>	210	150	+
9	3.2x10 <sup>4</sup>	1100	28	-
10	1.70x10 <sup>4</sup>	27	11	-
11	3.9x10 <sup>4</sup>	36	29	-
12	1.80x10 <sup>4</sup>	29	15	-
13	4.7x10 <sup>4</sup>	3	<3	-
14	3.3x10 <sup>4</sup>	7.2	<3	-
15	6.5x10 <sup>4</sup>	7.3	<3	-
16	7.8x10 <sup>4</sup>	15	<3	-
17	8.0x10 <sup>4</sup>	7.3	3.6	-
18	4.9x10 <sup>4</sup>	6.1	-3	-
19	5.2x10 <sup>4</sup>	15	3.6	-
20	6.30x10 <sup>4</sup>	20	<3	-
21	1.11x10 <sup>7</sup>	7.3	3.6	-
22	9.5x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-
23	7.8x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-
24	9.8x10 <sup>6</sup>	7.2	<3	-
25	9.5x10 <sup>6</sup>	11	<3	-
26	1.1x10 <sup>7</sup>	7.2	<3	-
27	9.0x10 <sup>6</sup>	3	<3	-
28	3.3x10 <sup>6</sup>	7.3	<3	-
29	2.6x10 <sup>6</sup>	3.6	<3	-
30	1.8x10 <sup>6</sup>	7.3	<3	-
31	3.1x10 <sup>5</sup>	<3	<3	-
32	1.9x10 <sup>5</sup>	<3	<3	-
33	1.7x10 <sup>5</sup>	7.3	3	-
34	5.6x10 <sup>7</sup>	<3	<3	-
35	5.4x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-
36	5.1x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-
37	4.6x10 <sup>6</sup>	9.2	3	-

FRECUENCIA Y COMPORTAMIENTO DE MICROORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE Y *Salmonella* EN JUGO DE BETABEL

38	8.0x10 <sup>6</sup>	24	6	-
39	7.5x10 <sup>6</sup>	24	3	-
40	7.3x10 <sup>6</sup>	42	3	-
41	9.3x10 <sup>6</sup>	20	<3	-
42	1.2x10 <sup>6</sup>	11	<3	-
43	6.8x10 <sup>6</sup>	11	<3	-
44	5.7x10 <sup>6</sup>	3	3	-
45	9.5x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-
46	1.1x10 <sup>7</sup>	<3	<3	-
47	7.2x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-
48	1.0x10 <sup>7</sup>	<3	<3	-
49	7.8x10 <sup>6</sup>	3	<3	-
50	5.1x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-
51	1.0x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-
52	7.7x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-
53	1.2x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-
54	2.0x10 <sup>7</sup>	6.2	3	-
55	4.3x10 <sup>6</sup>	1.4	14	-
56	3.5x10 <sup>6</sup>	0.61	6.1	-
57	5.5x10 <sup>6</sup>	29	16	-
58	5.9x10 <sup>6</sup>	290	75	-
59	6.5x10 <sup>6</sup>	24	20	-
60	4.0x10 <sup>6</sup>	35	20	-
61	4.6x10 <sup>6</sup>	3	<3	-
62	1.0x10 <sup>7</sup>	34	20	-
63	3.5x10 <sup>6</sup>	24	15	-
64	2.0x10 <sup>7</sup>	6.2	6.2	-
65	1.3x10 <sup>7</sup>	3.6	3.6	-
66	1.4x10 <sup>7</sup>	<3	<3	-
67	1.5x10 <sup>7</sup>	6	3	-
68	1.3x10 <sup>7</sup>	3.6	3.6	-
69	1.4x10 <sup>7</sup>	<3	<3	-
70	5.0x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-
71	6.0x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-
72	1.6x10 <sup>7</sup>	<3	<3	-
73	2.6x10 <sup>6</sup>	7.3	7.3	-
74	2.0x10 <sup>6</sup>	6.2	6.2	-
75	5.4x10 <sup>6</sup>	9.4	9.4	-
76	2.8x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-
77	1.8x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-
78	3.3x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-
79	1.6x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-
80	1.5x10 <sup>6</sup>	<3	<3	-