

Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, *Staphylococcus* sp. y hongos en ensaladas para perro calientes expandidas en la ciudad de Maracay, Venezuela

Laura Acevedo, Clever Mendoza y Rafael Oyón

Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela- Maracay, Venezuela

RESUMEN. Las comidas rápidas que se expenden en las calles, poseen fuerte potencialidad para la transmisión de enfermedades gastrointestinales debido a que son alimentos extensamente manipulados. De estos alimentos los vegetales representan un sustrato adecuado para la proliferación de gérmenes patógenos. Se determinó la presencia de Coliformes totales, Coliformes fecales, otras Enterobacterias y *Staphylococcus* sp. y Hongos en las muestras de ensaladas crudas para perros calientes expandidas en el centro de la ciudad de Maracay, Venezuela. Se empleó la técnica del Número Más Probable para cuantificar los Coliformes y *Staphylococcus* sp. Posteriormente se identificaron parcialmente las cepas de Coliformes y de *Staphylococcus* sp aisladas. También se cuantificó la presencia de Hongos en dichas ensaladas. Se les determinó el pH y la acidez y su relación con el crecimiento microbiano. El resultado para Coliformes totales fue $1,44 \times 10^5$ NMP/g; Coliformes fecales $4,57 \times 10^4$ NMP/g; no se detectó *E. coli* en las muestras analizadas, sin embargo de 87 cepas aisladas se determinó la presencia de *Citrobacter freundii* Variedad I (45,09% de las cepas aisladas), *Citrobacter freundii* Variedad II (21,57%), *Enterobacter aerogenes* Variedad I (17,65%) y *Enterobacter aerogenes* Variedad II (15,69%); *Staphylococcus* sp. $3,93 \times 10^6$ NMP/g. Las 52 cepas de presuntos *Staphylococcus* sp. resultaron coagulasa negativa; Hongos $4,5 \times 10^4$ UFC/g, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. fueron identificadas parcialmente. Las ensaladas crudas presentaban un pH y una acidez de 5,92 y 0,78 ml NaOH respectivamente.

Palabras clave: Ensaladas crudas, coliformes, enterobacterias, *Staphylococcus* sp., hongos, pH, acidez.

SUMMARY. Total and fecal coliforms, some enterobacteria, *Staphylococcus* sp. and moulds in salads for hot dogs sold in Maracay city, Venezuela. Fast food sold on the streets are good vehicle to transmit gastrointestinal diseases to consumers because they are highly manipulated. The vegetables are a good media for pathogens growth. Raw vegetable salads for hot dog sold in Maracay were studied. Total and fecal Coliforms and *Staphylococcus* sp. were quantified by the Most Probable Number Technique. Coliforms and *Staphylococcus* isolated were partially identified. Also the mould population was quantified and identified. Microbial growth was correlated with pH and acidity measurements. MPN/g of Total Coliforms was $1,44 \times 10^5$ and $4,57 \times 10^4$ for fecal Coliforms. *E. coli* was no detected. 87 isolated from the Coliforms were partially identified as *Citrobacter freundii* variety I (45,09% of the isolated), *C. freundii* variety II (21,57%), *Enterobacter aerogenes* variety I (17,65%) and *E. aerogenes* variety II (15,69%); *Staphylococcus* sp. $3,93 \times 10^6$ MPN/g and all of its isolated (52) were coagulase negative. The mould population was $4,5 \times 10^4$ ufc/g, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. were partially identified. The salads presented a pH of 5,92 and an acidity of 0,78 ml of NaOH.

Key words: Vegetable salads, coliforms, enterobacteria, *Staphylococcus* sp., moulds, pH, acidity.

INTRODUCCION

El consumo de vegetales crudos ha sido asociado a numerosos casos de brotes de enfermedades por microorganismos patógenos. Se han reportado infecciones alimentarias relacionadas con el consumo de vegetales. *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *E. coli* Enterohemorrágica y *Vibrio cholera* han sido asociado a infecciones por el consumo de vegetales crudos, ensaladas de repollo y Champiñones salados (1). *E. coli* también ha sido relacionada a brotes de infecciones alimentarias por el consumo de vegetales y ensaladas (2). Las estadísticas

epidemiológicas indican que el apio (*Arracacea xanthorrhiza*), los tomates (*Lycopersicon esculentum*), lechuga cruda (*Lactuca sativa*), repollo crudo (*Brassica oleracea*), zanahoria (*Daucus carota*) y cilantro (*Corindrum sativus*) son los vegetales más implicados en brotes de gastroenteritis (1,3-5). En Venezuela se han realizado varios estudios sobre la calidad microbiológica de algunos vegetales y de ensaladas crudas comerciales listas para comer, donde se determinó la incidencia de microorganismos como: *Listeria* sp., *L. monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Bacillus* spp. *B. cereus* y *Escherichia coli* (5-10). Los vegetales frescos albergan una población diversa de

microorganismos, son frecuentes cantidades de 10^5 - 10^7 UFC/g. Entre el 80-90% de las bacterias son bastones gram negativos, predominando especies de *Pseudomonas*, *Enterobacter* o *Erwinia* (1). Normalmente las hortalizas no deben ser causa de problemas de salud pública (3). Esto se debe a que son más resistentes a infecciones microbianas que los productos de origen animal. Sin embargo es posible la transmisión de bacterias patógenas por contaminación directa con heces de animales, por el uso de estiércol como abono, agua residuales, o por el uso de aguas contaminadas para regar (4). Otra fuente de contaminación es la inadecuada manipulación de los alimentos, aspecto que ha sido muy relacionado con los expendios de comida rápida y/o lista para llevar. La FAO (11) señala que los alimentos que se venden en la vía pública constituyen una fuente importante de alimentos nutritivos y de bajo costo, especialmente para los sectores pobres de la población urbana; sin embargo, resalta que los mismos han demostrado ser un potencial para causar brotes de intoxicación alimentarios por contaminación microbiológica y por utilización de aditivos no permitidos. El objetivo de esta investigación fue determinar la incidencia de Coliformes totales, Coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y Hongos y Levaduras en un alimento altamente consumido por la población como son las ensaladas para perros calientes expandidas en el centro de la ciudad de Maracay, Venezuela.

MATERIALES Y METODOS

La toma de muestra se realizó en el Bulevar Pérez Almarza, entre la Av. Bolívar y la Av. Páez, de la ciudad de Maracay, Venezuela, luego de haber realizado una encuesta a los vendedores de perros calientes de la zona. Con la realización de la encuesta se pudo conocer:

a.- Las características del expendio (números de expendios, ubicación, estructura física utilizada, horario de trabajo, vigencia de registro sanitario, número de trabajadores por expendio).

b.- Características de la preparación de la ensalada (lugar de preparación, ingredientes, proveedor de los ingredientes, frecuencia de preparación, características de los utensilios, uso y cantidad de agua potable, uso de detergente).

c.- Características de los clientes (niños, adultos, jóvenes, sexo, trabajadores, horario de mayor frecuencia de clientes).

Esta encuesta nos permitió conocer la variabilidad presente en el área a muestrear, sobre los aspectos de: higiene, horarios, obtención y manipulación de la materia prima, con el fin de estimar la cantidad muestras a tomar.

Toma de muestra

Se evaluaron muestras de ensaladas de cinco expendios de perros calientes. En cada expendio se tomaron cuatro muestras. Una muestra por semana, realizando el muestreo

en horas del mediodía (12:00 m-12:30 p.m.), por ser la hora más frecuentada por los consumidores (según la encuesta realizada). Las muestras se tomaron en bolsas de plástico transparentes estériles, tipo clic, por el vendedor en las mismas condiciones que lo hacen para preparar los perros calientes. La cantidad de muestra fue aproximadamente de 30-35 gramos. Seguidamente las muestras fueron transportadas en cava con hielo al laboratorio para ser analizadas inmediatamente.

Cabe señalar que las ensaladas estaban compuestas por pollo, zanahoria y cilantro, troceados finamente y crudas.

Análisis físico - químico

A las muestras de ensaladas se les determinó el pH, según la metodología descrita por la A.O.A.C (12) y el porcentaje de acidez, de acuerdo a la metodología establecida en la Norma COVENIN (13).

Análisis microbiológico

La preparación de la muestra para los análisis microbiológicos se realizó pesando 25 gramos de la misma, y homogeneizándola con 225 mL de agua peptonada (0,1%) con la ayuda de un Stomacher. A partir de la cual se inició las diluciones seriadas correspondiente.

Los análisis microbiológicos incluyeron la determinación de Coliformes totales, Coliformes fecales y la cuantificación e identificación de *Escherichia coli* mediante la técnica de Número Más Probable descrita por la Norma COVENIN (14); la cuantificación e identificación de *Staphylococcus aureus* según la Norma COVENIN (15) y el conteo de Hongos y Levaduras siguiendo la técnica de siembra por profundidad descrita por García (16).

Análisis estadístico

Para la elaboración del diseño experimental se estableció la realización de la encuesta, la cual brindó la información necesaria para establecer dicho diseño.

Las pruebas estadísticas realizadas se basaron en conocer si existía o no diferencias significativas entre las características microbiológicas de las muestras en el tiempo y entre expendios. Además de correlacionar los valores de pH y acidez con la carga microbiana presente. Para ello se utilizó una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis) y una prueba de análisis de varianza y una correlación simple lineal (17).

RESULTADOS Y DISCUSION

De la encuesta realizada los aspectos más importantes fueron:

a.- Frecuencia de preparación de la ensalada: De un total de 10 vendedores de perro caliente encuestados, el 80% preparan las ensaladas una vez al día en sus hogares, antes

de salir a trabajar (6:00 a.m.). Procedimiento que podría afectar en gran medida la calidad microbiológica de la ensalada, ya que el tiempo de almacenamiento y la exposición a temperatura no adecuada permiten el crecimiento microbiano. El 20% de los expendedores prepara la ensalada dos veces al día (6,00a.m. y 2,30 p.m.).

b.- Tipo y origen del agua: Todos los vendedores señalaron usar agua potable. Sin embargo la cantidad de la misma no es suficiente, para mantener una adecuada limpieza del expendio.

c.- Uso de detergente: Todos emplean detergentes en la limpieza del expendio.

d.- Proveedor: Todos los expendios tienen diferentes proveedores de materia prima.

e.- Números de trabajadores por expendios: En todos los expendios trabaja una sola persona.

Análisis físico químicos

Los análisis estadísticos señalan que existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los valores de pH de las ensaladas de los distintos expendios y entre todos los muestreos. En la Tabla 1 se presentan los valores medios de pH por expendio. Se puede apreciar que los valores oscilan entre 4,60 y 6,10. En la Tabla 2 se presentan los valores de acidez por expendio, los cuales se encuentran en un rango de 4,00 y 15,00 ml de NaOH/100g muestra. El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el porcentaje de acidez de las ensaladas de los distintos expendios y entre todos los muestreos. Otros investigadores han reportado valores de pH de 4,97 a 5,79 en ensaladas mixtas y de 5,82 a 6,14 en lechuga (18).

La mayoría de las especies microbianas pueden crecer a un rango de pH comprendido entre 6,60-7,50; sin embargo, existen algunos microorganismos como los hongos y levaduras que pueden desarrollarse en ambientes ácidos. También existen patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. y *Listeria* sp, que pueden crecer en medios con valores de pH de 4,20 (19). De acuerdo a ello se puede señalar que las ensaladas analizadas representan un sustrato adecuado para el crecimiento de muchas especies microbianas.

Análisis microbiológico

En la Figura 1 se muestra la cuantificación de Coliformes totales en las muestras de ensaladas, de los cuatro muestreos para cada uno de los expendios; en dicha figura se puede apreciar que existe una alta carga de este grupo de microorganismos (10^5 NMP/g) en las ensaladas analizadas y que no se presentan diferencias significativas entre los valores obtenidos (entre expendedores y entre muestreos). Otros investigadores han señalado la presencia de Coliformes totales en vegetales frescos, con una incidencia de $3,20 \times 10^5$ y $1,30 \times 10^2$ ufc/g (23, 24).

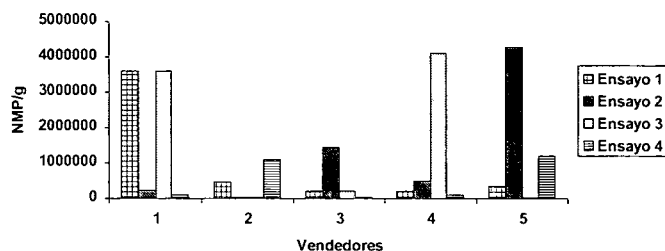
TABLE 1
Valores de pH de las muestras de ensaladas para perros calientes

Muestra	pH
Ensayo 1	1
Vendedor 1	5,90
Vendedor 2	6,10
Vendedor 3	6,00
Vendedor 4	5,90
Vendedor 5	6,10
Ensayo 2	
Vendedor 1	6,00
Vendedor 2	6,10
Vendedor 3	6,00
Vendedor 4	4,60
Vendedor 5	5,90
Ensayo 3	
Vendedor 1	5,80
Vendedor 2	6,00
Vendedor 3	6,00
Vendedor 4	5,60
Vendedor 5	6,00
Ensayo 4	
Vendedor 1	6,10
Vendedor 2	6,10
Vendedor 3	6,20
Vendedor 4	5,90
Vendedor 5	6,10
X	5,92
σ	0,34
Valor máximo	6,20
Valor mínimo	4,60

TABLE 2
Valores de acidez de las muestras de ensaladas para perros calientes

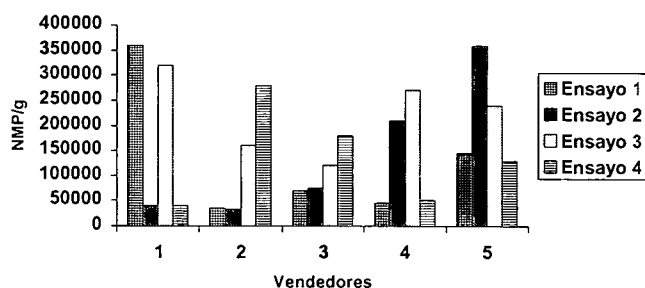
Muestra	Acidez (ml de NaOH)
Ensayo 1	
Vendedor 1	0,60
Vendedor 2	0,50
Vendedor 3	0,40
Vendedor 4	0,40
Vendedor 5	0,50
Ensayo 2	
Vendedor 1	1,20
Vendedor 2	1,00
Vendedor 3	1,00
Vendedor 4	1,50
Vendedor 5	0,70
Ensayo 3	
Vendedor 1	0,70
Vendedor 2	0,50
Vendedor 3	0,90
Vendedor 4	0,70
Vendedor 5	0,70
Ensayo 4	
Vendedor 1	0,80
Vendedor 2	0,80
Vendedor 3	0,90
Vendedor 4	1,10
Vendedor 5	0,70
X	0,78
σ	0,28
Valor máximo	1,50
Valor mínimo	0,40

FIGURA 1
Resultados de la cuantificación de coliformes totales en las muestras de ensaladas



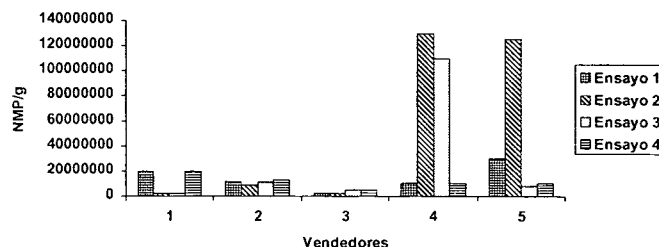
En la Figura 2 se presentan los resultados obtenidos en la cuantificación de Coliformes fecales en las muestras de ensaladas, de los cuatro muestreos para cada uno de los expendios evaluados. En la determinación de este grupo de microorganismos no se encontró diferencias estadísticamente significativas y se obtuvo una media global de $4,57 \times 10^4$ NMP/g. No se encontró *Escherichia coli* en las muestras de ensaladas analizadas, sin embargo, se encontraron otras especies de *Enterobacteriaceae*, como es el caso de *Citrobacter freundii* var. I con un 45,09% del total de las cepas parcialmente identificadas, *Citrobacter freundii* var. II en un 21,57%, *Enterobacter aerogenes* var. I en un 17,65% y *Enterobacter aerogenes* var. II representando el 15,69% de las cepas obtenidas. *E. coli* es de origen intestinal, mientras que *Enterobacter aerogenes* es procedente de los vegetales, aunque ocasionalmente puede ser de origen intestinal (20); aunque no ha sido reportado en vegetales este microorganismo ha sido aislado de helados de crema y de queso "tipo Palmita en Venezuela" (21,22). *Citrobacter freundii* es la especie bacteriana que más abunda en los alimentos, siendo frecuente en las superficies de las hortalizas y carnes frescas (19). Aunque en este estudio no fue encontrado *E. coli*, este microorganismo ha sido aislado a partir de vegetales frescos con una incidencia de 11,60% de las muestras analizadas (24).

FIGURA 2
Resultados de la cuantificación para coliformes fecales en las muestras de ensaladas



En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de *Staphylococcus* sp. El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los distintos muestreos, ni entre los expendios.

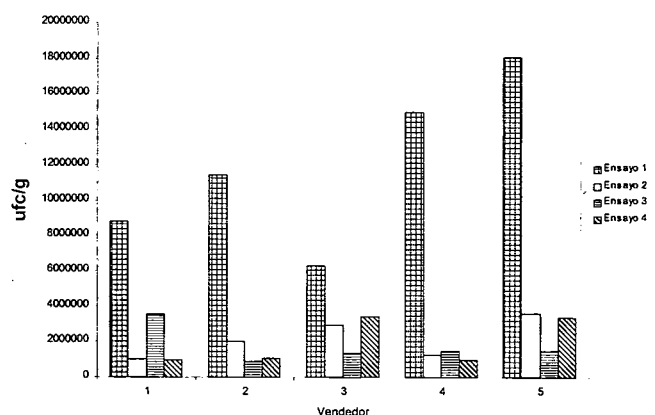
FIGURA 3
Resultados de la cuantificación de *Staphylococcus* sp. en las muestras de ensalada



La incidencia de este microorganismo en las ensaladas analizadas estaba comprendido entre $5,25 \times 10^5$ y $2,50 \times 10^7$ NMP/g. De las cepas obtenidas 95% resultaron cocos en pares y/o racimos gram positivos, y coagulasa negativos.

En la Figura 4 se presentan los resultados obtenidos en el conteo de hongos y levaduras para los diferentes expendios en cada uno de los muestreos realizados. Se puede apreciar que el conteo de hongos y levaduras se encuentra entre $5,70 \times 10^3$ y $5,32 \times 10^7$ ufc/g. Los análisis estadísticos no arrojaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los valores obtenidos para cada expendio y en cada muestreo. La observación microscópica de las colonias que crecieron en Malta Sal Agar mostraron que las especies aisladas de las ensaladas fueron: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., y *Penicillium* sp. y abundantes levaduras. Estas especies de hongos también han sido aisladas por otro investigador a partir de vegetales (lechuga, tomate, brócoli, coliflor y repollo) (23).

FIGURA 4
Resultados del conteo de hongos y levaduras en las muestras de ensaladas



REFERENCIAS

1. Gillian A, Cristopher T and David O. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International J Food Science and Technology*. 1999;34:1-22.
2. Doyle M, Beuchat L and Montville T. *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. Editorial ASM press. Washington D.C. USA. 1997.
3. Adams A y Moss M. *Microbiología de los alimentos*. Editorial Acribia, S.A. España. 1997.
4. Whitfield F. Microbiology of food taints. *International Journal of Food Science and Technology*. 1998. 33: 31-51.
5. Medina M, Hernández P, Kalustian T and Mendoza C. Prevalence of *Plesiomonas shigelloides* in cabbage and lettuce samples from Venezuela. *World Congress Foodborne Infections and Intoxications*. 1998;2: 960-963.
6. Raybaundi R. El céleri (*Apium graveolum* L.) y repollo (*Brassica oleracea* L. var. Capital) como sustrato para el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophila*. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 1994.
7. Guevara L. Ensaladas con mínimo procesamiento como sustrato para el crecimiento y sobrevivencia de *Listeria monocytogenes*. Trabajo de Grado, Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 1997.
8. Pérez V. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en vegetales Frescos. Seminario de Postgrado. U. C.V. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1999.
9. Diaz R. y Guevara L. Patógenos emergentes en productos de origen vegetal. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias. U.C.V. Caracas, Venezuela. 1996.
10. Moreno I. Comportamiento de *Aeromonas hydrophila* en ensaladas con mínimo procesamiento almacenadas a 5°C. Tesis de Grado. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 1997.
11. F.A.O. La venta de los alimentos en las calles, informe de una consulta a expertos de F.A.O. Roma, Italia. 1990.
12. Association of Official Analytical Chemists. A.O.A.C. Washington. 1990.
13. Ministerio de Fomento. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). N° 658-86. Determinación de acidez. Caracas, Venezuela. FONDONORMA. 1986.
14. Ministerio de Fomento. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). No 1104-96. Determinación del Número Más Probable de Coliformes, Coliformes fecales y *Escherichia coli*. Caracas, Venezuela. FONDONORMA. 1996.
15. Ministerio de Fomento. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). No 1292-89. Aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus*. Caracas, Venezuela. FONDONORMA. 1989.
16. Garcia C. *Análisis Microbiológico*. 2da ed. Caracas, Venezuela. Editorial Ciencia 3 S. A. 1990.
17. Montgomery D. *Diseño y análisis de experimentos*. 3ª ed. México. Editorial Iberoamericans. 1991.
18. Odumeru J, Mitchell S, Alves D, Lynch A, Yee A, Wang S, Styliadis S and Farber J. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use -vegetables for health-care food service. *J Food Protection*. 1997; 60:(8): 954-960.
19. Jay J. *Modern Food Microbiology*. 5th edition. Chapman and Hall. Hartford, CT, USA. 1997.
20. Frazier W and Westhoff D. *Microbiología de los alimentos*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 1979.
21. Rodríguez C. Incidencia de *Aeromonas* sp. en productos vegetales con mínimo procesamiento. Trabajo de grado para optar al título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 1994.
22. Ferrer A, Urdaneta D, Rincon Z, CABRERA L and Basanta Y. Microflora isolated from Venezuelan "Palmita-tipe" cheese. *Journal of Food Protection*. 1991;54(11): 856-860.
23. Albrecht J, Hamouz F, Sumner S y Melch V. Microbial evaluation of vegetable ingredients in salad bars. *Journal of Food Protection*. 1994; 58(6): 683-685.
24. Warburton D, Harrison B, Crawford C, Foster R, Fox C, Gour L and Purvis U. Current Microbiological status of "Health Foods" sold in Canada. *International Journal of Food Microbiology*. 1998; 42:1-7.

Recibido: 21-12-2000

Acepadó: 09-08-2001