

Determinación de coliformes totales en refrescos artesanales expendidos en las avenidas independencia y goyeneche de la ciudad de Arequipa, causantes de enfermedades transmitidas por alimentos; Arequipa febrero 2020

Determination of total coliforms in handmade refreshments expanded in avenidas independencia and goyeneche of the city of Arequipa, causing food-transmitted diseases; Arequipa february 2020

Julio Machaca Yana

j.machaca@unaj.edu.pe - Universidad Nacional de Juliaca
<https://orcid.org/0000-0002-8399-7541>

Sandro Condori Pacsi

scondorip@unsa.edu.pe - Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa
<https://orcid.org/0000-0002-6792-5089>

Recibido el 01/02/21 | Aceptado el 15/03/21

DOI: <https://doi.org/10.47190/nric.v3i3.7>

Resumen

Se ha realizado el análisis microbiológico de muestras de bebidas artesanales procedentes de tres avenidas del distrito del Cercado de la Ciudad de Arequipa, la Avenida Independencia, la Avenida Goyeneche y la Avenida Venezuela con el fin de determinar la presencia del NMP de Coliformes Totales. Para ello se inició con la prueba presuntiva, así se empleó el método de fermentación en tubos múltiples con caldo Lauril Sulfato y Caldo de Brila, en los cuales se inoculó una cantidad determinada de la muestra de agua procedentes de cada avenida, examinando al cabo de 24 y 48 horas de incubación la presencia o ausencia de gas. En este análisis microbiológico de las 3 Avenidas se observó tubos que mostraban un resultado positivo con los cuales se calculó el NMP de coliformes basándose en las combinaciones de tubos positivos y negativos según las tablas numéricas que tienen en cuenta los volúmenes de agua y las cantidades de tubos sembrados en una o más series, reportándose los resultados con el NMP es > 1100 coliformes por 100 ml. para la Av. Independencia, 460 coliformes por 100 ml. para la Av. Goyeneche y 93 coliformes por 100 ml. para la Av. Venezuela. Seguidamente se procedió con la prueba confirmativa donde se realizó subcultivos de cada tubo positivo en placas que contenían agar EMB, las mismas que se incubaron a 35° C por 24 horas, trascurrido este tiempo se observaron colonias positivas en los subcultivos donde se seleccionaron las colonias y se inoculó muestras de estas en TSI, LIA, Indol, que luego se incubaron a 37° C por 24 horas finalizando así con la prueba complementaria donde se identificó el tipo de bacteria presente en cada avenida; en la Av. Independencia y Av. Venezuela solo se identificó *Escherichia coli* y en la Av. Goyeneche se identificó *Enterobacter sp.* y *Echerichia coli*.

Palabras claves: *Bebidas artesanales, coliformes, análisis microbiológico, incubación.*

Abstract

The microbiological analysis of samples of handcrafted drinks from three avenues of the Cercado district of the City of Arequipa, Independencia avenue, Goyeneche avenue and Venezuela avenue has been carried out in order to determine the presence of the Total Coliforms NMP. For this, the presumptive test was started, thus the fermentation method in multiple tubes with Lauryl Sulfate broth and Brila Broth was used, in which a certain amount of the water sample from each avenue was inoculated, examining after 24 and 48 hours of incubation the presence or absence of gas. In this microbiological analysis of the 3 Avenues, tubes that showed a positive result were observed, with which the MPN of coliforms were calculated based on the combinations of positive and negative tubes according to the numerical tables that take into account the volumes of water and the amounts of tubes seeded in one or more series, reporting the results with the MPN is > 1100 coliforms per 100 ml. for Independencia Ave., 460 coliforms per 100 ml. for Goyeneche Ave. and 93 coliforms per 100 ml. for Venezuela Ave. Next, the confirmatory test was carried out where subcultures of each positive tube were made in plates containing EMB agar, which were incubated at 35° C for 24 hours, after this time positive colonies were observed in the subcultures where the colonies were selected and Samples of these were inoculated in TSI, LIA, Indole, which were then incubated at 37° C for 24 hours, thus ending with the complementary test where the type of bacteria present in each avenue was identified; in Independencia Ave. and Venezuela Ave. only *Escherichia coli* was identified and in Goyeneche Ave. *Enterobacter* sp. and *Echerichia coli*.

Keywords: Artisanal drinks, coliforms, microbiological analysis, incubation

Introducción

Los Coliformes son un grupo de bacterias cuyo representante más importante, desde el punto de vista sanitario, es la *Escherichia coli*, por ende agrupa a todas las especies bacterianas que son bioquímicamente similares a *E. coli*, tales como *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*. Son bacterias entéricas que cumplen los siguientes requisitos bioquímicos: aerobias o anaerobias facultativas, Gram negativas, no esporógenas, fermentan la lactosa a 35°C en 48 horas.

Existen diversos métodos para cuantificar el número de microorganismos presentes en muestras líquidas y sólidas. Dentro de las técnicas más comunes se encuentra el recuento directo por microscopía de fluorescencia, así como los procedimientos basados en diluciones en serie, haciendo crecer microorganismos en medios de cultivo sintéticos sólidos o líquidos, como el recuento en placa de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) o la estimación por el método del Número Más Probable (NMP).

El método del número más probable fue descrito por McCrady en 1915 y actualmente sigue siendo ampliamente utilizado. En un principio este método fue empleado para estimar el número de microorganismos en muestras de alimentos y aguas. Sin embargo, se ha demostrado que también puede ser aplicado para la determinación de microorganismos aerobios y anaerobios en lodos, sedimentos marinos y suelos contaminados, por tanto este método es aplicable para estimar el número de microorganismos en muestras de suelo y agua, tanto para bacterias aerobias como anaerobias (Díaz, A. 2008).

El grupo coliforme constituyen un grupo heterogéneo con hábitat primordialmente intestinal para la mayoría de las especies que involucra, es constante, abundante y casi exclusivo de la materia fecal, su capacidad de sobrevivencia y multiplicación fuera del intestino también se observan en aguas potables, por lo que este grupo se utiliza como indicador de contaminación fecal en agua; encontrándose que

mientras mayor sea el número de coliformes en agua, mayor será la probabilidad de estar frente a una contaminación reciente.

En las bebidas artesanales (refrescos): Los recuentos totales deben ser bajos y estar ausentes los bacilos coliformes, como en el agua potable. No son raras las alteraciones por levaduras y mohos y pueden causar la elevación del pH permitiendo se desarrollen otros gérmenes menos ácido tolerantes.

En refrescos no carbónicos de frutas, no se inhiben las levaduras por la cantidad de conservante autorizado legalmente. La alteración se controla generalmente mediante la acidez. Tanto estos como en los refrescos carbónicos, el contenido microbiano disminuye con el tiempo (García, V. 2005).

Materiales y métodos

Lugar y fecha de ejecución

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina U.N.S.A. febrero 2020.

Unidad de estudio

Muestras de bebidas artesanales procedentes de las Avenidas: Av. Independencia, Av. Goyeneche, Av. Venezuela.

Determinación del NMP de Coliformes Totales

A) Prueba presuntiva

El frasco sellado y rotulado que contuvo la muestra se desinfectó externamente con alcohol de 70%. Luego con movimientos constantes se homogenizó la muestra de agua iniciando luego el protocolo. Se retiró 10ml de la muestra, utilizando una pipeta esterilizada y se transfirió a un tubo de ensayo que contiene 90ml de caldo peptonado, con la misma pipeta se retiraron 3ml del frasco y se transfirió 1ml a cada uno de tres tubos de ensayo que contienen 10ml de Caldo Lauril Sulfato de doble concentración (10^{-1}); nuevamente con la misma pipeta se retiró 1ml del primer tubo de

ensayo con caldo peptonado y se transfirió a otro tubo con dicho caldo frasco, de este segundo tubo se pipetearon 3ml y se repartió a otro triplete (10^{-2}); se repitió el procedimiento y se obtuvo un tercer triplete (10^{-3}). Luego de inoculada la muestra en los tubos de ensayo se llevó a incubación a 37°C por 24 – 48 horas, seguidamente se observó los tubos que mostraban un resultado positivo con los cuales se calculó el NMP de coliformes basándose en las combinaciones de tubos positivos y negativos según las tablas numéricas que tienen en cuenta los volúmenes de agua y las cantidades de tubos sembrados en una o más series, reportándose los resultados con el NMP por 100 ml.

B) Prueba confirmativa

Seguidamente se realizó subcultivos de cada tubo positivo en placas que contenían agar EMB, las mismas que se incubaron a 35°C por 24- 48 horas. Transcurridas las 48 horas se examinó cuidadosamente los caracteres culturales en la placa de EMB y se anotó tanto las colonias típicas (colonias verde con brillo metálico) así como las colonias atípicas (rosáceas con punto oscuro en el centro al observarlas por el anverso) característica de coliformes.

C) Prueba complementaria

De las colonias antes mencionadas se seleccionó una colonia aislada y se procedió a inocular en tubos con medio de cultivo: agar hierro triple azúcar (TSI), agar lisina hierro (LIA), con inoculación por picada en la profundidad y estriamiento en la superficie. Finalmente se realizó la prueba del INDOL, se llevó a incubación a $35-37^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Posteriormente se finalizó así con la prueba complementaria donde se identificó el tipo de bacterias presentes en las bebidas.

Resultados y discusión

Muestra Procedente de la Av. Independencia

Prueba Presuntiva

Análisis de los tubos de ensayo para jugo de durazno siendo los únicos tubos que en el proceso dieron positivo:

Tabla 1.

Podemos observar el siguiente arreglo: 3-3-3, lo que nos indica que el índice del NMP es > 1100 por 100 ml.

PRODUCCION DE GAS	INCUBACION	
	24 HORAS	48 HORAS
TRIPLE TRIPLE TRIPLE TE N° 1 (10^{-1})	Positivo	Positivo
	Positivo	Positivo
	Positivo	Positivo
TRIPLE TRIPLE TRIPLE TE N° 2 (10^{-2})	Positivo	Positivo
	Positivo	Positivo
	Positivo	Positivo
TRIPLE TRIPLE TRIPLE TE N° 3 (10^{-3})	Positivo	Positivo
	Positivo	Positivo
	Positivo	Positivo

Mediante el método de los tubos múltiples o NMP se determinó el número de coliformes totales para las bebidas artesanales de durazno y chicha morada expandidos en la Avenida Independencia. Después de 48 horas de incubación se determinó que en el primer triplete 3 positivos porque tuvieron la presencia de

gas, posteriormente se verificó los tripletes restantes, de tal manera que se obtuvo un valor para la interpretación de: 3-3-3 para los tres tripletes, en la tabla del Número Más Probable de MC-GRADY de la Guía de Bacteriología 2012 de la Facultad de Medicina de la UNSA y se estableció que el NMP de coliformes totales por 100 mL fue de > 1100 .

Muestra Procedente de la Av. Goyeneche

Prueba Presuntiva

Análisis de los tubos de ensayo para el jugo de Maracuyá, siendo los únicos tubos que en el proceso dieron positivo.

Tabla 2

Podemos observar el siguiente arreglo: 3-3-1, lo que nos indica que el índice del NMP es 460 por 100 ml.

PRODUCCION DE GAS	INCUBACION	
	24 HORAS	48 HORAS
TRIPLE TRIPLE TRIPLE TE N° 1 (10^{-1})	Positivo	Positivo
	Positivo	Positivo
	Positivo	Positivo
TRIPLE TRIPLE TRIPLE TE N° 2 (10^{-2})	Negativo	Positivo
	Negativo	Positivo
	Negativo	Positivo
TRIPLE TRIPLE TRIPLE TE N° 3 (10^{-3})	Negativo	Positivo
	Negativo	Negativo
	Negativo	Negativo

Por el método de los tubos múltiples se determinó el número de coliformes totales para las bebidas artesanales de Higo y Maracuya expandidos en la Avenida Goyeneche. Dando como resultado que los tubos de Higo no presentaron gas y acidez caso contrario ocurrió con los tubos de Maracuya los cuales en su mayoría dieron positivo. Después de 48 horas de incubación se determinó que 7 de los 9 tubos dieron positivo a la presencia de gas y acidez, determinando un valor para la interpretación de: 3-3-1 para los tripletes, en la tabla del Número Más Probable de MC-GRADY de la Guía de Bacteriología 2012 de la Facultad de Medicina de la UNSA y se estableció que el NMP de coliformes totales por 100ml fue de 460.

Muestra Procedente de la Av. Venezuela

Prueba Presuntiva

Análisis de los tubos de ensayo para el jugo de Maracuya, siendo los únicos tubos que en el proceso dieron positivo.

Tabla 3

Podemos observar el siguiente arreglo: 3-2-0, lo que nos indica que el índice del NMP es 93 por 100 ml.

PRODUCCION DE GAS	INCUBACION	
	24 HORAS	48 HORAS
TRIPLE TRIPLE TRIPLE TE N° 1 (10^{-1})	Positivo	Positivo
	Positivo	Positivo
	Negativo	Positivo
TRIPLE TRIPLE TRIPLE TE N° 2 (10^{-2})	Positivo	Positivo
	Negativo	Positivo
	Negativo	Negativo
TRIPLE TRIPLE TRIPLE TE N° 3 (10^{-3})	Negativo	Negativo
	Negativo	Negativo
	Negativo	Negativo

Mediante el método de los tubos múltiples o NMP se determinó el número de coliformes totales para las bebidas artesanales de Lucuma y Maracuya

expendidos en la Avenida Venezuela. Después de 48 horas de incubación se determinó que en el primer triplete 3 positivos porque tuvieron la presencia de gas, posteriormente se verificó los tripletes restantes, de tal manera que se obtuvo un valor para la interpretación de: 3-2-0 para los tres tripletes, en la tabla del Número Más Probable de MC-GRADY de la Guía de Bacteriología 2012 de la Facultad de Medicina de la UNSA y se estableció que el NMP de coliformes totales por 100 ml. fue de 93.

Prueba Confirmativa y Prueba Complementaria

Tabla 4
Coliformes presentes en muestras procedentes de las avenidas Independencia, Goyeneche y Venezuela.

AVENIDAS	COLIFORMES	
Independencia	<i>Escherichia coli</i>	
Goyeneche	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter</i>
Venezuela	<i>Escherichia coli</i>	

Discusión

Los resultados respecto a la calidad Microbiológica de los refrescos artesanales, que se expende en plena vía pública presentan contaminación microbiana, encontrándose por encima de los límites mínimos permisibles que contempla la “Norma sanitaria sobre criterios microbiológicos de calidad Sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo Humano aprobado por Resolución Ministerial N° 591-2008/MINSA). *Escherichia coli* fue la bacteria presente, en casi todas las pruebas. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas y viven en el intestino de animales y humanos sanos (FAO, 2011).

Esta situación constituye un factor de riesgo para la salud humana por casos de toxiinfección alimentaria, ya que la falta de control, higiene y capacitación en la preparación, expendido, manipulación de los envases (al momento de la preparación, el transporte, y en el expendido de pequeñas botellas de plástico). El contexto en que estas bebidas son manipuladas, esta dada por la calidad de estas bebidas que viene a estar limitada por los bajos precios a los que son ofertados al público, de tal manera que el ingreso mínimo no solventa los gastos en la preparación y la manipulación de bebidas artesanales, tal es el caso de que se recurre a envases reciclados e higiénicamente no aptas; esto sumado a los lugares en que son expendidos, el utillaje utilizado y la falta de equipamiento de limpieza y que por las mismas condiciones al aire libre no cubren las condiciones necesarias, conformando una potencial fuente de contaminación para las bebidas artesanales, poniendo en riesgo la salud de los consumidores.

Cabe destacar que la calidad microbiológica de los refrescos artesanales que se expenden en la vía pública presenta contaminación microbiana ya que la contaminación se puede todos los aspectos ya mencionados anteriormente, coincidiendo con lo establecido por la (FAO/OMS. 2001), la cual afirma que los puntos crítico de control son: manipuladores,

superficies y forma de expendio; y estos no son controlados por las autoridades sanitarias y no se le da la importancia debida.

Adriazola H. (1998). En su resultado de Contaminación Microbiológica de los alimentos preparados en los comedores populares del Distrito de Hunter y características relacionadas se encontró que el 75% de los alimentos no son aptos para el consumo humano encontrándose en su mayoría *E.coli*, siendo esta la bacteria que se encontró con mayor frecuencia en los refrescos analizados; de igual forma también se encontró *Enterobacterias* que siendo bacterias no relacionadas con patologías importantes a nivel gastrointestinal son consideradas como indicadores de inadecuada higiene.

En el presente estudio la prevalencia de contaminación en las bebidas artesanales puede deberse a una mala manipulación de los insumos en la preparación, transporte y expendio de las bebidas.

En la muestra procedente de la Av. Goyeneche se encontró más de 1100 / 100 ml de gérmenes coliformes totales lo cual no cumple con el artículo 15 según el grupo 16 subgrupo 3 de la Norma Sanitaria Sobre Criterios Microbiológicos De Calidad Sanitaria E Inocuidad Para Los Alimentos Y Bebidas De Consumo Humano MINSA/ DIGESA que indica que el límite que separa la calidad aceptable de la rechazable para aguas envasadas carbonatadas y no carbonatadas es menor a 1,1/ 100 ml.

En las muestras de bebidas analizadas se observó que las botellas no presentaban fecha de elaboración ni vencimiento, tampoco rótulo que identifique el establecimiento elaborador, también se encontró suciedad exterior y desgaste de recipientes, a lo que pueda deberse la presencia de gérmenes lo que concuerda con la investigación “Evaluación De Nitratos, Nitritos Y Contaminación Microbiológica En Agua Envasada Para Consumo Humano” de Guerín M.

Según Ávila T. 2008 Los alimentos pueden ser contaminados por manipuladores de alimentos infectados que practican una defectuosa higiene personal o por contacto con agua contaminada con aguas residuales humanas. La medida importante para prevenir la intoxicación alimentaria incluyen la formación de los operarios que manipulan alimentos en cuanto a técnicas de manipulación inocua de los alimentos y a higiene personal adecuada.

Cada establecimiento debe tener por escrito todos los procedimientos, incluyendo los agentes y sustancias utilizadas así como las concentraciones o formas de uso y los equipos e implementos requeridos para efectuar las operaciones y periodicidad de limpieza y desinfección” Este factor es crítico ya que las frutas contienen en la superficie gran cantidad de

microorganismos incluyendo patógenos como Salmonella, Shigella que pueden llegar a causar enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Ávila 2008).

Bibliografía

APHA – AWWA - WPCF, (2000). Métodos normalizados para el análisis de Agua Potable y Residual. 17 Edición. Editorial Díaz de Santos. Madrid, España. 1147 Págs.

Arroyo A. (2007). Calidad microbiológica de algunas bebidas de expendio ambulante de la ciudad de barquisimeto.

Ávila G. Fonseca, M. (2008). Calidad microbiológica de jugos preparados en hogares de bienestar familiar en la zona norte de Cundinamarca.

Díaz, A. (2008). Determinación de coliformes totales y fecales en caballa”

FAO, (2011). Prevención de Escherichia coli en los Alimentos. Marco de Gestión de Crisis Para la Cadena Alimentaria.

FAO/OMS. (2001) Código de Prácticas del Codex Alimentarius, Principios Generales de Higiene de los Alimentos (CAC/RCP 1-1969, Rev. 3-1997, Amd. [1999]; Sección VII - Instalaciones: Higiene Personal), del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, Comisión del Codex Alimentarius. Requisitos generales (higiene de los alimentos). Segunda edición. Roma.

García, V. (2005). Recuento de coliformes. Análisis microbiológico de bebidas. Universidad Nacional Federico Villarreal.

Gómez, E. (2002). Higiene en alimentos y bebidas. Quinta edición. Editorial trillas. México.

Gómez, M.; Peña, P.; Vásquez, M. (1999). Determinación y diferenciación Escherichia coli y Coliformes Totales usando un sustrato cromógeno. Laboratorio Central. Aquagest .Galicia, España.

<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/embagar.htm> (3)

<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/verdebribilis.htm> (2)

<http://www.dibico.com/fichast/1307.pdf> (1)

Manafi, M. (1998). New approaches for the fast detection of indicators, in particular enzyme detection methods (EDM).

Ministerio De Salud. Norma sanitaria sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano.

Oms (1985). Guías OMS para la calidad del agua de bebida. Volumen 1. Publicación científica ops nx 481.

Organización Mundial De La Salud. (1998). “Guía sobre los requisitos de las practicas adecuadas de fabricación”. Segunda parte “validación”. Ginebra.

Organización Panamericana De La Salud. (1987). “Guías para la calidad del agua Potable. Volumen 2, criterios relativos a la salud y otra información base”. Organización Mundial de la Salud, Publicación Científica N° 506 Washington D.C

Shekhar N.C; Singh C.P And Y Laxman N.Y. (2007). Medicinal smoke reduces airborne bacteria. Journal of Ethnopharmacology, 3, 446-451.

Tortora, G. (1993). Introducción a la Microbiología. Editorial Acribia. Zaragoza. España.

