



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

RESISTENCIA BACTERIANA Y CALIDAD MICROBIOLÓGICA
DE NECTARES DE FRUTAS DISTRIBUIDOS POR EL GOBIERNO
EN 5 PARROQUIAS DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA

Trabajo de Integración curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA:

DANIELA GISELL PULGAR CHÁVEZ

Riobamba – Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

RESISTENCIA BACTERIANA Y CALIDAD MICROBIOLÓGICA
DE NECTARES DE FRUTAS DISTRIBUIDOS POR EL GOBIERNO
EN 5 PARROQUIAS DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA

Trabajo de Integración curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: DANIELA GISELL PULGAR CHÁVEZ

DIRECTORA: DRA. ADRIANA MONSERRATH MONGE MORENO.

Riobamba – Ecuador

2023

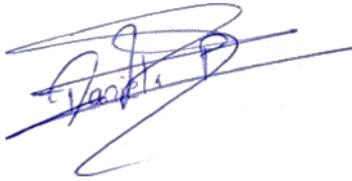
© 2023, Daniela Gisell Pulgar Chávez

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Daniela Gisell Pulgar Chávez, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 30 de junio 2023



Daniela Gisell Pulgar Chávez

060518871-3

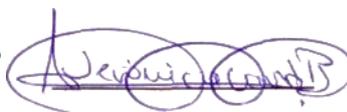
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; tipo: Proyecto de Investigación, **RESISTENCIA BACTERIANA Y CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE NÉCTARES DE FRUTAS DISTRIBUIDOS POR EL GOBIERNO EN 5 PARROQUIAS DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA**, realizado por la señorita: **DANIELA GISELL PULGAR CHÁVEZ**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

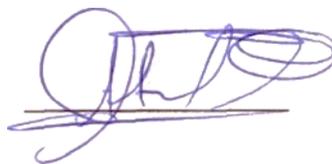
FECHA

Dra. Verónica de las Mercedes Cando Brito
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



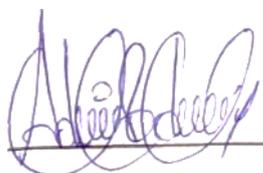
2023-06-30

Dra. Adriana Monserrath Monge Moreno.
**DIRECTORA DEL TRABAJO DE
INTEGRACIÓN CURRICULAR**



2023-06-30

Dra. Adriana Isabel Rodríguez Basantes
**ASESORA DEL TRABAJO DE
INTEGRACIÓN CURRICULAR**



2023-06-30

DEDICATORIA

A mi madre por ser la persona que me ha acompañado durante este trayecto, brindándome su apoyo y ayudándome a no rendirme durante el camino.

A mi padre, mi angelito, quien no tuvo la oportunidad de estar aquí en estos momentos, pero que todo este camino de su mano ha sido mi fortaleza para continuar y no rendirme.

A mis hermanos quienes han sido mis guías y mis mejores amigos durante todo este tiempo, teniendo la certeza que voy a llegar lejos y siempre dándome ánimo para seguir adelante.

Daniela

AGRADECIMIENTO

Como primero agradezco a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por darme apertura a las enseñanzas para poder convertirme en una profesional competente.

A mis padres quienes han sido mi mayor apoyo durante todo el transcurso de la carrera, brindándome inspiración y fuerza para seguir adelante y culminar esta etapa.

A la Dra. Adriana Monge y a la Dra. Adriana Rodríguez, por ser mis tutoras, y haberme dirigido durante todo el proyecto de investigación proporcionándome sus conocimientos y ayuda requerida.

A las autoridades y docentes de la carrera que mediante sus conocimientos nos ayudaron a alcanzar nuestros objetivos profesionales.

Daniela

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	2
1.1	Planteamiento del problema.....	2
1.2	Límites y delimitaciones.....	3
1.3	Problema General de Investigación.....	3
1.4	Problemas Específicos de Investigación	3
1.5	Objetivos	4
1.5.1	<i>Objetivo General</i>	4
1.5.2	<i>Objetivos Específicos</i>	4
1.6	Justificación	4
1.6.1	<i>Justificación Teórica</i>	4
1.6.2	<i>Justificación Metodológica</i>	5
1.6.3	<i>Justificación Práctica</i>	5

CAPÍTULO II

2	MARCO TEÓRICO	6
2.1	Antecedentes de Investigación.....	6
2.2	Referencias teóricas.....	7
2.2.1	<i>Calidad</i>	7
2.2.2	<i>Enfermedades transmitidas por alimentos</i>	9
2.2.3	<i>Análisis microbiológico de néctares</i>	10
2.2.4	<i>Elaboración de néctares de frutas</i>	11

2.2.5	<i>Medios de cultivo</i>	13
2.2.6	<i>Placas Petrifilm</i>	15
2.2.7	<i>Tinción de Gram</i>	16
2.2.8	<i>Resistencia bacteriana</i>	16
2.2.9	<i>Normas de higiene personal</i>	17

CAPÍTULO III

3	MARCO METODOLÓGICO	18
3.1	Enfoque de investigación	18
3.2	Nivel de Investigación	18
3.3	Diseño de Investigación	18
3.3.1	<i>Según la manipulación o no de la variable independiente</i>	18
3.3.2	<i>Según las intervenciones en el trabajo de campo</i>	18
3.4	Tipo de Estudio	18
3.5	Población y Planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra	19
3.5.1	<i>Población y planificación</i>	19
3.5.2	<i>Selección y cálculo del tamaño de la muestra</i>	19
3.6	Métodos, técnicas e instrumentos de Investigación	19
3.6.1	<i>Materiales, equipos y reactivos</i>	19
3.6.1.1	<i>Materiales</i>	19
3.6.1.2	<i>Equipos</i>	20
3.6.1.3	<i>Reactivos</i>	20
3.7	Muestreo	20
3.7.1	<i>Preparación o tratamiento de la muestra</i>	21
3.7.2	<i>Incubación y recuento de UFC/mL en placas Petrifilm</i>	23
3.7.3	<i>Aislamiento e identificación de Coliformes totales</i>	25
3.7.4	<i>Aislamiento e identificación de aerobios mesófilos</i>	25
3.7.5	<i>Aislamiento e identificación de Hongos y levaduras</i>	26
3.7.6	<i>Aislamiento e identificación de Coliformes fecales</i>	26
3.7.7	<i>Aislamiento e identificación (Tinción Gram)</i>	27
3.7.8	<i>Esquema metodológico de pruebas bioquímicas</i>	27
3.7.9	<i>Esquema metodológico para prueba de sensibilidad antimicrobiana</i>	28

CAPÍTULO IV

4	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	29
4.1	Análisis microbiológico de los néctares de frutas.	29
4.1.1	<i>Recuento de Coliformes Totales</i>	30
4.1.2	<i>Recuento de Coliformes fecales</i>	31
4.1.3	<i>Recuento de Aerobios Mesófilos</i>	33
4.1.4	<i>Recuento de Mohos y levaduras</i>	35
4.2	Microorganismos aislados/identificados	36
4.2.1	<i>Microorganismos identificados</i>	37
4.3	Antibiograma	38
4.3.1	<i>Antibiograma de Escherichia coli</i>	38
	CONCLUSIONES	40
	RECOMENDACIONES	41
	GLOSARIO	
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Requisitos microbiológicos para productos pasteurizados	10
Tabla 1-4: Recuento de microorganismos analizados en Placas Petrifilm.....	29
Tabla 2-4: Recuento de Coliformes totales analizados en Placas Petrifilm.....	30
Tabla 3-4: Recuento de Coliformes fecales analizados en Placas Petrifilm	32
Tabla 4-4: Recuento de Aerobios mesófilos analizados en Placas Petrifilm	33
Tabla 5-4: Recuento de Mohos y levaduras analizados en Placas Petrifilm.....	35
Tabla 6-4: Microorganismos aislados/identificados	36
Tabla 7-4: Microorganismos aislados/identificados	37
Tabla 8-4: Resultados del antibiograma de <i>Escherichia coli</i>	38

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-2: Tipos de contaminación	8
Ilustración 2-2: Tipos de eta's	9
Ilustración 3-2: Elaboración del néctar	13
Ilustración 4-2: Tipos de resistencia bacteriana	16
Ilustración 1-3: Esquema de muestreo	22
Ilustración 2-3: Aislamiento de Coliformes	25
Ilustración 3-3: Aislamiento de Aerobios Mesófilos.....	25
Ilustración 4-3: Aislamiento de Hongos y Levaduras	26
Ilustración 5-3: Aislamiento de <i>E. coli</i>	26
Ilustración 6-3: Tinción de Gram	27
Ilustración 7-3: Pruebas Bioquímicas.....	27
Ilustración 8-3: Antibiograma	28

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** TOMA DE MUESTRAS DE NÉCTARES DE FRUTAS
- ANEXO B:** NEUTRALIZACIÓN DE MUESTRA
- ANEXO C:** PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE
- ANEXO D:** INOCULACIÓN EN EL MEDIO PETRIFILM
- ANEXO E:** INCUBACIÓN DE LAS PLACAS PETRIFILM
- ANEXO F:** RECUENTO DE PLACAS PETRIFILM
- ANEXO G:** RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS
- ANEXO H:** TINCIÓN GRAM
- ANEXO I:** ANTIBIOGRAMA
- ANEXO J:** REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS DE LA NORMA NTE INEN 2 337:2008

RESUMEN

El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo realizar el análisis microbiológico y la resistencia bacteriana de los néctares de frutas distribuidos por el gobierno en 5 parroquias de la ciudad de Riobamba para verificar la calidad microbiológica de estos. La toma de muestra y tipo de muestreo se efectuó siguiendo la normativa INEN 1529-2, los indicadores microbiológicos que se analizaron para determinar la calidad microbiológica fueron Coliformes Totales, Coliformes fecales, Aerobios mesófilos, Mohos y levaduras por medio de Placas Petrifilm 3M, por otra parte, el perfil de resistencia bacteriana se realizó por el método de difusión en agar según Kirby Bauer. Mediante esta metodología realizada se obtuvo el recuento de Coliformes totales el cual se mantuvo dentro del estándar de la normativa teniendo que tan solo en 1 muestra hubo un leve crecimiento siendo no significativo de acuerdo con la normativa NTE INEN 2337, en cuanto para coliformes fecales se obtuvo un nulo crecimiento en todas las muestras de las provincias analizadas, al igual que los mohos y levaduras se mantuvieron dentro del parámetro microbiológico siendo nulo su crecimiento y por último para aerobios mesófilos se obtuvo el crecimiento de estos en 3 muestras las cuales se mantuvieron dentro del rango permitido por la norma respectiva. Para la identificación de los microorganismos que se obtuvieron se realizaron pruebas bioquímicas teniendo el crecimiento de una colonia la cual fue *Escherichia coli*. Se concluyó que la calidad microbiológica de los néctares de frutas distribuidos por el gobierno se encuentra en adecuadas condiciones sanitarias y que la bacteria aislada presentó una sensibilidad a Ceftriaxona y a Gentamicina como por otro lado presentó resistencia a los antibióticos como Kanamicina, Tetraciclina y Ampicilina.

Palabras clave: <MICROORGANISMOS>, <ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO>, <RESISTENCIA BACTERIANA>, <ANTIBIOGRAMA>, <NÉCTARES>.



1458-DBRA-UPT-2023

ABSTRACT

The objective of this research project was to conduct a microbiological analysis and bacterial resistance of fruit nectars distributed by the government in 5 parishes in the city of Riobamba to verify their microbiological quality. The microbiological indicators that were analyzed to determine the microbiological quality were total coliforms, fecal coliforms, mesophilic aerobes, molds and yeasts using 3M Petrifilm plates, and the bacterial resistance profile was done using the agar diffusion method according to Kirby Bauer. By means of this methodology, the total coliform count was obtained, which remained within the normative standard, having a slight growth in only 1 sample, which was not significant according to NTE INEN 2337, as for fecal coliforms, no growth was obtained in all the samples of the provinces analyzed, as well as for molds and yeasts, which remained within the microbiological parameter of zero growth, and finally, for mesophilic aerobes, growth was obtained in 3 samples, which remained within the range allowed by the respective standard. For the identification of the microorganisms obtained, biochemical tests were done, with the growth of one colony, *Escherichia coli*. It was concluded that the microbiological quality of the fruit nectars distributed by the government is in adequate sanitary conditions and that the isolated bacteria showed sensitivity to Ceftriaxone and Gentamicin, as well as resistance to antibiotics such as Kanamycin, Tetracycline and Ampicillin.

Keywords: <MICROORGANISMS>, <MICROBIOLOGICAL ANALYSIS>, <BACTERIAL RESISTANCE>, <ANTIBIOGRAM>, <NECTARS>.



0603497397

INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) implican un problema en cuestión de salud pública a escala mundial, la mayoría son de origen microbiano donde el agua y los alimentos se les conoce como las fuentes de transmisión de éstas. Las poblaciones que son más susceptibles son los niños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos, debido a que tienen una disfunción inmunitaria, por ende, la inocuidad alimentaria es muy importante al momento del consumo de alimentos.

Aludiendo a los néctares, los problemas de contaminación se pueden presentar por un fallo en el procedimiento de fermentación debido a una pasteurización defectuosa o un cerrado deficiente del envase, por esto se debe considerar que la eficacia de la pasteurización está en función de la carga microbiana del producto, por lo que es necesario preservar la calidad inocua durante el tratamiento de la materia prima, y trabajar durante todo el proceso con las buenas prácticas de higiene de los alimentos.

El control sanitario e higiénico de los alimentos durante su preparación es esencial para disminuir los factores de riesgo que se pueden dar en las enfermedades transmitidas por alimentos esto con el fin de proteger la salud del consumidor. Los parámetros microbiológicos brindan a la industria alimentaria y a los organismos superiores que los regulan las pautas para vigilar los sistemas de preparación de alimentos.

Como parámetros microbiológicos se utilizan microorganismos indicadores de contaminación, los cuales nos ayudan a verificar si hay presencia o ausencia de microorganismos patógenos en la diversidad de los alimentos existentes; pero a la vez cabe recalcar que muchos de estos microorganismos durante los años han venido generando resistencia bacteriana debido al inadecuado uso de los medicamentos por parte de la humanidad, por lo que a veces el tratamiento dado no es eficiente para poder eliminarlos adecuadamente.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la resistencia bacteriana y comprobar la calidad microbiológica de los néctares de frutas distribuidos por el gobierno en 5 parroquias de la ciudad de Riobamba, de esta manera podemos confirmar si los néctares son idóneos para el consumo humano según los límites permisibles de la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2 337:200.

CAPÍTULO I

1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

Los néctares de frutas tienen un gran contenido de azúcares, vitaminas, agua y sales minerales, debido a esto constituyen un medio óptimo para el crecimiento de diversos microorganismos, por tal motivo la calidad sanitaria desarrolla un papel muy importante durante el proceso de elaboración del néctar, la alteración que se pueda presentar normalmente se elimina mediante una adecuada pasteurización para disminuir la carga microbiana a niveles aceptables (Canaza, 2019: p.11).

Según datos obtenidos de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ha recogido testimonios sobre brotes agudos y severos de enfermedades de transmisión por alimentos, también llamada “intoxicación o infección alimentaria”, esto se lo puede relacionar con el consumo de sidra y bebidas de frutas (FDA, 2022). Se ha concluido que en ocasiones los problemas de contaminación en los néctares de frutas son generados por un mal tratamiento y control microbiológico de la materia prima, también por fallas en el proceso de pasteurización y mencionando también por un mal envasado o un inadecuado almacenamiento del producto final (Canaza, 2019: p.11).

Estudios que se han realizado en la actualidad en América Latina han indicado que ningún proceso de lavado y desinfección es 100% eficaz para eliminar a los patógenos que pudieran venir adheridos a la superficie de la materia prima como son las frutas frescas por ende es necesario el proceso de pasteurización para destruir los posibles agentes patógenos (Campuzano, 2015: p.14).

Comparando los años 2019 y 2020 con respecto a las infecciones del tracto digestivo podemos mencionar que en el año 2020 hubo un decrecimiento de estas enfermedades es decir se disminuyó las cifras de infectados, usualmente se les asocia al consumo de alimentos que han tenido una mala manipulación, cocción y también una mala conservación, siendo fuente de transmisión de microorganismos patógenos de alimentos a personas o de personas a personas (MSP, 2021).

Con respecto al tema de resistencia bacteriana en los últimos años se menciona que ha habido un crecimiento muy notorio, debido al uso irracional de medicamentos, en los últimos estudios realizados de susceptibilidad y resistencia se ha encontrado cada vez más microorganismos

resistentes a los diferentes tipos de antibióticos, causando difícil el tratamiento y buscando medicamentos más inaccesibles para la población.

1.2 Límites y delimitaciones

Mediante la realización de este trabajo investigativo se puede observar limitaciones y delimitaciones, las cuales nos pueden llevar a la imposibilidad de generalizar los resultados de la investigación, debido a que se aplica un muestreo aleatorio por conveniencia en las distintas parroquias de la ciudad de Riobamba que se han establecido para el análisis, por lo tanto, no se otorga aplicar los datos del estudio a un enfoque en general.

1.3 Problema general de investigación

- ¿Los néctares de frutas evaluados en 5 parroquias de la ciudad de Riobamba cumplen con los parámetros microbiológicos que la normativa exige?
- ¿Existen cepas resistentes a antibióticos en los cultivos aislados a partir de los néctares de frutas analizados?

1.4 Problemas específicos de investigación

- ¿El recuento microbiológico de microorganismos indicadores de calidad sanitaria (Aerobios Mesófilos, Coliformes totales, Coliformes fecales, ¿Mohos y levaduras) cumplen con los requisitos estándares definidos en la normativa pertinente?
- ¿Cómo aislar e identificar las bacterias presentes en los cultivos microbianos aislados de los néctares de frutas analizados?
- ¿Cuál es la capacidad de resistencia bacteriana de los microorganismos aislados aplicando la técnica del antibiograma?

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar la resistencia bacteriana y calidad microbiológica de los néctares de frutas distribuidos por el gobierno en 5 parroquias de la ciudad de Riobamba.

1.5.2 Objetivos específicos

- Determinar el número de microorganismos indicadores de calidad sanitaria (Aerobios Mesófilos, Coliformes, Coliformes fecales, Mohos y levaduras) presentes en los néctares de frutas seleccionados, para verificar el cumplimiento de los parámetros microbiológicos definidos en la normativa pertinente.
- Aislar e identificar microorganismos presentes en los cultivos microbianos de los néctares de frutas analizados mediante pruebas bioquímicas.
- Determinar la resistencia bacteriana de los microorganismos identificadas en los néctares de frutas a través del método de difusión en agar.

1.6 Justificación

1.6.1 Justificación teórica

Se puede dar a conocer que la inocuidad de los alimentos incluido todo tipo de bebidas es una de las mayores prioridades de la Organización Mundial de la Salud, esto con el fin de preservar un riguroso protocolo sanitario desde la elaboración del alimento hasta su llegada al comensal, un elemento importante de los riesgos que menoscaban la inocuidad de los alimentos es las zoonosis transmitidas mediante los alimentos, por otra parte también la resistencia a antimicrobianos que ha ido aumentando al pasar los años, debido a esto los comensales están en su derecho de verificar que los alimentos sean inocuos y apoyar sistemas alimentarios sostenibles donde los beneficiarios sean ellos (WHO, 2020).

Por lo mencionado anteriormente el presente trabajo se enfoca en evaluar y verificar la calidad microbiológica de una bebida como lo son los néctares a base de frutas los cuales son distribuidos por el gobierno en las unidades educativas de todo el Ecuador siendo nuestro principal enfoque en la ciudad de Riobamba, esto con el fin de comprobar la seguridad y la inocuidad de la bebida,

durante todo el proceso de elaboración del producto, también la garantía de salubridad para los consumidores, colaborando con la disminución de las ETAs.

1.6.2 Justificación metodológica

La justificación metodológica del siguiente proyecto se basó en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2 337:2008, dentro de la cual se da a conocer los límites microbiológicos para las distintas determinaciones requeridas.

Se realizó el muestreo aleatorio de 5 néctares de frutas en las distintas parroquias de la ciudad de Riobamba, se tomó por triplicado para su posterior análisis.

Y por último dentro del análisis microbiológico nos basamos en la normativa INEN 1529-2, en la cual nos indica la manera correcta de muestrear asépticamente el producto para realizar la solución madre de la muestra y sus posteriores diluciones.

1.6.3 Justificación práctica

La viabilidad del presente proyecto está sustentada en el permitido acceso a los laboratorios de la Facultad de Ciencias, los mismos que disponen de materiales, equipos y reactivos para el estudio microbiológico de las muestras obtenidas. Las muestras son de fácil acceso pues constituyen néctares de frutas que se distribuyen en las unidades educativas de las diferentes parroquias de la ciudad de Riobamba.

CAPÍTULO II

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de investigación

En un estudio sobre el análisis microbiológico y potencial presencia de *Listeria monocytogenes* en pulpas de guanábana, mango y maracuyá costarricenses se determinó algunos indicadores de vida útil, higiene, condiciones del proceso y del almacenamiento, asociando la pulpa de fruta y los microorganismos de las pulpas de guanábana, mango y maracuyá, se analizaron un total de 60 muestras a las cuales se les determinó su pH así como su recuento total aerobio, recuento de mohos y levaduras, bacterias lácticas, número más probable de coliformes totales y fecales y la presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en 25 g del producto, en donde se concluyó que ninguna de las muestras analizadas presentó coliformes totales ni fecales y también que los bajos recuentos obtenidos pueden deberse a la adición de sustancias preservantes pero también porque son productos pasteurizados (Breymann & Chaves,2013).

En otro estudio sobre la evaluación microbiológica y fisicoquímica de los néctares pasteurizados elaborados con pulpa de tomate de árbol donde se evaluaron semanalmente durante 21 días bacterias mesófilas, hongos, levaduras, coliformes totales (NMP/ml), pH, °Brix, acidez titulable, carotenoides totales, vitamina C y azúcares totales. Aquí se concluye que los néctares elaborados presentaron una vida útil de 14-21 días bajo las condiciones de almacenamientos antes señaladas debido a la adecuada calidad microbiológica y fisicoquímica del producto (Álvarez, et.all,2013).

Y por último en un estudio sobre la vida útil de néctar a base de zanahoria con naranja previamente se determinó que los néctares sin pasteurizar duraban máximo dos días para su consumo por lo que se tomó lotes de 29 y 6 unidades, estas fueron sometidas a pruebas aceleradas de estabilidad, para lo cual se dividió a cada lote en 4 muestras, para hacer controles microbiológicos en los días establecidos por el estudio, el primero fue expuesto a 45°C por 10 días, y el segundo a 35°C por 16 días, las dos a una humedad relativa del 75%. El tercer lote se almaceno a condiciones ambientales de la ciudad de Quito, que son 16°C y 55% de HR, por 75 días, y luego se hicieron análisis microbiológicos para determinar la calidad microbiológica del producto la cual paso las pruebas (Delgado, 2012).

2.2 Referencias teóricas

2.2.1 Calidad

Se lo define como el conjunto de características que deben ser aceptadas por el comensal, estas características son: el aroma, su sabor, su apariencia, por ende, es muy importante otras características esenciales como son las sanitarias y las nutricionales. Por esta razón es muy trascendental que durante toda la cadena alimentaria comenzando por el que recolecta los alimentos, siguiendo al que lo distribuye, los mercados y la persona que es el consumidor apliquen y conozcan las buenas prácticas de salubridad, esto con el fin de conservar la inocuidad de los alimentos destinados al consumo (UNNOBA, 2020).

2.2.1.1 Calidad microbiológica

Se la define como el estudio de la cuantificación de microorganismos en un alimento, cuando hay un nivel alto de ellos, nos indica que hay una alta contaminación de alimentos y su consumo puede que produzca una enfermedad transmitida por alimentos. Una de las principales fuentes de transmisión son las manos humanas las cuales están en contacto con el medio ambiente en el cual se encuentran una variedad de patógenos los cuales pueden ser ingresados por las fosas nasales, boca e incluso los genitales del ser humano, se menciona que los alimentos se pueden contaminar por diferentes factores durante la cadena de producción y esto puede terminar siendo un riesgo para los que los consumen (UNNOBA, 2020).

2.2.1.2 Higiene alimentaria

La higiene alimentaria es el grupo de parámetros que aseguran una inocuidad desde la materia prima hasta el producto final, es decir hasta que van a las manos del consumidor. Es muy trascendental tener una buena calidad de los alimentos ya que de esto va a depender en gran parte la salud de la humanidad, debido a que si un alimento está contaminado puede producir problemas de salud muy graves (Garzón, 2018).

2.2.1.3 Contaminación de los alimentos

Se define como contaminación de alimentos a la presencia de sustancias o microorganismos extraños en el alimento, estos pueden afectar su inocuidad, su aspecto, y la calidad óptima para su posterior consumo. Tenemos diferentes tipos de contaminación tanto física, química y microbiológica, la más usual que se da es la microbiológica, en la cual puede haber infecciones o intoxicaciones alimentarias, produciendo un número elevado de personas afectadas (Rosas, 2017: pp.95-100).

- **Contaminación física:** Aquí la contaminación se da cuando en el alimento se encuentra algún elemento extraño, el cual pudo haber caído durante el proceso de elaboración del producto y al no verlo se corre el riesgo de ingerirlo esto puede ser como espinas, cabellos, entre otros (OPS, 2020).
- **Contaminación química:** Se define como la presencia de productos químicos que pueden estar naturalmente o ser añadidos en los alimentos durante el proceso de elaboración y se los considera como dañinos para los seres humanos debido a que estos son nocivos o tóxicos ya sea a corto, mediano y largo plazo, por ende, dañan las propiedades intrínsecas de los alimentos a consumir (Muñoz & Llorca, 2016).
- **Contaminación biológica:** Se define como la presencia de microorganismos como lo son bacterias, virus y hongos, los cuales pueden contaminar los alimentos y estos pueden estar presentes tanto en el ambiente o ser transmitidos por animales al ingerirlos en una inadecuada cocción, también pueden transmitirse por insectos al ser animales portadores, la mayoría de estos alimentos se controla con buenas prácticas de manipulación así evitando cualquier tipo de infección por alimentos (OPS, 2020).

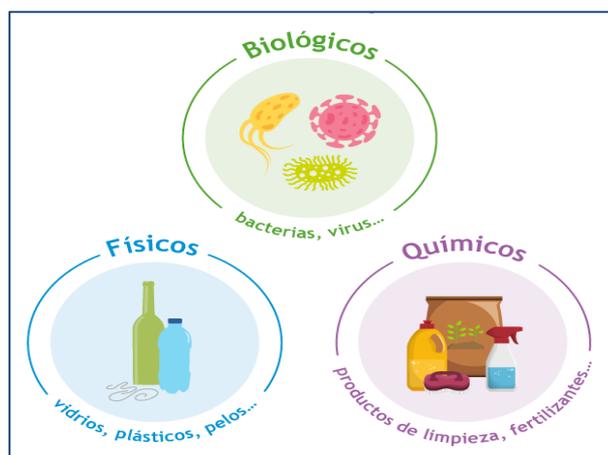


Ilustración 1-2: Tipos de contaminación

Fuente: Pascual, 2018

2.2.2 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las ETAS las definimos como enfermedades que son causadas por ingerir alimentos o agua que han sido contaminadas con agentes físicos, químicos o microbiológicos en altas proporciones las cuales pueden perjudicar la salud del comensal, esto se da en niveles tanto leve, agudo o crónico, y se transmite tanto individual como también de manera comunitaria, una vez infectados pueden producir síntomas que pueden ser de leves hasta graves y esto llega a ser un problema de salud pública para la comunidad (Canaza, 2019: p.22).

Estas enfermedades como ya las mencionamos anteriormente se producen por la falta de buenas prácticas de higiene durante el proceso de elaboración esto quiere decir que se puede dar desde la recolecta hasta que el alimento llegue a la mesa del consumidor, y se las clasifica como infecciones, intoxicaciones o toxiinfecciones (MSP, 2021).

- a) **Intoxicaciones alimentarias:** Se conocen como enfermedades que son producidas al ingerir cualquier tipo de alimento que contengan toxinas las cuales son producidas por los microorganismos ya sea en ese momento o se mantengan después de haber eliminado a dicho microorganismo, como puede ser el caso de bacterias conocidas como lo es el *Staphylococcus aureus* o también producidas por otras diferentes como lo son los hongos (Medline, 2021).
- b) **Infecciones alimentarias:** Se las conocen como enfermedades que se originan por ingerir alimentos que se encuentran contaminados con microorganismos patógenos que están vivos y dentro de este grupo encontramos a la *Salmonella*, *Shigella*, entre otros (OPS, 2020).
- c) **Toxiinfecciones alimentarias:** Son aquellas enfermedades que son caracterizadas por ser transmitidas por los alimentos, pero además de eso conocidas también por ser provocadas por microorganismos patógenos o por sus toxinas liberadas, esto genera síntomas graves en las personas que los consuman (Durich, 2012).

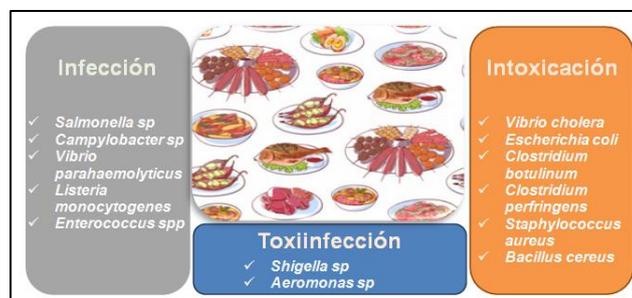


Ilustración 2-2: Tipos de eta's

Fuente: Pascual, 2018

2.2.3 Análisis microbiológico de néctares

Un análisis microbiológico de un alimento permite conocer e identificar los microorganismos que están presentes, junto con esto se puede llegar a conocer la calidad sanitaria con la que fue preparado el alimento y así poder prevenir cualquier tipo de enfermedades que pueda conllevar a su consumo como pueden ser una gastroenteritis, una salmonelosis o también otro tipo de enfermedades (Lemos,2020).

Para este análisis tomamos en cuenta la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2 337:2008, la cual nos menciona el numero permisible de microorganismos que pueden estar presentes en los néctares para ser aptos para el consumo humano.

Tabla 1-2: Requisitos microbiológicos para productos pasteurizados

Requisitos microbiológicos para los productos pasteurizados					
Requisito	n	c	m	M	Método de ensayo
Coliformes NMP/cm ³	3	0	<3	--	NTE INEN 1529-6
Coliformes fecales NMP/cm ³	3	0	<3	--	NTE INEN 1529-8
Recuento estándar en placa REP UFC/cm ³	3	1	<10	10	NTE INEN 1529-5
Recuento de mohos y levaduras UP/cm ³	3	1	<10	10	NTE INEN 1529-10

Fuente: INEN, 2008.

Elaborado por: Pulgar, D. 2022.

2.2.3.1 Microorganismos indicadores de calidad e higiene en los alimentos

Aerobios mesófilos: Se las define como bacterias aerobias, que crecen en temperaturas de 30°C a 37°C, al mismo tiempo crecen en todo tipo de medio nutritivo. Como la palabra lo dice son indicadores de la calidad sanitaria que puede tener un alimento tanto en su materia prima como en el producto, también indica una deficiente calidad sanitaria de la manipulación, y si no se

encuentran en abundante cantidad no son significativas de enfermedades gastrointestinales (Gonzales, 2018: pp. 02).

Altos recuentos de la bacteria poseen diversos significados:

- Materia prima altamente contaminada.
- Incorrectos métodos de manipulación en el proceso de elaboración de productos.
- La posibilidad de existir patógenos.
- Signo de inmediata descomposición al presentar tasas superiores a 10⁶-10⁷ gérmenes por gramo o mL del alimento.

Coliformes Totales: Se las define como pertenecientes a un grupo de bacterias denominadas Enterobacterias, se caracterizan por fermentar la lactosa en las 24 horas de incubadas. En el análisis de un alimento su presencia es indicador de la presencia de otras bacterias patógenas o no en él, también se las usa en general como indicador de la calidad de los alimentos y del agua, por esta razón se menciona que son ampliamente usados para detectar una calidad de higiene inapropiada (Gonzales, 2018: pp.03).

Escherichia coli: Se la define como una bacteria perteneciente del grupo de los coliformes fecales, la cual se la considera la principal de estas, su presencia nos ayuda para indicar y cuantificar la contaminación en un alimento como también en el agua, también nos ayuda a verificar el proceso de elaboración de un producto en todos los pasos de la cadena hasta llegar al consumo de este en los seres humanos (Elika, 2022).

Mohos y levaduras: Se los define como grupos distintos donde se dice que las levaduras son microorganismos que crecen en alimentos que tienen un pH de 5 o menos y pueden metabolizar hidratos de carbono, ácidos que son orgánicos, esto lo realizan para producir otros tipos de metabolitos a partir de estos, debido a todo este proceso hacen que cambien las propiedades tanto químicas, físicas y las organolépticas, haciendo así que el alimento se dañe y no sea apto para el consumo humano (Tovar, 2019).

2.2.4 Elaboración de néctares de frutas

Néctar de frutas: Es una bebida muy consumida, la cual es elaborada de la mezcla de una pulpa o diferentes tipos de jugos de frutas añadiendo azúcar, agua, también para mayor conservación se les puede añadir antimicrobianos, conservantes o estabilizadores (Coronado, 2014).

Constituyentes del néctar de frutas

- ❖ **Fruta:** Para la obtención del néctar se lo hace a partir de frutas ya en estado de maduración, que sean frescas y estén sanas, consecutivamente que estén asépticas y bien lavadas (Coronado, 2014).
- ❖ **Azúcar:** Un ingrediente importante es el azúcar ya que es el que da el sabor dulce al néctar, podemos obtenerlo de manera intrínseca ya que viene de la propia fruta y extrínseca añadiendo la azúcar normal comúnmente conocida (Coronado, 2014).
- ❖ **Preservantes:** El preservante es un ingrediente que se añade al néctar y a los alimentos para intentar inhibir el crecimiento de los microorganismos, el cual pueden ser hongos y levaduras, de esta manera se va a prolongar un poco más la vida útil de los alimentos (Coronado, 2014).
- ❖ **Estabilizador:** Es una sustancia que evita que se dé la sedimentación del néctar, debido a la presencia de varias partículas obtenidas de la pulpa de la fruta, y esto también da una mayor y mejor consistencia al producto final (Coronado, 2014).
- ❖ **Ácido cítrico:** Es un antimicrobiano que inhibe el crecimiento actuando como un regulador de la acidez del producto, haciéndole menos susceptible a la presencia de microorganismos, debido que no sobreviven en medios ácidos (Coronado, 2014).

Proceso de elaboración de néctares de frutas

Para la elaboración de un néctar se realiza el siguiente proceso que se va a detallar a continuación:

1. **Pesado:** Se realiza el pesado para determinar la cantidad de producto que se va a requerir y con esto cuanta cantidad se puede elaborar del néctar (Guevara, 2016: pp. 05).
2. **Materia prima:** En este paso se va a seleccionar la fruta más sana, que no esté golpeada o esté en mal estado debido a alguna contaminación (Guevara, 2016: pp. 05).
3. **Lavado:** Este paso se realiza con el objetivo de quitar los restos de tierra u otro elemento ajeno adherido a la fruta, se lo puede realizar mediante tres técnicas como lo son la inmersión, la agitación y la aspersión (Guevara, 2016: pp. 05).
4. **Precocción:** Aquí se coloca a la fruta en agua previamente caliente en donde se va a poder acceder fácilmente a la pulpa, también con esto matar un poco de microorganismos y evitar el posterior deterioro de la fruta (Guevara, 2016: pp. 05).
5. **Pelado:** Este paso va a depender totalmente de la fruta debido a que hay frutas que si se les hace antes pueden deteriorarse por lo tanto se recomienda hacerlo de una manera rápida y eficaz, y usualmente se lo hace con cuchillos o con algún equipo especializado en eso (Guevara, 2016: pp. 05).

6. **Pulpeado:** Aquí se va a obtener la pulpa o el juguito de la fruta el cual va a estar sin otros elementos como lo son la cascara o pepas que pueda tener la fruta, esto se lo hace con una maquina diseñada para esto ya sea de forma manual o tecnológica (Guevara, 2016: pp. 05).
7. **Refinado:** El refinado se lo hace con el objetivo de obtener unas mini partículas todas del mismo tamaño y de la misma forma, esto se lo puede hacer colando con una máquina que tenga mallas con un pequeño diámetro de abertura (Guevara, 2016: pp. 05).
8. **Estandarización:** En este paso ya se va a realizar lo que es la mezcla de todos los productos que han sido añadidos que van a constituir el néctar y puede constar de los siguientes pasos a mencionar:
 - Disgregación de la pulpa.
 - Controlar el dulzor.
 - Regular la acidez.
 - Agregar el estabilizante y el conservante.
9. **Homogenización:** En esta etapa el objetivo es que todos los ingredientes presentes estén de manera uniforme haciendo toda la mezcla una sola masa integrando cada uno de ellos para aprovechar al máximo sus características y obtener un buen producto (Guevara, 2016: pp. 05).
10. **Pasteurización:** Aquí esta etapa se la hace con el objetivo de eliminar la presencia de microorganismos que se pudo obtener durante el proceso, con esto se asegura la inocuidad del alimento (Guevara, 2016: pp. 05).



Ilustración 3-2: Elaboración del néctar

Fuente: Vigil, 2017

2.2.5 Medios de cultivo

Se les considera una mezcla de componentes y nutrientes, los cuales deben estar en concentraciones adecuadas y también en condiciones óptimas para que exista crecimiento de

microorganismos, cabe mencionar que hay diferentes tipos de medio de cultivo para cada microorganismo debido a que estos tienen requerimientos diferentes unos a otros por lo tanto su proliferación muchas veces depende de eso, es muy sencillo su preparación debido a que solo se pesa el medio con agua y se lo esteriliza, se menciona que su tiempo de vida puede ser a temperatura ambiente por dos semanas y si se mantiene en congelación ya sería más tiempo (Britanialab, 2021).

2.2.5.1 *Agar PCA (Plate count agar)*

Conocido también como agar nutritivo en donde va a haber el crecimiento de bacterias las cuales suelen ser aerobias tanto en alimentos, como en aguas y sus diferentes tipos, también es un medio donde puede crecer la mayoría de los microorganismos para su recuento.

FUNDAMENTO

Su uso se fundamenta en el contenido nutricional de todos sus componentes el cual mediante esto va a permitir el crecimiento de microorganismos que se encuentren presentes en el alimento o el agua, cuando se va a analizar alimentos que contenga lácteos se requiere suplementar con sustancias que contengan leche la cual sea estéril y de uso exclusivo para la microbiología (Britanialab, 2021).

2.2.5.2 *Agua peptonada*

Es un medio que se le va a utilizar como diluyente para todo tipo de muestras de alimentos, o de cualquier material a evaluación microbiológica.

FUNDAMENTO

Es un medio rico en nutrientes que no es selectivo en el cual va a proporcionar el medio necesario para el crecimiento y la prevalencia de los microorganismos para el posterior análisis que se haga, también contiene cloruro de sodio el cual va a servir para mantener en equilibrio el balance osmótico (Britanialab, 2021).

2.2.5.3 *Agar MacConkey*

Este medio es selectivo para el crecimiento de bacterias Gram negativas las cuales pueden ser aerobias, y anaerobias facultativas sembradas de cualquier tipo de alimento, agua o incluso

muestras a nivel clínico, un gran ejemplo tenemos a la familia de las Enterobacterias las cuales se caracterizan por crecer ahí.

FUNDAMENTO

En este medio de cultivo los componentes como es la peptona van a aportar lo necesarios para que se dé el crecimiento bacteriano también lo que son las sales biliares y el cristal violeta van a hacer que se inhiba el desarrollo de bacterias Gram positivas, aquí en la caracterización de las colonias va a ver una absorción, un cambio de color por la precipitación y el pH (Britanialab, 2021).

2.2.5.4 Agar EMB

Este medio es uno selectivo para el crecimiento de bacterias que son bacilos Gram negativas el cual lo hace alrededor de las 24 horas y usualmente se utiliza para identificar a bacterias del género Enterobacteria.

FUNDAMENTO

Este medio de cultivo es selectivo para las enterobacterias y también para algunos bacilos Gram negativos. Por sus componentes como lo es la peptona que va a facilitar el crecimiento de microorganismos, también el complejo eosina y azul de metileno nos va a proporcionar la diferenciación de la sacarosa y la lactosa, por ende, también hay una inhibición al crecimiento de bacterias Gram positivas (Britanialab, 2021).

2.2.6 Placas Petrifilm

Consisten en láminas delgadas con un medio de cultivo y un agente gelificante soluble en agua. Llevan incorporada una película de propileno capaz de atrapar el gas producido por ciertas bacterias. Además, contienen indicadores de pH que se encargan de colorear a las colonias para facilitar su identificación y una cuadrícula para poder realizar el conteo de UFC/ml (3M-placas petrifilm,2018).

Las placas que se comercializan se han diseñado para el recuento de bacterias Coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Aerobios mesófilos, hongos y levaduras.

2.2.7 Tinción de Gram

Es la técnica más utilizada para el examen microscópico de las bacterias, permitiendo clasificar en dos grupos: bacterias Gram positivas capaces de retener el colorante cristal violeta después de un proceso de decoloración con alcohol o éter-acetona y observándose al microscopio bacterias de color violeta o azul oscuro y el segundo grupo corresponde a bacterias Gram negativas que se decoloran y contratiñen con safranina por lo tanto al observarlas al microscopio presentan un color rosado (Fernández & López, 2003).

2.2.8 Resistencia bacteriana

Usualmente la resistencia bacteriana es la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos o disminuir la acción de los agentes antimicrobianos, mediante un estudio se dio a conocer que el consumo de frutas y también de verduras contaminadas genera enfermedades en las cuales dentro de estas se propagan bacterias que son resistentes a antimicrobianos (WHO, 2021).

2.2.8.1 Tipos de resistencia

- a) **Natural o intrínseca:** Esta consiste en que las bacterias de una misma especie poseen características de resistencia a cierto tipo de antibióticos, los cuales al presentar ya esto poseen una cierta ventaja en la hora de su accionar y pueden resistir a la acción de los antibióticos (Fernández & López, 2003).
- b) **Adquirida:** Esta resistencia se da cuando mediante el material genético de otras bacterias crea resistencia a los antibióticos, también se puede dar por las mutaciones que sufren todas las bacterias en el transcurso de los años (Fernández & López, 2003).

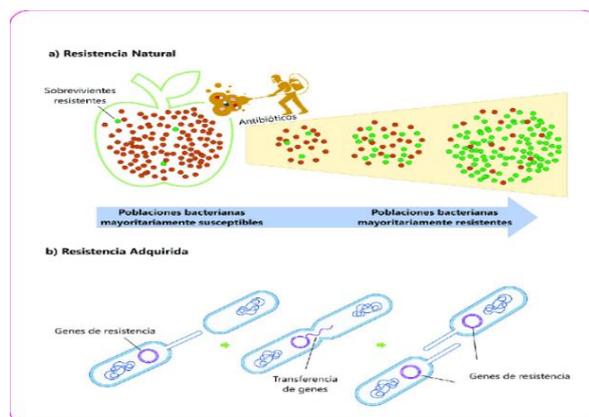


Ilustración 4-2: Tipos de resistencia bacteriana

Fuente: Acosta,2013

2.2.9 Normas de higiene personal

El lavado de manos es un paso fundamental al momento de la preparación de un alimento y un acto esencial que deben realizar el personal y aunque es muy común muchos no lo hacen de la manera adecuada por lo que puede llegar a ser una fuente de transmisión de enfermedades. Básicamente es necesario el proceso de lavado de manos en las diferentes situaciones que se mencionan a continuación:

- Al momento después de utilizar el baño.
- Cuando se manipula alimentos crudos.
- Cuando durante el proceso se toca el cabello, la cara o el cuerpo.
- Después de estornudar, toser o usar algún tipo de objeto ajeno.
- Después de tocar la ropa o delantal de uso.

Al momento que se trabaja con alimentos con materia prima cruda o en el caso de las bebidas con frutas frescas es muy importante llevar un cierto tipo de normas para mantener la higiene dentro del personal el cual prepara o elabora cualquier tipo de alimento destinado al consumo como lo son las siguientes:

- El lavado de las manos diariamente y después de tocar cualquier elemento que pueda contaminar a los alimentos durante su elaboración.
- El baño diario es muy trascendental al momento de ser un personal de preparación de alimentos, debido a que se conoce que en los poros de la piel se conversan bacterias que se eliminan al momento de la ducha.
- El aseo corporal también es una clave importante al momento de manipular alimentos siguiendo las siguientes recomendaciones, las manos siempre deben estar limpias, las uñas cortadas y sin esmalte, sin accesorios al momento de preparar los alimentos, el cabello también es importante debe estar recogido o con una cofia para evitar la caída de alguno en el alimento.
- Limpieza del material de uso, esto siempre al momento después de utilizarlo hay que lavarlo y si es posible desinfectarlo para su posterior uso.
- Verificar y limpiar todos los materiales que se hayan usado durante el proceso, se menciona que se debe lavar correctamente con detergente y mucha agua, dejarlos secar individualmente para evitar el contacto con uno a otro y que no exista transmisión de algún microorganismo (Caldas & Bermeo, 2014).

CAPÍTULO III

3 MARCO METODOLÓGICO

3.1 Enfoque de investigación

El presente proyecto posee un enfoque cuantitativo, puesto que las variables a validar pertenecen a valores numéricos debido a que se realiza conteos y se obtienen datos previos a la identificación bacteriana, mismos que se emplearan como guía en los niveles de calidad sanitaria del producto en estudio, a través de la detección del contenido microbiano en un alimento.

3.2 Nivel de investigación

El proyecto detallado responde a un nivel investigativo de tipo descriptivo, puesto a que se describen e identifican características relevantes del estudio, mismas que reúnen información cuantificable concreta que sirve de base para el sustento del tema específico a través del análisis de datos.

3.3 Diseño de investigación

3.3.1 *Según la manipulación o no de la variable independiente*

No experimental

3.3.2 *Según las intervenciones en el trabajo de campo*

Transversal

3.4 Tipo de estudio

De campo

3.5 Población y planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra

3.5.1 Población y planificación

La población del presente estudio fue conformada por néctares de frutas distribuidos por el gobierno en 5 parroquias de la ciudad de Riobamba.

3.5.2 Selección y cálculo del tamaño de la muestra

Aplicando un muestreo por triplicado de manera aleatoria a néctares de frutas que son distribuidas por el gobierno en 5 parroquias de la ciudad de Riobamba.

3.6 Métodos, técnicas e instrumentos de investigación

3.6.1 Materiales, equipos y reactivos

3.6.1.1 Materiales

- Cofia, mascarilla, guantes y mandil.
- Gel refrigerante.
- Puntas azules estériles.
- Cajas petri de vidrio
- Fundas para esterilización
- Asas bacteriológicas
- Matraces Erlenmeyer
- Pipetas de 1mL
- Marcadores
- Mecheros de alcohol
- Tubos de ensayo
- Pera de succión
- Probeta
- Papel Kraft
- Cinta masking
- Espátula
- Petrifilm.
- Dispersador para placas petrifilm.
- Toallas absorbentes.
- Hisopos estériles.

- Asa y aguja de inoculación.
- Alcohol potable.
- Agua peptonada.
- Agar Mueller Hinton.
- Estándar Mac Farland.
- Solución salina estéril.
- Regla.

3.6.1.2 Equipos

- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Estufa bacteriológica
- Autoclave
- Microscopio
- Reverbero
- Refrigerador.

3.6.1.3 Reactivos

- Agua destilada.
- Aceite de inmersión.
- Kit para tinción Gram: Cristal violeta, Lugol, acetona y safranina.

3.7 Muestreo

Según la Norma Técnica Ecuatoriana para jugos, pulpas, concentrados, néctares, bebidas de frutas y vegetales, para la recolección de muestra se procedió a un muestreo aleatorio de 5 néctares de frutas por triplicado que fueron distribuidos por el gobierno en escuelas de las cinco parroquias de la ciudad de Riobamba (Maldonado, Veloz, Lizarzaburu, Velasco y Yaruquíes), fueron analizadas en el laboratorio de Biología Molecular y Genética de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, donde se realizó el recuento de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, coliformes totales y coliformes fecales.

3.7.1 Preparación o tratamiento de la muestra

1. Nuestro principal lugar de trabajo fue la cámara de flujo laminar, en donde para ocuparla se necesitó limpiarle con alcohol potable que es al 96%, y esterilizarla con ayuda de la luz UV durante 15 minutos.
2. Como primer paso para la preparación de la suspensión inicial se procedió a neutralizar con fosfato tripotásico al 8% la muestra de néctar debido a que en general este posee un pH ácido, en el cual se hizo una relación 10:10 donde se colocó 10 ml de la solución y 10 ml del néctar obteniendo un pH de 7.
3. Para la preparación de las diluciones, se preparó el agua de peptona al 0,1%, la cual se va a pesar la cantidad correspondiente y se le añade a la cantidad necesaria de agua destilada, una vez esterilizada se procede a añadir 10 ml del néctar neutralizado al agua de peptona así obteniendo la solución madre.
4. Se codifica los tubos que se utilizarán en las diluciones, en este caso se utilizó las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} .
5. Con ayuda de una pipeta automática se toma 1 ml del contenido de la solución madre y se la va a pasar a los tubos que se encuentran preparados con agua de peptona, una vez transferidos se homogeniza y se procede a tomar 1 ml del tubo para seguir realizando las diluciones que se van a necesitar.
6. Así se realiza el proceso de muestreo dependiendo las muestras a analizar.

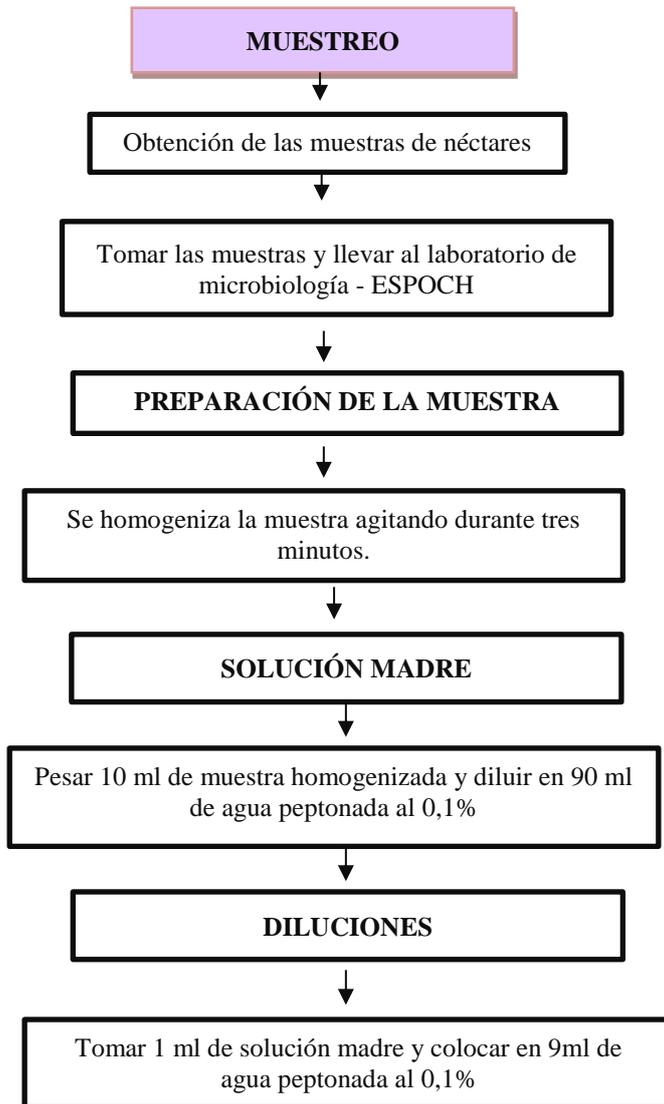


Ilustración 1-3: Esquema de muestreo

Fuente: INEN, 2013

Realizado por: Pulgar, D. 2022.

3.7.2 *Incubación y recuento de UFC/mL en placas Petrifilm*

Una vez que se han preparado las diluciones de cada una de las muestras de néctar de frutas se procede a la inoculación en las Placas Petrifilm 3M™, siendo la dilución 10^{-2} y 10^{-3} de la cual se realiza el recuento bacteriano.

Inoculación de la muestra

1. Se desinfecta el lugar de trabajo la cual es la cámara de flujo laminar con alcohol potable al 96%, se coloca la luz UV y se espera por 15 minutos.
2. Se toma las placas petrifilm correspondientes a los microorganismos a identificar y codificar las muestras que se van a analizar.
3. Se coloca las placas petrifilm rectas, buscando la superficie más plana y por ende debe estar estéril.
4. Se toma 1 ml con la pipeta automática de la dilución 10^{-2} y 10^{-3} respectivamente.
5. Se toma la placa petrifilm y se alza la película transparente que le cubre y se inocula la muestra en el círculo que es asignado con el agar.
6. Se coloca la película superior y se deja un minuto hasta que se seque la muestra inoculada.
7. Una vez secas se procede a colocar en la incubadora a 37° C por 24 horas o 48 horas según el microorganismo.

Incubación de las Placas Petrifilm.

La incubación de las Placas Petrifilm se las realiza en una incubadora, en la cual conste que se encuentre a 37°C, se debe tomar en cuenta las siguientes características las cuales depende del microorganismo a incubar.

- Coliformes totales: 37°C durante 24 horas
- *Escherichia coli*: 37°C por 24-48 horas
- Aerobios mesófilos: 32°C durante 48 horas
- Mohos y levaduras: Incubar 5 días entre 21 °C y 25 °C.

Recuento de Unidades Formadoras Colonias por mL de muestra.

Una vez que ha pasado el tiempo de incubación de las placas en la incubadora, se procede a realizar el conteo de las bacterias que han crecido.

Se toma la placa petrifilm y se la coloca en la cámara de Quebec y se procede al conteo de las colonias, en las cuales hay que considerar que si son menores 50 se las puede realizar así nomás el conteo, pero si sobrepasan su número se debe realizar el conteo en 3 cuadrículas, se saca la media de estas y se multiplica por 20 obteniendo el total de UFC/mL.

Hay que acotar que estos medios que contienen las placas petrifilm son muy específicas para ciertas bacterias por lo tanto se obtienen las bacterias requeridas los cuales van a tener características muy específicas que vienen en las indicaciones como lo son las siguientes a mencionar:

- **Coliformes totales:** Se observa el crecimiento de colonias rojas y azules con la producción de gas.
- ***Escherichia coli:*** Las colonias van a presentar un color azul y la producción de gas alrededor, siendo esta su primordial característica para su identificación.
- **Aerobios mesófilos:** Las colonias van a presentar un color rojizo característico de estas bacterias.
- **Mohos y levaduras:** Las colonias van a presentar un color que puede ir desde beige hasta rosa, o incluso un azul verdoso.

3.7.3 Aislamiento e identificación de Coliformes totales

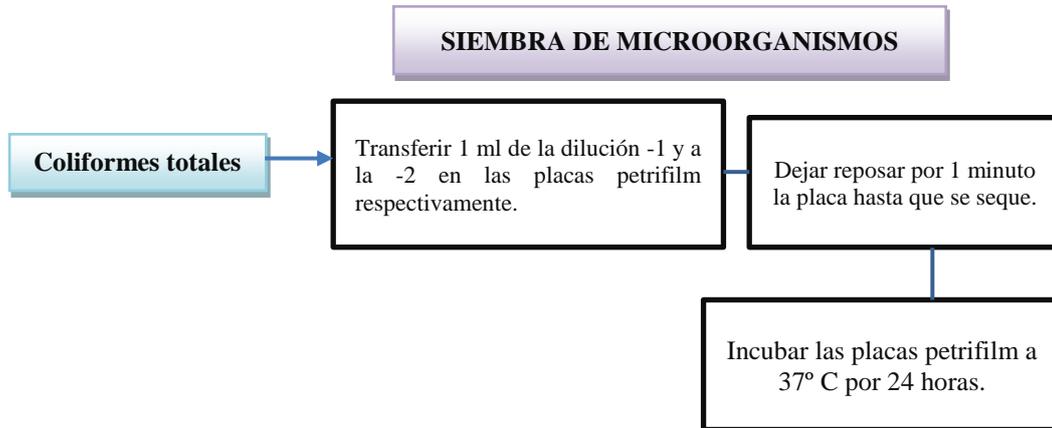


Ilustración 2-3: Aislamiento de Coliformes

Fuente: Petrifilm-3M, 2018.

Realizado por: Pulgar, D. 2022.

3.7.4 Aislamiento e identificación de aerobios mesófilos

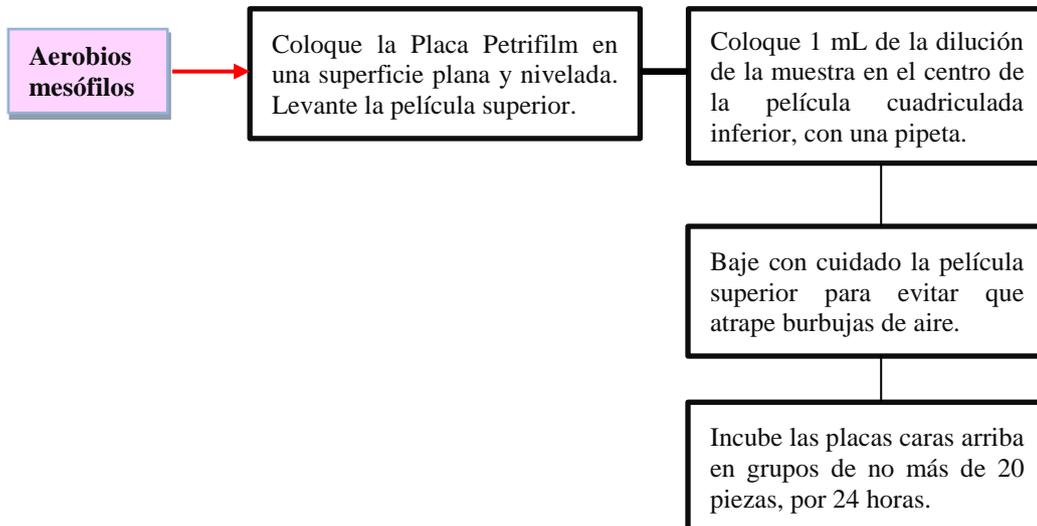


Ilustración 3-3: Aislamiento de Aerobios Mesófilos

Fuente: Petrifilm-3M, 2018.

Realizado por: Pulgar, D. 2022.

3.7.5 Aislamiento e identificación de Hongos y levaduras

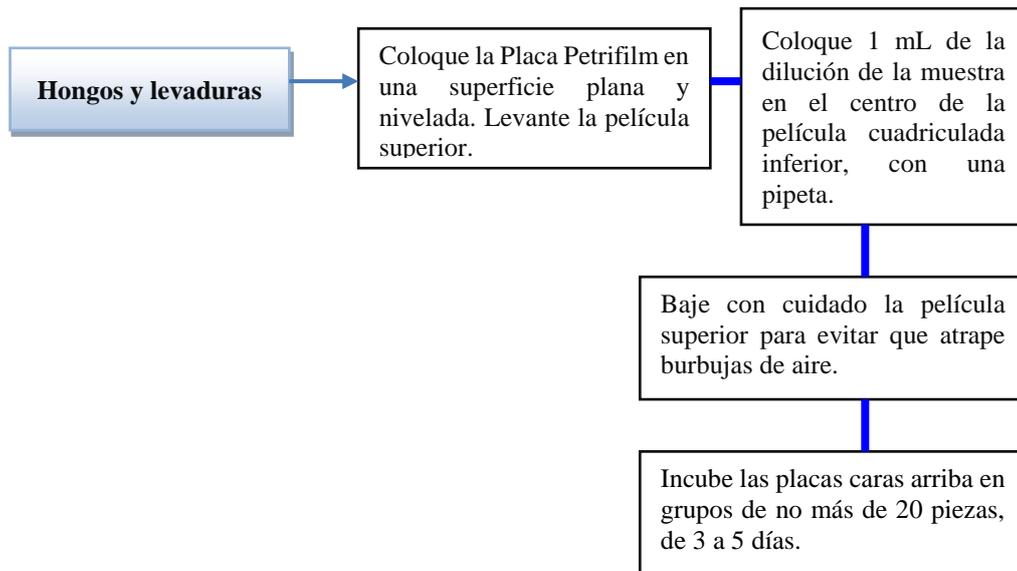


Ilustración 4-3: Aislamiento de Hongos y Levaduras

Fuente: Petrifilm-3M, 2018.

Realizado por: Pulgar, D. 2022.

3.7.6 Aislamiento e identificación de Coliformes fecales

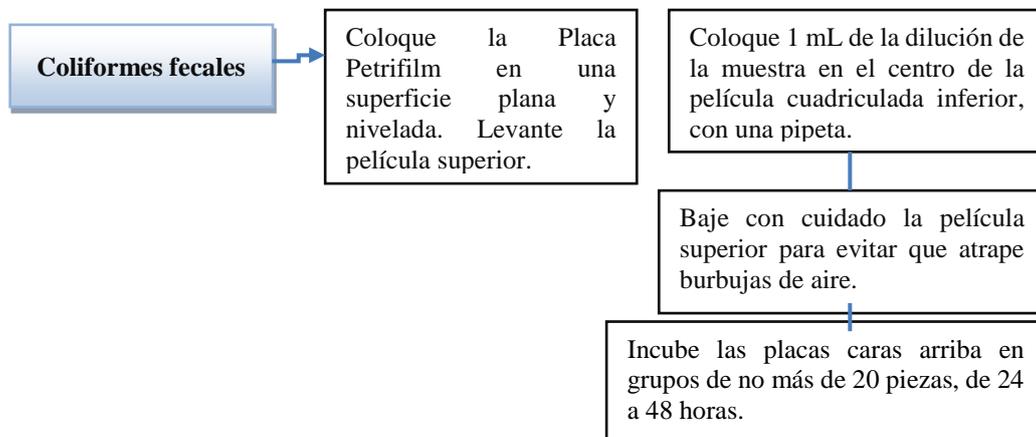


Ilustración 5-3: Aislamiento de *E. coli*

Fuente: Petrifilm-3M, 2018.

Realizado por: Pulgar, D. 2022.

3.7.7 Aislamiento e identificación (Tinción Gram)

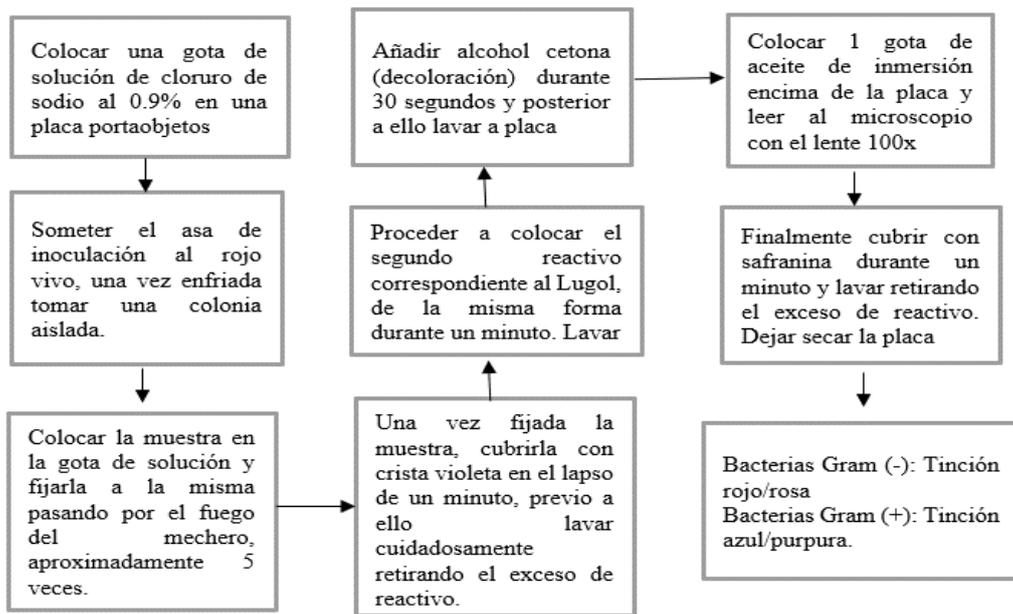


Ilustración 6-3: Tinción de Gram

Fuente: Guevara, 2016.

Realizado por: Pulgar, D. 2022.

3.7.8 Esquema metodológico de pruebas bioquímicas

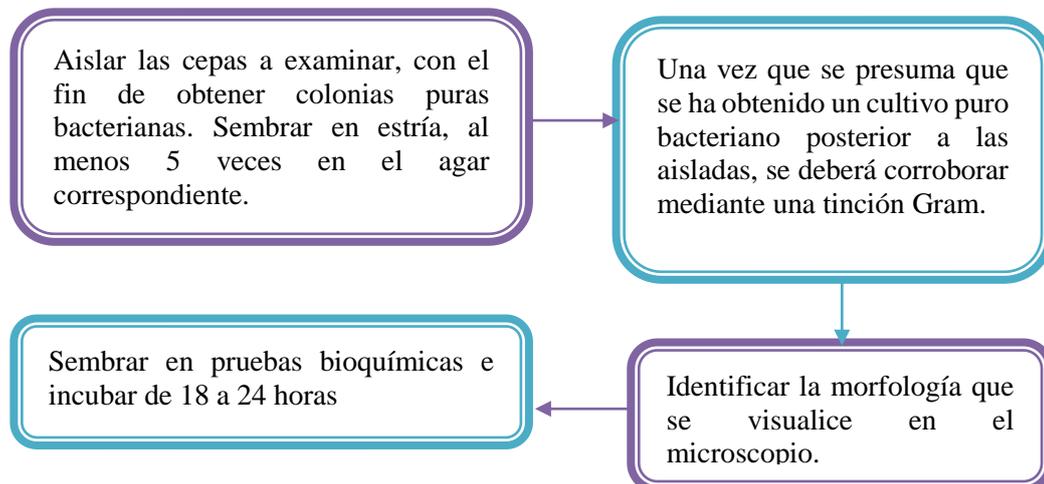


Ilustración 7-3: Pruebas Bioquímicas

Fuente: Guevara, 2016.

Realizado por: Pulgar, D. 2022.

3.7.9 Esquema metodológico para prueba de sensibilidad antimicrobiana

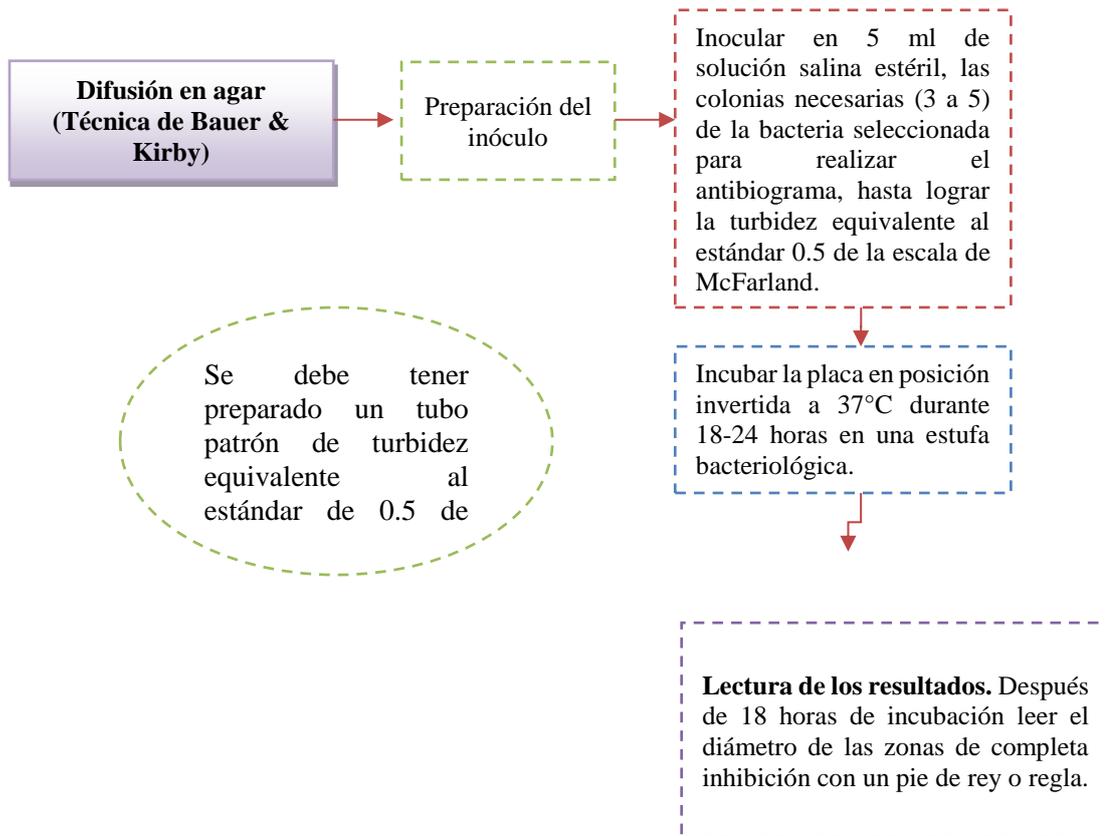


Ilustración 8-3: Antibiograma

Fuente: González, 2020.

Realizado por: Pulgar, D. 2022.

CAPÍTULO IV

4 MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Tras los datos y resultados obtenidos posteriormente de la determinación microbiológica de los néctares de frutas distribuidos en cinco parroquias de la ciudad de Riobamba, se determinó la cantidad de Aerobios mesófilos, coliformes totales, mohos y levaduras para la posterior comparación y verificación del cumplimiento de la normativa NTE INEN 2337, la cual es la Norma general para jugos, concentrados, néctares y bebidas de frutas.

También se puede observar los resultados obtenidos del antibiograma, este se llevó a cabo por el método de Kirby Bauer, considerándolo como un método confiable, eficaz y estandarizado el cual nos indica los resultados que muestran las características de resistencia o sensibilidad bacteriana de los distintos microorganismos.

4.1 Análisis microbiológico de los néctares de frutas.

Los resultados que se exponen a continuación son el recuento total de los microorganismos analizados en los néctares de frutas, siendo estos Coliformes totales, Coliformes fecales, Aerobios mesófilos, Mohos y levaduras.

Tabla 1-4: Recuento de microorganismos analizados en Placas Petrifilm

Lugar de muestreo	Determinación	Coliformes UFC/g	Coliformes fecales UFC/g	Aerobios mesófilos UFC/g	Mohos y levaduras UFC/g
P1	1	< 3	< 3	<1x10 ¹	<1x10 ¹
	2	< 3	< 3	<1x10 ¹	<1x10 ¹
	3	< 3	< 3	0,2 x10 ¹	<1x10 ¹
P2	1	< 3	< 3	<1x10 ¹	<1x10 ¹
	2	< 3	< 3	<1x10 ¹	<1x10 ¹
	3	1	< 3	0,1 x10 ¹	<1x10 ¹
P3	1	< 3	< 3	<1x10 ¹	<1x10 ¹
	2	< 3	< 3	<1x10 ¹	<1x10 ¹
	3	< 3	< 3	<1x10 ¹	<1x10 ¹
P4	1	< 3	< 3	0,2 x10 ¹	<1x10 ¹
	2	< 3	< 3	<1x10 ¹	<1x10 ¹

	3	< 3	< 3	<1x10 ¹	<1x10 ¹
P5	1	< 3	< 3	<1x10 ¹	<1x10 ¹
	2	< 3	< 3	<1x10 ¹	<1x10 ¹
	3	< 3	< 3	<1x10 ¹	<1x10 ¹

Elaborado por: Pulgar, D. 2022.

En la tabla 2-4 se detalla el resultado en general del recuento de la determinación microbiológica de los néctares de frutas en donde podemos observar un leve crecimiento de lo que son coliformes fecales y aerobios mesófilos respectivamente en las distintas muestras analizadas.

4.1.1 Recuento de Coliformes Totales

Se detallan los datos obtenidos del recuento de coliformes totales de las cajas Petrifilm, para posteriormente compararlos con la norma NTE INEN 2337 para jugos, concentrados, néctares y bebidas de frutas, la cual se utilizó como referencia.

Tabla 2-4: Recuento de Coliformes totales analizados en Placas Petrifilm

Lugar de muestreo	Determinación	UFC/ml	Parámetro de contaminación
P1	1	< 3	Sin contaminación
	2	< 3	
	3	< 3	
P2	1	< 3	Sin contaminación
	2	< 3	
	3	1	
P3	1	< 3	Sin contaminación
	2	< 3	
	3	< 3	
P4	1	< 3	Sin contaminación
	2	< 3	
	3	< 3	
P5	1	< 3	Sin contaminación
	2	< 3	
	3	< 3	

Elaborado por: Pulgar, D. 2022.

Señalando la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2337 el parámetro microbiológico para los néctares de frutas para coliformes totales son: en las tres determinaciones realizadas de la bebida, el nivel de aceptación es de < 3 UFC/ml, el nivel de rechazo $M=0$ y el número de unidades toleradas entre el nivel de aceptación y el nivel de rechazo es $c=0$.

Comparando con la normativa INEN 2337 en la tabla 3-4 podemos verificar que todos los néctares que han sido analizados de las cinco parroquias se encuentran dentro de los parámetros microbiológicos que nos indica la normativa para coliformes totales obteniendo un leve crecimiento de una colonia.

Los coliformes totales son bacterias Gram negativas, aerobios o anaerobios facultativos, en el área de los alimentos su presencia tiene una relevante importancia clínica ya que estos funcionan como un indicador de contaminación de los alimentos o del agua. En un estudio realizado por Silveria & Aguayo (2014) sobre los jugos de frutas pasteurizados y mantenidos en refrigeración menciona que la presencia de un alto número de coliformes totales en productos con tratamiento térmico nos puede servir como un indicador de que hubo deficiencia de buenas prácticas de sanidad durante su elaboración, también menciona que si se le da un inadecuado almacenamiento pueden potenciar su crecimiento elevándose hasta cantidades críticas, por ende, pueden dañar sus características intrínsecas y perjudicar a la persona que lo consume.

En comparación con el trabajo de Álvarez, et.all (2013) sobre la evaluación microbiológica y fisicoquímica de néctares pasteurizados de pulpa de tomate, se tuvo como resultado que el 100 % de muestras estaban dentro del estándar adecuado lo cual revelo que el proceso de pasteurización al que fue sometido fue eficaz y seguro.

4.1.2 Recuento de Coliformes fecales

Se detallan los datos obtenidos del recuento de coliformes fecales de las cajas Petrifilm, para posteriormente compararlos con la norma NTE INEN 2337 para jugos, concentrados, néctares y bebidas de frutas, la cual se utilizó como referencia.

Tabla 3-4: Recuento de Coliformes fecales analizados en Placas Petrifilm

Lugar de muestreo	Determinación	UFC/g	Parámetro de contaminación
P1	1	< 3	Sin contaminación
	2	< 3	
	3	< 3	
P2	1	< 3	Sin contaminación
	2	< 3	
	3	< 3	
P3	1	< 3	Sin contaminación
	2	< 3	
	3	< 3	
P4	1	< 3	Sin contaminación
	2	< 3	
	3	< 3	
P5	1	< 3	Sin contaminación
	2	< 3	
	3	< 3	

Elaborado por: Pulgar, D. 2022.

Con respecto a la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2337 los requisitos microbiológicos que tenemos para las bebidas de frutas en relación con el número más probable para coliformes fecales son: en las tres determinaciones sucesivas del néctar, el nivel de aceptación es de < 3 UFC/g, el nivel de rechazo es $M=0$ y el número de unidades permitidas entre el nivel de aceptación y el nivel de rechazo es $c=0$.

Según los datos obtenidos en la tabla 4-4 con respecto a la normativa INEN 2337 podemos denotar que los néctares que fueron analizados de las cinco parroquias cumplen con los requisitos microbiológicos que nos indica la normativa para coliformes fecales, ya que no se obtuvo crecimiento alguno en las placas petrifilm, por lo tanto, pudimos verificar la inocuidad del néctar el cual va a ser destinado al consumo.

Los coliformes fecales relacionados a la flora intestinal presentan la particularidad de ser termotolerantes, se pueden multiplicar a 44 °C, y son capaces de fermentar la lactosa, lo que los diferencian del resto que son denominados coliformes totales. Según Álvarez (2019), define a *E. coli* como una bacteria que es habitual en el intestino de las personas y de los animales sanos. Usualmente, esta bacteria es responsable de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, además de contribuir en la síntesis de diversas vitaminas (vitaminas B y K). Se considera que solamente

una minoría de cepas de *E. coli* es capaz de causar enfermedad en el hombre. La mayoría de los tipos de *E. coli* son inofensivas y no causan problemas, o éstos suponen solamente breves diarreas, si bien el índice de coliformes ha sido aplicado a la evaluación de los alimentos durante muchos años, en algunos de ellos existen limitaciones. En productos lácteos y otros no indica contaminación fecal, sino que refleja la higiene general de la planta industrial (Jay; 2002).

Cardozo & Ruiz (2019), mediante un estudio en el cual compararon la calidad microbiológica del néctar recién preparado y sin pasteurizar con la del néctar ya pasteurizado, aquí comprueban que antes del tratamiento hay una gran cantidad de coliformes fecales en la muestra por lo tanto mencionan que no es una muestra accesible para el consumo, en cambio una vez pasado el tratamiento térmico demuestran la ausencia de bacterias coliformes fecales siendo el resultado nulo para las determinaciones realizadas.

4.1.3 Recuento de Aerobios Mesófilos

Se detallan los datos obtenidos del recuento de aerobios mesófilos de las cajas Petrifilm, para posteriormente compararlos con la norma NTE INEN 2337 para jugos, concentrados, néctares y bebidas de frutas, la cual se utilizó como referencia.

Tabla 4-4: Recuento de Aerobios mesófilos analizados en Placas Petrifilm

Lugar de muestreo	Determinación	UFC/g	Parámetro de contaminación
P1	1	<1x10 ¹	Sin contaminación
	2	<1x10 ¹	
	3	0,2 x10 ¹	
P2	1	<1x10 ¹	Sin contaminación
	2	<1x10 ¹	
	3	0,1 x10 ¹	
P3	1	<1x10 ¹	Sin contaminación
	2	<1x10 ¹	
	3	<1x10 ¹	
P4	1	<1x10 ¹	Sin contaminación
	2	0,2 x10 ¹	
	3	<1x10 ¹	
	1	<1x10 ¹	

P5	2	<1x10 ¹	Sin contaminación
	3	<1x10 ¹	

Elaborado por: Pulgar, D. 2022.

Dentro de la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2337 los requisitos microbiológicos para los néctares de frutas con respecto al recuento de aerobios mesófilos son: en las tres determinaciones sucesivas del néctar, el nivel de aceptación es de <1,0x10¹ UFC/ml, el nivel de rechazo es de 10 UFC/ml y el número de unidades permitidas entre el nivel de aceptación y nivel de rechazo es de 1.

Con los resultados obtenidos plasmados en la tabla 5-4 se verificó que todas las muestras de néctares analizadas de las cinco parroquias se encuentran dentro de los parámetros que nos indica la normativa para aerobios mesófilos, se tuvo un leve crecimiento en tres muestras de los cuales podemos mencionar que se encuentran dentro del límite permisible y por lo tanto no es un resultado representativo de contaminación.

En un estudio realizado por Moreno & Serrano, (2013) sobre la evaluación microbiológica y fisicoquímica de néctares pasteurizados nos mencionan que los aerobios mesófilos son bacterias que usualmente se desarrollan a temperatura ambiente, y su presencia en los alimentos nos indica un deficiente control de calidad en la materia prima o durante su elaboración, por lo tanto, en los alimentos que pasan por un tratamiento térmico el crecimiento de estos microorganismos tiene más que ver con un inadecuado almacenamiento y también una inadecuada conservación del producto, ya que se menciona que el proceso de pasteurización puede eliminar del 90-99% de microorganismos más no en su totalidad, recalando que siempre debe haber un control en cada paso de este proceso.

Delgado (2012), en su estudio realiza una comparación de la calidad microbiológica de los néctares recién elaborados con néctares que se encuentran almacenados en diferentes temperaturas, aquí obtienen que al día dos, cuatro y seis la carga microbiana es nula o se encuentra dentro de los parámetros microbiológicos debido al proceso de pasteurización, en cambio al día diez ya se encuentra una carga elevada de aerobios mesófilos fuera de los criterios límites por lo tanto concluyen que ya no puede ser consumido, ya que puede causar riesgos en la salud de la persona.

4.1.4 Recuento de mohos y levaduras

Se detallan los datos obtenidos del recuento de mohos y levaduras de las cajas Petrifilm, para posteriormente compararlos con la norma NTE INEN 2337 para jugos, concentrados, néctares y bebidas de frutas, la cual se utilizó como referencia.

Tabla 5-4: Recuento de Mohos y levaduras analizados en Placas Petrifilm

Lugar de muestreo	Determinación	Mohos y levaduras UFC/g	Parámetro de contaminación
P1	1	<1x10 ¹	Sin contaminación
	2	<1x10 ¹	
	3	<1x10 ¹	
P2	1	<1x10 ¹	Sin contaminación
	2	<1x10 ¹	
	3	<1x10 ¹	
P3	1	<1x10 ¹	Sin contaminación
	2	<1x10 ¹	
	3	<1x10 ¹	
P4	1	<1x10 ¹	Sin contaminación
	2	<1x10 ¹	
	3	<1x10 ¹	
P5	1	<1x10 ¹	Sin contaminación
	2	<1x10 ¹	
	3	<1x10 ¹	

Elaborado por: Pulgar, D. 2022.

Según lo que nos propone la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2337 los requisitos microbiológicos para los néctares de frutas con respecto al recuento de mohos y levaduras son: en las tres determinaciones consecutivas del néctar, el nivel de aceptación es de < 1,0x10¹ UFC/ml, el nivel de rechazo es de 10 UFC/ml y el número de unidades permitidas entre el nivel de aceptación y nivel de rechazo es de 1.

Observando los resultados de la tabla 6-4 se puede ver que el crecimiento de mohos y levaduras durante el análisis de todas las determinaciones de las muestras de néctares fue nulo, con esto se

verifica que el proceso de pasteurización al cual se sometieron estos productos fue eficaz, seguro y confiable.

Como menciona Vera & Zambrano; (2021), en su estudio define a los mohos y levaduras como microorganismos aerobios los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, algunos forman parte de la microbiota normal y en otras ocasiones su presencia significa que hay contaminación en los alimentos, se menciona que en productos pasteurizados su escaso crecimiento puede deberse al proceso térmico al que se someten, se recalca que si después de este proceso el almacenamiento es inadecuado evidentemente va a ver el crecimiento de estos microorganismos.

Otro punto importante que se menciona es que se usan antimicrobianos en estos productos los cuales previenen o retrasan el deterioro de los alimentos a causa de los microorganismos, en este caso se utiliza el ácido cítrico el cual es muy utilizado en la industria alimentaria por su gran seguridad ya que actúa contra un gran número de patógenos y el sorbato de potasio que tiene su funcionamiento gracias a su forma disociada y suele utilizarse debido a su eficacia en alimentos con pH ácidos.

Custode (2015), realizó una investigación en la cual hace una comparación de la muestra cruda de un néctar de maracuyá y zanahoria en la cual mediante los análisis realizados se obtiene la presencia de mohos y levaduras las cuales sobrepasan los límites microbiológicos, a estas muestras les someten a tratamiento térmico en la cual durante los análisis posteriores se obtienen de resultado una reducción significativa de mohos y levaduras las cuales las definen como de 2 log, esto quiere decir que el tratamiento es eficaz y se encuentra dentro de los límites permisibles de la Norma Ecuatoriana.

4.2 Microorganismos aislados/identificados

Tabla 6-4: Microorganismos aislados/identificados

<i>NÚMERO DE CEPAS/ COLONIAS</i>	<i>TINCIÓN (MORFOLOGÍA)</i>	<i>GRAM</i>
<i>1</i>	<i>Bacilo Gram (-)</i>	

Elaborado por: Pulgar, D. 2022.

Se realizó la tinción Gram de la bacteria aislada y purificada que creció en agar MacConkey, el cual según bibliografía es uno de los agares primarios para el Aislamiento de *E. coli* en donde las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas, el rango de temperatura para su crecimiento va entre 15 y 45 °C. Las colonias fueron de color rosa debido a que las bacterias fermentan el azúcar de lactosa presente en el medio y acidifican el mismo. En la observación del microscopio presentaron forma de bastón, descripción que coincide con Rodríguez (2002), en base a todo esto se concluye que las bacterias fueron bacilos los cuales mostraron un color violeta teniendo una reacción negativa a la coloración de Gram, concluyendo que son bacterias Gram negativas, junto con esto también se puede ver la morfología presentada y según eso con las pruebas bioquímicas se pudo identificar la bacteria correspondiente a la tinción.

4.2.1 Microorganismos identificados

Tabla 7-4: Microorganismos aislados/identificados

		KLIGER				SIM				
Colonia	Tinción Gram	Glucosa	Gas/Glucosa	Lactosa	SH 2	Indol	Movilidad	Citrato	Urea	Identificación
C1	Bacilos Gram (-)	+	+	+	-	+	V ⁺	-	-	<i>Escherichia coli</i>

Elaborado por: Pulgar, D. 2022.

Una vez realizada la tinción Gram de la colonia que se aisló en agar MacConkey, se pudo observar la presencia de bacilos Gram negativos uniformes en la placa de tinción lo cual conllevó a realizar las pruebas bioquímicas para poder identificar que posible bacteria creció en el medio, por lo tanto, se procedió a inocular en agar kliger, urea, SIM y citrato para observar si hay producción de glucosa, lactosa, gas glucosa, SH₂, movilidad, etc.

Según la tabla 8-4 se obtuvo el crecimiento de *Escherichia coli*, el cual es un bacilo Gram negativo y un organismo oxidasa negativo de la familia Enterobacteriácea. Crece bien aeróbicamente y anaeróbicamente, preferiblemente a 37°C. Aproximadamente el 90% de las cepas fermentan lactosa y producen indol.

Como menciona la bibliografía *Escherichia coli* es una especie genéticamente diversa que comprende comensales intestinales no patógenos y cepas responsables de infecciones intestinales y extraintestinales en humanos. La *E. coli* comensal es el anaerobio facultativo predominante de la microbiota intestinal humana y coloniza el tracto gastrointestinal (GI) horas después nacimiento. Actualmente, se reconocen 186 antígenos somáticos y 53 flagelares de *E. coli*, pero solo un pequeño subgrupo produce enfermedad en humanos. Y se menciona que *E. coli* que carece de factores de virulencia específicos también puede ser un patógeno oportunista de huéspedes comprometidos.

4.3 Antibiograma

Una vez que ya realizamos el recuento de las bacterias y procedimos a aislarlas para obtener colonias puras, se preparó el agar Muller Hinton para sembrarlas ahí y determinar la resistencia o sensibilidad de estas bacterias con relación a diferentes tipos de medicamentos mediante el método de Kirby Bauer y a continuación se muestra los resultados obtenidos.

4.3.1 Antibiograma de *Escherichia coli*

Tabla 8-4: Resultados del antibiograma de *Escherichia coli*

CATEGORIA DE SUSCEPTIBILIDAD (DIÁMETRO EN mm)				Bacteria
ANTIMICROBIANO	Resistente (R)	Intermedio (I)	Sensible (S)	<i>Escherichia coli</i>
Ceftriaxona 30 mcg	≤13	13-14	≥21	S
Gentamicina 120 (CN 120)	≤12	13-14	≥15	S
Kanamicina 30 mcg	≤13	14-17	≥18	R
Tetraciclina 30 mcg (TE-30)	≤11	12-14	≥15	R
Ampicilina 10 mcg (AMP 10)	≤20	21-28	≥29	R

Elaborado por: Pulgar, D. 2022.

En la tabla 9.4 se puede observar la resistencia y la sensibilidad de *Escherichia coli*, para esta bacteria aislada e identificada se utilizó los siguientes medicamentos como lo son la Ceftriaxona perteneciente a las Cefalosporinas, la Gentamicina y kanamicina estos antibiótico forman parte del grupo de los aminoglucósidos, y el primero presentó sensibilidad a *E. coli* y el ultimo mencionado presento resistencia a esta bacteria; por otro lado se utilizó el antibiótico de tetraciclina el cual fue resistente para *E. coli* y por último la ampicilina que se encuentra dentro del grupo de los betalactámicos el cual fue resistente para *E. coli*.

En un estudio realizado por Astorga (2019), se obtuvo como resultado que doce antimicrobianos fueron ineficaces para los siete aislamientos que incluyen fármacos de casi todas las familias de antimicrobianos analizados (β -Lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, sulfonamidas, fenicoles, tetraciclina y macrólidos). Por el contrario, los siete aislamientos fueron sensibles a cuatro β -lactámicos: amoxicilina-ácido clavulánico, cefoxitina, e imipenem. Finalmente, seis de los aislados fueron resistente a todas las quinolonas, excepto por el aislado 12-06 que fue susceptible a la ciprofloxacina. Análisis adicionales de estos aislamientos reveló que no portaban los genes de virulencia probados (K99, fim, F41, sta, stx1, stx2) lo que sugiere que eran cepas de *E. coli* no patógenas.

Faria (2018), en un estudio realizado sobre resistencia y sensibilidad de Enterobacterias demostró que dentro de 75 de estas se encontraban 17 cepas de *E. coli* en donde realizando la susceptibilidad se obtuvo como resultado que esta bacteria presenta resistencia a tetraciclina (40%), ampicilina (20%), nitrofurantoína (6,6%) y sensibilidad frente a gentamicina y estreptomina.

Sattar & Rahman (2021), detectaron susceptibilidad antimicrobiana de 19 aislamientos de *E. coli*, donde se determinó contra 14 antimicrobianos de 8 clases diferentes. Se obtuvo que, de 19 aislamientos, 16 (84,2%) fueron resistentes a múltiples fármacos. La mayor resistencia se observó frente a la amoxicilina (94,5 %), seguida de la ampicilina (89,5 %) y la tetraciclina. (89,5%). También mencionando que todos los aislados fueron resistentes a al menos uno de los antibióticos b-lactámicos.

CONCLUSIONES

- Se evaluó la calidad microbiológica de los néctares de frutas distribuidos en las diferentes parroquias de la ciudad de Riobamba en donde junto con los microorganismos indicadores de calidad sanitaria como lo fueron coliformes totales, coliformes fecales, aerobios mesófilos, mohos y levaduras se pudo determinar la presencia o la ausencia de estos, verificando así que estos néctares cumplen con los parámetros microbiológicos que establece la normativa pertinente.
- Se determinó el número de microorganismos presentes en los néctares de frutas mediante el análisis microbiológico respectivo, obteniendo la presencia de coliformes totales en una muestra, como también contando con la presencia de aerobios mesófilos, en cuanto a lo que fue coliformes fecales, mohos y levaduras su crecimiento fue nulo.
- Se realizó el aislamiento y mediante tinción de Gram se observó bacterias Gram negativas confirmando así con las pruebas bioquímicas respectivamente obteniendo la bacteria de *Escherichia coli*.
- Se determinó la resistencia bacteriana de *Escherichia coli* en donde se obtuvo que esta presenta una sensibilidad a los antibióticos de Ceftriaxona perteneciente a las Cefalosporinas y a la gentamicina perteneciente al grupo de los aminoglucósidos y una resistencia a los antibióticos de Kanamicina perteneciente a los aminoglucósidos, Tetraciclina y Ampicilina este último perteneciente al grupo de los betalactámicos.

RECOMENDACIONES

- Realizar siempre el análisis microbiológico durante todo el proceso de elaboración del néctar para evitar cualquier tipo de contaminación que pueda existir durante el procesamiento térmico y con esto proporcionar productos inocuos y de calidad a la población.
- Proporcionar siempre en los empaques las condiciones de almacenamiento del producto, también a que temperatura se debe almacenar y mantener el néctar, que factores podrían afectar al producto, añadiendo a esto la vida útil del producto una vez abierto.
- Con respecto a la resistencia bacteriana, tratar de brindar una educación sanitaria a las personas sobre el tema, para con esto evitar el uso irracional de antibióticos que ha ido aumentando con los años y como se puede ver cada vez es más inaccesible encontrar un tratamiento a las diferentes enfermedades que se van presentando con el pasar del tiempo en la humanidad.

GLOSARIO

Análisis microbiológico: Son pruebas microbiológicas, o a través de cultivos elaborados con ese fin, se realiza la inspección de un producto o superficie para determinar si presenta o no patógenos y, en caso de ser positivo, su carga (cantidad), grado de patogenicidad.

Enfermedades de Transmisión Alimentaria: Enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos (virus, bacterias, parásitos) perjudiciales vivos.

Antibiograma: Es una prueba de sensibilidad relacionada a la resistencia microbiana a fármacos por medio de la técnica de dispersión en disco.

Bacterias multirresistentes: Son aquellas que son capaces de sobrevivir a la presencia de más de un antibiótico.

Medios de cultivo: Son sustancias ya sean en gel o solución, las cuales contienen los nutrientes necesarios para facilitar el crecimiento microbiano.

Pasteurización: Es un proceso al que son sometidos ciertos líquidos como la leche, para eliminar agentes patógenos que podrían enfermar a las personas al consumirlos. Gracias a su uso, las infecciones e intoxicaciones alimentarias cada vez son menores.

Resistencia microbiana: Es la resistencia de un microorganismo a un medicamento antimicrobiano al que originalmente era vulnerable.

Néctares de frutas: Es una bebida muy consumida, la cual es elaborada de la mezcla de una pulpa o diferentes tipos de jugos de frutas añadiendo azúcar, agua, también para mayor conservación se les puede añadir antimicrobianos, conservantes o estabilizadores.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

Placas petrifilm: Son placas con medio liofilizado listas para usar, ofreciendo unos resultados coherentes y fiables. Estas placas presentan la posibilidad de automatizar la interpretación de los resultados con el Lector de placas Petrifilm™: mejora la precisión, uniformidad y velocidad del recuento de placas.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, Carlos. “Historia de una superbacteria”. *Revista Digital Universitaria* [en línea], 2023, (México) 01 (24), pp.25-30. [consulta 16 febrero 2023]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/368732315_Erwinia_amylovora_historia_de_una_sup_erbacteria/d

ALVAREZ, Mario José; et al. Evaluación microbiológica y fisicoquímica de néctares pasteurizados elaborados con pulpa de tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae* Sendth). [en línea]. (Trabajo de titulación), México, vol.53, no. 3 [citado 2023-02-16], pp. 282-286. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000406222003000300010&lng=es&nr_m=iso>. ISSN 0004-0622.

BREYMAN, Juliana & CHÁVES, Carolina. “Análisis de la calidad microbiológica y potencial presencia de microorganismos en pulpas de guanábana, mango y maracuyá”. *Alan Revista*. [en línea], 2013, (Costa Rica). 63(1), pp.1-5. [Consulta: 24 octubre 2022]. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222013000100007

BRITANIA, Laboratorio. Agar PCA. [blog]. Argentina: 2021 [Consulta: 06 noviembre 2022]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60707e324c182.pdf

BRITANIA, Laboratorio. Agua peptonada. [blog]. Argentina: 2021 [Consulta: 06 noviembre 2022]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60705c37ec35f.pdf

BRITANIA, Laboratorio. Agar MacConkey. [blog]. Argentina: 2021. [Consulta: 06 noviembre 2022]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60707267ecda2.pdf

BRITANIA, Laboratorio. Caldo tetratonato. [blog]. Argentina: 2021. [Consulta: 06 noviembre 2022]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_607094b29a2f1.pdf

BRITANIA, Laboratorio. Agar verde brillante. [blog]. Argentina: 2021. [Consulta: 06 noviembre 2022]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60709e32e6386.pdf

BRITANIA, Laboratorio. Agar EMB. [blog]. Argentina: 2021. [Consulta: 06 noviembre 2022]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e713a290e.pdf

CAMPUZANO, S. Determinación de la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de la ciudad de Bogotá D.C. *Techniques, Sciences, Methodes*. 2018. vol. 7-8, pp. 3-14.

CALDAS, Claudia & BERMEJO Verónica. Manual de Procedimientos Operativos para Restaurantes de Comida Rápida. [en línea]. (Trabajo de titulación). Universidad de Cuenca, Ciencias de la Hospitalidad. Cuenca-Ecuador. 2014, pp. 04.

CANAZA, L. Determinación De La Calidad Microbiológica De Jugo De Naranja (*Citrus Sinensis L.*), De Los Puestos De Venta Ambulatoria En Los Mercados De La Plataforma Andrés Avelino Cáceres, Arequipa, 2019. [en línea]. Universidad Nacional de San Agustín De Arequipa, pp. 22. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12773/12478/Bicavala.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

CARDOZO, Jessely & RUIZ, Dalila. Evaluación físico- química y microbiológica del néctar pitahaya amarilla (*Hylocereus triangularis*), sometido a tratamientos por radiación con luz ultravioleta UV-C y pasteurización. [en línea]. (Trabajo de titulación). Universidad señor de Sipán, Facultad de ingeniería. Pimentel-Perú. 2019, pp. 57.

CORONADO, Trinidad. Elaboración de néctar: Procesamiento de alimentos para pequeños y microempresas. [blog]. Colombia: 2014. [Consulta: 12 diciembre 2022]. Disponible en: http://redmujeres.org/wp-content/uploads/2019/01/elaboracion_nectar.pdf

CUSTODE, Carlos. Estudio comparativo entre la pasteurización abierta y al vacío en las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de un néctar a base de maracuyá (*Passiflora edulis Sims.*), zanahoria (*Daucus carota L.*) y noni (*Morinda citrifolia L.*). [en línea].

(Trabajo de titulación). Universidad técnica de Ambato, Carrera de ingeniera de alimentos. Ambato-Ecuador. 2015, pp. 90.

DELGADO, Javier. Estudio de la vida útil de néctar a base de zanahoria con naranja. [en línea]. (Trabajo de titulación). Universidad tecnológica equinoccial, Carrera de ingeniería de alimentos. Quito-Ecuador. 2012, pp. 41.

DURICH, Jorge. “Toxiinfecciones un problema público”. *Revista de Medicina integral*. [en línea], 2012, (España). 40(1), pp.1-3. [Consulta: 24 octubre 2022]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-las-toxiinfecciones-alimentarias-como-problema-13033379>.

ELIKA. *Escherichia coli*. [blog]. Colombia: 2022. [Consulta: 22 junio de 2023]. Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/escherichia-coli/>

FDA. Inocuidad de los jugos - Lo que usted necesita saber. Estados Unidos: 2018. [blog]. [Consulta: 23 junio 2022]. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/buy-store-serve-safe-food/inocuidad-de-los-jugos-lo-que-usted-necesita-saber>.

FERNANDEZ RIVERON, Fernando; LOPEZ HERNANDEZ, Jorge. “Resistencia bacteriana”. *Rev Cub Med Mil* [en línea]. 2003, (México) 01 (23). [Consulta: 08 noviembre 2022]. ISSN 0138-6557. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572003000100007&lng=es&nrm=iso.

GARZÓN, Tania. “La inocuidad de alimentos y el comercio internacional”. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* [en línea], 2018, (Colombia), 22 (3), pp. 330-338. [Consulta: 21 junio 2022]. ISSN 1900-3803. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902009000300009.

GONZÁLES RODRIGUEZ, Cristina. Análisis de la calidad microbiológica de los alimentos procedentes de cadenas de comida rápida. [En línea]. (Trabajo de titulación). Universidad de Coruña, La coruña, España. 2018. pp. 02. [Consulta: 2022-06-22]. Disponible en: https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/21542/GonzalezRodriguez_Cristina_TFG_2018.pdf?sequence=2&isAllowed=y#:~:text=Microorganismos%20mes%C3%B3filos%20aerobios%20totales.,cualquier%20medio%20de%20agar%20nutritivo.

GONZÁLES RODRIGUEZ, Cristina. Análisis de la calidad microbiológica de los alimentos procedentes de cadenas de comida rápida. [En línea]. (Trabajo de titulación). Universidad de Coruña, La coruña, España. 2018. pp. 03. [Consulta: 2022-06-22]. Disponible en: https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/21542/GonzalezRodriguez_Cristina_TFG_2018.pdf?sequence=2&isAllowed=y#:~:text=Microorganismos%20mes%C3%B3filos%20aerobios%20totales.,cualequier%20medio%20de%20agar%20nutritivo.

GUEVARA PÉREZ, Américo. elaboración de pulpas, zumos, néctares, deshidratados, osmodeshidratados y fruta confitada. [En línea]. (Trabajo de postgrado). Universidad nacional agraria la molina, Lima, Perú. 2016. pp. 05. [Consulta: 2022-06-22]. Disponible en: <http://www.lamolina.edu.pe/postgrado/pmdas/cursos/dpactl/lecturas/Separata%20Pulpas%20n%C3%A8ctares,%20merm%20desh,%20osmodes%20y%20fruta%20confitada.pdf>

JAY, Javier. *Microbiología Moderna de los Alimentos*. [en línea]. Zaragoza (España). Editorial Acribia S.A, 2002. [Consulta: 15 junio 2022]. Disponible en: https://www.editorialacribia.com/libro/microbiologia-moderna-de-los-alimentos_53713/

LEMOS, Marcela. Análisis microbiológico. [blog]. Perú: 2015. [Consulta: 06 noviembre 2022]. Disponible en: <https://www.tuasaude.com/es/analisis-microbiologico/>

MARTÍNEZ, Luis. “Principales bacterias transmitidas por alimentos”. *Merida Publisher*. [en línea], 2015, (Venezuela) 40 (4), pp.1-40. [Consulta: 26 octubre 2022]. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/mp.2020.001.04>

MEDLINEPLUS. Intoxicación alimentaria. [blog]. Ecuador: 2021. [Consulta: 24 octubre 2022]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001652.htm>.

MSP. Enfermedades Transmitidas por Agua y Alimentos en Ecuador. [blog]. Ecuador: 2021. [Consulta: 21 junio 2022]. Disponible en: https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/es/.

MUÑOZ, Diane & LLORCA, Mariane. “Contaminants in the Environment”. *Academic Press*. [en línea], 2016, (Ecuador) 34 (1), pp.1-34. [Consulta: 24 octubre 2022]. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803371-5.00001-1>

NTE INEN 2 337:2008. *Jugos, pulpas, concentrados, néctares, bebidas de frutas y vegetales. Requisitos.*

NTE INEN 1529-2. *Control microbiológico de los alimentos toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.*

NTE INEN 1529-5:2006. *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. rep.*

NTE INEN, 1529-6. *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y escherichia coli.*

NTE INEN 1529-8. *Control microbiológico de los alimentos. Detección y recuento de escherichia coli presuntiva por la técnica del número más probable.*

NTE INEN 1529-11:2013. *Control microbiológico de los alimentos. Mohos y levaduras viables. Detección.*

OPS. Contaminación biológica y física. [blog]. México: 2016. [Consulta: 24 octubre 2022]. Disponible en: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=0&lang=es#gsc.tab=0

PASCUAL, Tomás. Contaminación cruzada de los alimentos. [blog]. Colombia: 2016. [Consulta: 26 octubre 2022]. Disponible en: <https://www.institutotomas Pascualsanz.com/contaminacion-cruzada-alimentos/>

ROSAS, Rafaela. “Contaminación alimentaria”. *Offarm*. [en línea], 2017, (Ecuador) 25 (6), pp.95-100. [Consulta: 24 octubre 2022]. ISSN: 0212-047X. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-contaminaciones-alimentarias-13107676>

SILVERIA, Ana & AGUAYO, Encarna. “Shelf-life and quality attributes in fresh-cut Galia melon combined with fruit juices”. *Science and Technology*. [en línea], 2014, (USA) 50 (1), pp.343-348. [Consulta: 24 octubre 2022]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.010>

TOVAR, Manuel. Mohos y levaduras. [blog]. Perú: 2019. [Consulta: 06 diciembre 2022].
Disponible en: <https://www.biomerieux.es/mohos-y-levaduras>

UNNOBA. Calidad de alimentos. [blog]. Colombia: 2020. [Consulta: 26 octubre 2022].
Disponible en: https://www.unnoba.edu.ar/wp-content/uploads/2020/05/03_Alimentaci%C3%B3n-saludable-clase-15-Calidad-de-alimentos.pdf

VIGIL, Rodrigo. Néctar de fruta tropical. [blog]. México: 2017. [Consulta: 26 octubre 2022].
Disponible en: <http://vigilagroindustria.blogspot.com/2013/06/nectar-de-fruta-tropical-con-suero-de.html>

WHO. Inocuidad de los alimentos. [blog]. Bogotá-Colombia: 2020. [Consulta: 19 julio 2022].
Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>.



ANEXOS

ANEXO A: TOMA DE MUESTRAS DE NÉCTARES DE FRUTAS



ANEXO B: NEUTRALIZACIÓN DE MUESTRA



ANEXO C: PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE



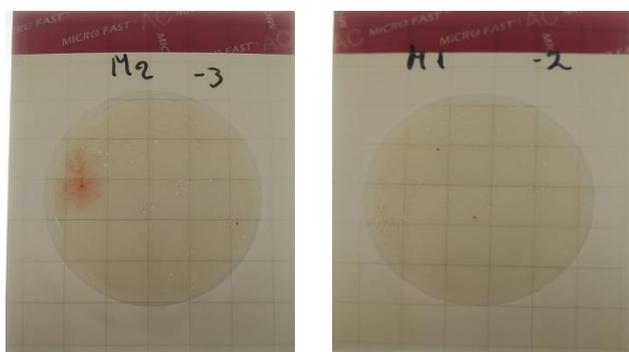
ANEXO D: INOCULACIÓN EN EL MEDIO PETRIFILM



ANEXO E: INCUBACIÓN DE LAS PLACAS PETRIFILM



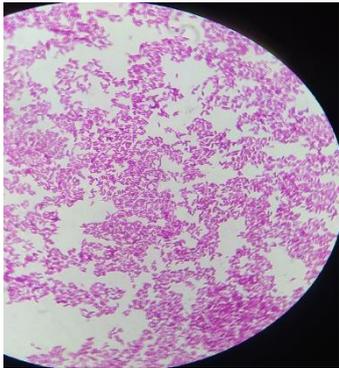
ANEXO F: RECUENTO DE PLACAS PETRIFILM



ANEXO G: RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS



ANEXO H: TINCIÓN GRAM



ANEXO I: ANTIBIOGRAMA



ANEXO J: REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS DE LA NORMA NTE INEN 2 337:2008

TABLA 4. Requisitos microbiológicos para los productos pasteurizados					
	n	m	M	c	Método de ensayo
Coliformes NMP/cm ³	3	< 3	--	0	NTE INEN 1529-6
Coliformes fecales NMP/cm ³	3	< 3	--	0	NTE INEN 1529-8
Recuento estándar en placa REP UFC/cm ³	3	< 10	10	1	NTE INEN 1529-5
Recuento de mohos y levaduras UP/ cm ³	3	< 10	10	1	NTE INEN 1529-10



epoch

**Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje**

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 24/08/2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: DANIELA GISELL PULGAR CHÁVEZ
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: CIENCIAS
Carrera: BIOQUÍMICA Y FARMACIA
Título a optar: BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Rafael Inty Salto Hidalgo

1458-DBRA-UPT-2023