



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS QUESOS FRESCOS
COMERCIALIZADOS EN EL MERCADO SIMÓN BOLÍVAR (SAN
ALFONSO) DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA**

Trabajo de Titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: JESSICA LORENA HARO CARRASCO

TUTORA: DRA. SANDRA NOEMÍ ESCOBAR ARRIETA

Riobamba-Ecuador

2016

©2016, Jessica Lorena Haro Carrasco

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

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Titulación certifica que: El trabajo de titulación: ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS QUESOS FRESCOS COMERCIALIZADOS EN EL MERCADO SIMÓN BOLÍVAR (SAN ALFONSO) DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA, de responsabilidad de la señorita Jessica Lorena Haro Carrasco, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Sandra Escobar

DIRECTORA DE TESIS

.....

.....

Dr. Ana Albuja

MIEMBRO DE TRIBUNAL

.....

.....

Dr. Carlos Espinoza

MIEMBRO DE TRIBUNAL

.....

.....

DOCUMENTALISTA SISBIB ESPOCH

.....

.....

NOTA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Jessica Lorena Haro Carrasco soy responsable de las ideas, enseñanzas y resultados plasmados en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual de la misma pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

JESSICA LORENA HARO CARRASCO

DEDICATORIA

Dedico a mis padres, a mi esposo y a mi hijo de manera muy especial a mi madre Marcia Carrasco quien fue ella el principal cimiento de construcción de mi vida profesional, sentó en mi las bases de responsabilidad y los deseos de superación y como no agradecerle a mi Dios por darme una madre maravillosa y ejemplar.

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor incondicional.

Jessica Lorena

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a Dios por bendecirme para llegar a donde he llegado y hacer realidad el sueño tan anhelado en mi vida.

A mis padres, a mi hermana, de manera muy especial a mi madre por ser el pilar fundamental a lo largo de toda mi carrera y como no darle la alegría más grande de quererme ver realizada como toda una profesional.

A mi esposo y a mi hijo Danielito que día a día estuvieron apoyándome y me supieron comprender a lo largo del transcurso de mi vida estudiantil y mi hijo ha sido la inspiración para culminar con esta meta propuesta.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por darme la oportunidad de estudiar y ser profesional.

A mi tutora de tesis, Dra. Sandra Escobar por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones. Para ellos: Muchas gracias y que Dios los bendiga.

Jessica Lorena

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Antecedentes de la Investigación.....	4
1.2. Bases Teóricas.....	6
1.2.1. Generalidades.....	6
1.2.2. Definición de queso fresco.....	7
1.2.3. Clasificación de los quesos.....	8
1.2.4. Proceso de elaboración de los quesos frescos.....	10
1.2.5. Composición química del queso fresco.....	11
1.2.6. Aporte nutricional del queso fresco.....	12
1.2.7. Factores que influyen en el crecimiento microbiano en el queso fresco.....	13
1.3. Control de calidad en la elaboración del queso.....	15
1.3.1. Higiene de los alimentos.....	15
1.3.2. Actividad del agua y deterioro de los alimentos.....	16
1.3.3. Control microbiológico.....	17
1.4. Enfermedades transmitidas por los alimentos.....	18
1.4.1. Definición.....	18
1.4.2. Clasificación.....	19
1.4.3. Sintomatología de las ETAS.....	20
1.4.4. Causas de las ETAS.....	21
1.4.5. Principales enfermedades transmitidas por alimentos.....	23
1.4.6. Contaminación de los alimentos.....	25
1.5. Métodos de identificación de carga microbiana en quesos frescos.....	28
1.5.1. Placas Petrifilm.....	28
1.5.2. Medios de cultivos convencionales.....	29
1.5.3. Tinción diferencial de Gram.....	32

1.6.	Mercado San Alfonso	33
1.6.1.	Ubicación	33
1.6.2.	Descripción	33

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	34
2.1.	Población de Estudio y Localización del muestreo	34
2.2.	Materiales, equipos y reactivos	34
2.3.	Métodos y técnicas	35
2.3.1.	Muestreo	36
2.3.2.	Análisis microbiológico	37
2.3.2.1.	Siembra en placas Petrifilm (por triplicado)	37
2.3.2.2.	Siembra en agar manitol salado	40
2.3.2.3.	Siembra en agar Eosina Azul de metileno	40
2.3.2.4.	Siembra en agar PCA	40
2.3.3.5.	Siembra por el método del NMP en agar verde bilis brillante	41
2.3.3.	Tinción Gram	42

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
3.1.	Análisis de bacterias aerobios mesófilos	43
3.2.	Análisis de bacterias coliformes totales y <i>Escherichia coli</i>	46
3.3.	Análisis de <i>Staphylococcus aureus</i>	51

	CONCLUSIONES	57
--	---------------------------	-----------

	RECOMENDACIONES	58
--	------------------------------	-----------

	BIBLIOGRAFÍA	59
--	---------------------------	-----------

	ANEXOS	
--	---------------	--

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

MSP	Ministerio de Salud Pública
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
BPM	Buenas prácticas de manufactura
OPS	Organización Panamericana de la salud
°C	Grados Celsius
G	Gramos
CDC	Centro para el control y prevención de las enfermedades
VETA	Sistema de vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos
mL	Mililitro
INEC	Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
ECET	<i>Echerichia coli enterotoxigenica</i>
L	Litro
MIPRO	Ministerio de industrias y productividad
MAGAP	Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca
mg	Miligramo
ETAS	Enfermedades transmitidas por alimentos
OMS	Organización Mundial de la Salud
FDA	Food and Drug Administration
%	Porcentaje
UFC	Unidades formadoras de colonias
<i>E.coli</i>	<i>Echerichia coli</i>
EMB	Eosina azul de metileno
NMP	Número más probable
Gram	Denominación de la coloración por su descubridor
PCA	Plate count agar

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1	Clasificación de los quesos en función del contenido de humedad.....	9
Tabla 2-1	Requisitos microbiológicos de la leche cruda.....	17
Tabla 3-1	Requisitos microbiológicos de la leche pasteurizada.....	17
Tabla 4-1	Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados.....	17
Tabla 5-1	Agentes de contaminación física.....	25
Tabla 6-1	Agentes de contaminación química.....	26
Tabla 1-2	Materiales, equipos y reactivos de laboratorio.....	34
Tabla 2-2	Muestreo para unidades pequeñas.....	36
Tabla 1-3	Recuento de bacterias aerobios mesófilos.....	43
Tabla 2-3	Recuento de bacterias coliformes totales y <i>Escherichia coli</i>	46
Tabla 3-3	Recuento de <i>Echerichia coli</i> en agar EMB.....	50
Tabla 4-3	Resultados de coliformes totales por el metodo NMP.....	51
Tabla 5-3	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	51
Tabla 6-3	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar PCA.....	54
Tabla 7-3	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar manitol salado.....	55
Tabla 8-3	Resultados de la tinción Gram.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1	Principales alimentos involucrados en el brote de ETAS.....	1
Figura 1-1	Destino de la leche en el Ecuador (2009).....	7
Figura 2-1	Diagrama general para la elaboración de queso fresco.....	11
Figura 3-1	Composición del queso fresco.....	12
Figura 4-1	Valores de actividad de agua en los alimentos.....	16
Figura 5-1	Triada ecológica de enfermedades transmisibles.....	18
Figura 6-1	Brote de ETAS en América Latina, período 1997-2002.....	19
Figura 7-1	Esquema general de las intoxicaciones alimentarias más frecuentes.....	20
Figura 8-1	Esquema general de las infecciones alimentarias más frecuentes.....	20
Figura 9-1	Agentes biológicos que constituyen riesgo alimentario.....	22
Figura 10-1	Temperaturas de incubación para <i>E.coli</i> y coliformes totales.....	29
Figura 11-1	Mapa de ubicación del mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba.....	33
Figura 12-1	Mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba.....	33
Figura 1-2	Etapas del muestreo.....	36
Figura 2-2	Instrucción de uso de Placas Petrifilm.....	39
Figura 3-2	Metodología para la determinación de coliformes(NMP).....	42

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRAFICO 1-2	Esquema del proceso de análisis microbiológico.....	35
GRAFICO 2-2	Esquema del proceso de siembra.....	41
GRAFICO 1-3	Recuento de bacterias aerobios mesófilos en placas Petrifilm 3M....	44
GRAFICO 2-3	Porcentaje de bacterias aerobios mesófilos de acuerdo a la marca de queso.....	44
GRAFICO 3-3	Recuento de bacterias <i>Escherichia coli</i> en placas Petrifilm 3M	47
GRAFICO 4-3	Recuento de coliformes totales en placas Petrifilm 3M	47
GRAFICO 5-3	Porcentaje de <i>Escherichia coli</i> de acuerdo a la marca de queso	48
GRAFICO 6-3	Porcentaje de coliformes totales de acuerdo a la marca de queso ...	48
GRÁFICO 7-3	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en placas Petrifilm 3M	52
GRÁFICO 8-3	Porcentaje de <i>Staphylococcus aureus</i> de acuerdo a la marca de queso.....	53
GRÁFICO 9-3	Resultados de la Tinción Gram expresados en porcentaje.....	56

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A	Mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba(seccion lacteos)
Anexo B	Reactivos utilizados
Anexo C	Transporte de muestras
Anexo D	Determinación de <i>Escherichia coli</i> y coliformes totales en placas Petrifilm 3M
Anexo E	Determinación de <i>Aerobios mesófilos</i> en placas Petrifilm 3M
Anexo F	Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en placas Petrifilm 3M
Anexo G	Determinación de coliformes totales por el método del NMP
Anexo H	Confirmación de <i>Escherichia coli</i> en agar EMB
Anexo I	Confirmación de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar manitol salado
Anexo J	Resultados de Tinción Gram
Anexo K	Análisis estadístico

RESUMEN

El Análisis microbiológico de los quesos frescos comercializados en el mercado central “Simón Bolívar (San Alfonso) ” de la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo tiene como objetivo determinar la calidad microbiológica de este derivado lácteo consumido por la población; La estrategia de muestreo consistió en analizar los quesos frescos de siete puestos de comercialización, el muestreo se realizó por triplicado de cada muestra durante tres sábados consecutivos en el mes de Diciembre del 2015 correspondientes 5-12-19, tomando como referencia la Norma NTE INEN 0004:1984. Para la cuantificación de la carga microbiana se analizó Coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y Aerobios mesòfilos; mediante la técnicas de detección cualitativas por Petrifilm TM y la Norma Técnica Ecuatoriana de Control microbiológico de los alimentos para la determinación de microorganismos coliformes por la técnica del Número más Probable; se manejó mediante el procedimiento de diluciones sucesivas para facilitar la cuantificación (10^{-1} hasta 10^{-3}), posterior a la incubación y presencias de unidades formadoras de colonias UFC/mL se hicieron pruebas confirmatorias de los microorganismos en agar Manitol, Eosina azul de metileno y Plate count agar. Los resultados obtenidos de la investigación fueron : bacterias *aerobias mesofilas* ($6,29 \times 10^3$, $4,96 \times 10^6$, $1,43 \times 10^6$ UFC/mL); contaje de *Staphylococcus aereus* ($4,29 \times 10^3$, $1,73 \times 10^5$, $6,99 \times 10^4$ UFC/mL); numero de *coliformes totales* ($4,19 \times 10^4$, $1,19 \times 10^5$, $2,29 \times 10^5$ UFC/mL); número de *Escherichia coli* ($1,13 \times 10^4$, 3×10^4 , $1,46 \times 10^5$ UFC/mL) valores que comparados frente a los valores de referencia que muestra la norma NTE- INEN 1528-2012, se encuentran en valores mayores a los límites microbiológicos establecidos. Se concluye que la carga microbiana presente en los quesos frescos exceden los límites permitidos por la norma correspondiente , por lo tanto estos productos no son aptos para el consumo humano, por la mala calidad de los mismos. Se recomienda ejecutar un trabajo conjunto con el Ministerio de Salud y las autoridades pertinentes de control y vigilancia sanitaria, de control continuo de Análisis microbiológicos con personal técnico, capacitado, por considerar este tema como un problema de salud pública, indicado en las estadísticas que muestra el MSP, para tomar medidas de control en la protección de la salud de los consumidores.

Palabras Clave: <QUESO FRESCO> <RIESGO ALIMENTARIO><CONDICIONES HIGIÉNICO-SANITARIAS>, <UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS [UFC/mL]> <DILUCIÓN MICROBIANA>, < ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETAS)>.

SUMMARY

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el queso fresco como subproducto de la leche es consumido masivamente por la población, constituyéndose un alimento básico por excelencia denominado así por su composición alta en proteínas, grasas y vitaminas o por la variedad de derivados que existen en el mercado. (CASTILLO Maritza & HUALPA Diana). De tal manera que la leche utilizada para la fabricación del queso fresco, debe cumplir con los requisitos de la Norma NTE INEN 10, y su procesamiento se realizará de acuerdo a los principios del Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura del Ministerio de Salud Pública. (INEN. Primera edición. pp 1-5).

Según estadísticas registradas por el Ministerio de Salud Pública muestran que son altas las intoxicaciones producidas por alimentos y las enfermedades transmitidas mediante alimentos conocidas como (ETAS) son uno de los principales problemas de salud a nivel mundial y causa importante de reducción en el crecimiento de la seguridad alimentaria; sin embargo, en la mayoría de los casos se desconoce el origen.

El Ministerio de Salud Pública (MSP) en el año 2008 registra más de 10000 casos de intoxicaciones ocasionadas por alimentos, pero no se realizó la cuantificación ni la identificación del microorganismo causal de las enfermedades ocasionando en mucho de los casos hasta la muerte concluyendo así que los principales alimentos involucrados en los brotes de ETAS son:(PLAZA IBARRA Luis Antonio, MORALES ROMO Leroux Ma. Fernanda, ESPOL).

Alimento involucrado	% Brotes
Pescados	21.52
Agua	19.51
Carnes rojas	14.20
Lácteos	7.88
Huevo-Mayonesa	5.85
Carnes de aves	5.08
Hortalizas-Leaumbres	2.39

Figura 1-Introducción: Principales alimentos involucrados en el brote de ETAS

Fuente: SIRVETA (Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos)

Particularmente en la ciudad de Riobamba, el consumo de quesos frescos es masivo, mientras la producción y la comercialización del mismo se da artesanalmente hasta industrialmente. La forma de ofrecer alimentos a los consumidores no debe presentar alto riesgo sanitario, así como

las condiciones en que se expenden dichos productos deben ser apropiadas, para que no favorezca la proliferación de microorganismos o conocida como contaminación microbiana.(Ruth L.DELGADO Cristóbal y Dora J. MAURTUA TORRES. pp 158-163)

Estudios de la calidad microbiológica de los quesos frescos no se evidencian en esta zona central de la provincia de Chimborazo, es por ello la importancia de realizar esta investigación con la finalidad de garantizar que los productos lácteos (quesos frescos) comercializados en los mercados sean inocuos y de calidad para que no atenten contra la salud de la población. Además de ser una guía para investigaciones posteriores.

Conocer el tipo de microorganismos que se desarrollan en los quesos frescos comercializados artesanalmente en los mercados y saber la forma de distribución de este producto altamente contaminante, contribuye a las políticas de salud en donde el cuidado de la misma es el eje prioritario para el desarrollo del país y lograr los objetivos del plan nacional del buen vivir y soberanía alimentaria.

La falta de inocuidad de los quesos frescos constituye el ambiente propicio para la proliferación de microorganismos y atenta directamente contra la salud de los individuos, identificando si el consumo de este alimento es una causa de las enfermedades transmitidas por alimentos que se encuentra constituyendo un alto porcentaje a nivel de salud mundial.

La falta de información específica de investigaciones microbiológicas de los quesos frescos comercializados en este mercado central de la ciudad de Riobamba y siendo un mercado que satisface las necesidades de toda la población se ha visto la necesidad de realizar este estudio.

Es por esto que se realizó el análisis de la calidad microbiológica de los quesos frescos en el mercado popular de la ciudad de Riobamba conocido tradicionalmente como San Alfonso con la finalidad de ayudar a los comerciantes a concientizar sobre la manipulación de estos alimentos que son tan consumidos por todo el mundo y a tener las condiciones higiénico sanitarias de comercialización, manipulación y conservación de los mismos.

Ayudaremos a resolver problemas de salud por lo tanto ha economizar gastos mejorando así la economía del país y orientando a ver dónde deberá tomar cartas las autoridades permanentes de control y vigilancia sanitaria.

Logrando una seguridad alimentaria mediante el adecuado control de la calidad de la materia prima durante su procesamiento hasta obtener un producto manufacturado óptimo, pero también

es crucial lograr condiciones adecuadas de almacenamiento, transporte y manipulación del producto final en los mercados.

Finalmente estamos contribuyendo a las nuevas políticas de salud, en donde la salud del ser humano es el eje prioritario, satisfaciendo las necesidades y vigilando constantemente todos los procesos que atenten contra la integridad de la persona.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes de la Investigación

Ruth L. Cristóbal Delgado 1 y Dora J. Maurtua Torres realizaron un estudio acerca de la calidad microbiológica de quesos frescos artesanales en siete mercados populares de Lima-Perú, recogieron 39 muestras de 100gramos cada una por el lapso de dos se evaluó bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales y fecales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus spp*; de manera general concluyendo que el 97.4% de muestras estuvo por encima de los valores máximos establecidos por la norma Peruana 202.087 para las diferentes especies de microorganismos analizados. La presencia de *Lactobacillus spp* no impidió el desarrollo de los otros microorganismos y se pudo determinar con claridad la carga microbiana que existe y se refleja con estos resultados las malas condiciones higiénicas que se maneja en estos mercados.

Cándida Díaz-Rivero y Bedirva González de García encargado del laboratorio de microbiología de alimentos realizó un estudio de los quesos como producto de consumo masivo en Venezuela ciudad de Mérida en diferentes lugares de expendio cuyo objetivo se enfocaba en realizar el análisis microbiológico para determinar la presencia de *Staphylococcus aureus*, microorganismos indicadores de calidad sanitaria como son coliformes totales y fecales, mohos y levaduras. Las muestras fueron tomadas de un total de 72 unidades una muestra representativa de 10 gramos, cuyo análisis se realizó para *S.aureus* en agar Baird Parker a una temperatura de 35°C y para coliformes fecales y totales en caldo lauril sulfato y para su confirmación el caldo verde bilis brillante a 35°C. Los resultados fueron bastante curiosos por el alto contenido de microorganismos que existe dado que el 41.67% de muestras indican que existe contaminación con *S.aureus* por encima de los máximos valores establecidos y únicamente el 8.34% muestras datos inferiores lo que evidencia la mala práctica higiénico sanitarias que le dan al producto y las autoridades permanentes de control deben enfocarse en estas situaciones críticas que traen riesgos para la salud del ser humano.

Maldonado, Ronald Llanca, Luis, realizaron una investigación sobre las características físico - Químicas y microbiológicas del queso fresco en la ciudad de Girardot de Venezuela, tomaron 32 muestras de cuatro lugares de mayor comercialización en este país y los resultados muestran

que los valores determinados están por encima de los rangos establecidos de la norma Venezolana COVENIN lo cual muestra que el consumo de este producto que no deja de ser básico en las comidas llevara a un riesgo de salud pública.

Anacleto Félix-Fuentes, Olga Nydia Campas-Baypoli y Mercedes Meza-Montenegro, de la ciudad de Sonora México son investigadores que realizaron el estudio de la calidad sanitaria de alimentos que se encuentran a la venta libre en mercados como son los quesos frescos en siete sitios con cinco repeticiones de cada muestra por el lapso de quince días cuyo análisis estuvo enfocado en la determinación de *Staphylococcus aureus*, Coliformes fecales, Mohos y levaduras, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*. Los resultados encontrados muestran una alta contaminación, indicando que el queso fresco más del 85% de muestras tomadas y analizadas sobrepasa las especificaciones microbiológicas lo cual muestra la deficiencia en la manipulación y conservación del producto durante la elaboración, transporte y venta.

José Gregorio Márquez y Carmen Elena García R, mencionan sobre un estudio realizado sobre la flora patógena en los quesos frescos elaborados en cuatro estados de Venezuela, la flora patógena corresponde a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, cuyo recuento se realizó en películas rehidratbles Petrifilm 3M. Los resultados muestran que son significativamente mayores a los establecidos en las normas para los microorganismos analizados lo que indica las malas condiciones sanitarias de producción, almacenamiento, transporte y comercialización para este producto y finalmente concluyendo que tiene una deficiente calidad sanitaria.

Plaza Ibarra Luis Antonio, Morales Romo –Leroux Ma. Fernanda, realizó una investigación acerca del análisis microbiológico de los quesos frescos comercializados en los mercados de la ciudad de Guayaquil para determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* y *Listeria* utilizando métodos de rápida detección y métodos tradicionales normados. Se realizó un muestreo aleatorio por atributos, en donde por cada marca de queso de 250 g se tomó 5 muestras, se transportó las muestras en un contenedor con hielo a una temperatura de 6°C hasta su llegada al laboratorio de análisis con un tiempo máximo de cinco horas. Los resultados muestran la falta de inocuidad de los quesos expendidos en estos mercados debido a la presencia de *Salmonella* y *Listeria* que se encontró teniendo en cuenta la prevalencia de *Listeria* en mayor porcentaje.

Un estudio en Perú muestra resultados como producto de la investigación que los quesos frescos comercializados en los mercados de Lima no cumplen con los parámetros establecidos en las normas y regulaciones vigentes presentando condiciones higiénico sanitarias deficientes lo cual se evidencia la falta de control por parte de las autoridades designadas a esta función; en el

análisis se evidencio un gran número de Coliformes fecales y totales, *Escherichia coli*, Bacterias aerobios mesófilos y *S.aereus*.

1.2. Bases Teóricas

1.2.1. Generalidades

La actividad agrícola es sustituida por la actividad ganadera en la provincia de Chimborazo en donde alrededor de 361 133 litros de leche se comercializan a diario en los cantones de mayor producción como son Guano, Colta, Alausí, Riobamba y Chunchi. Cristina Márquez nos indica que la leche producida en la provincia de Chimborazo es muy cotizada en la industria láctea. Por ello, 242 344 de los 509 352 habitantes optaron por dedicarse a la ganadería. A pesar que la agricultura en la provincia aún es la actividad más recurrente, la producción lechera tienta cada vez más a los campesinos por ser rentable y menos riesgosa.

El Consejo Provincial de Chimborazo entregó tanques de refrigeración y otros implementos para equipar un centro de acopio y reciben 361 133 litros de leche diarios. El 73% del producto se comercializa a las fábricas Toni y Nutrileche. También se envía a las pequeñas empresas y la recolección se realiza en la mañana.

El Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), promueve desde el 2012 la Estrategia 'Hombro a Hombro', que consiste en asignar a un técnico pecuario a cada parroquia de la provincia. Los especialistas revisan a los animales, les entregan medicamentos y enseñan a las técnicas de inseminación artificial para el mejoramiento genético. Asimismo, tienen un centro de acopio de heno para las épocas de sequía.(Marquez Cristina)

El Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) busca contribuir al buen vivir de las familias rurales y comunidades costeras a través del impulso de la agricultura, ganadería, acuacultura y pesca multifuncional, para asegurar la soberanía alimentaria y el incremento de los ingresos de los productores.

El Ministerio de Industrias y Productividad (MIPRO) impulsa el desarrollo de la industria y la artesanía. Incentivar la inversión y la innovación para que los bienes y servicios que se produzcan tengan mayor valor agregado y niveles convenientes de calidad, en armonía con el medio ambiente, para crear empleo de calidad y lograr que los productos conquisten los mercados nacionales e internacionales. (Ministerio de coordinación de la producción, empleo y competitividad. Mayo 2011.)

Ecuador es considerado un país muy importante en la producción diaria de alrededor de cuatro millones de litros de leche exportados a todas partes del mundo, en la actualidad se conoce que en estos últimos ocho años el consumo per cápita de queso debido a la gran demanda que existe ha sido duplicado mostrado en cifras porcentuales que equivale a 0.75 kilos por persona al año 2006 a 1.57 kilos en el año pasado. (REVISTA EL AGRO)

Ecuador experimenta un crecimiento entre el 25 y 30% en cada año de lácteos y sus derivados. (EL TELEGRAFO)

Respecto al crecimiento del ganado vacuno fue de 2% a nivel nacional, siendo la región Sierra la que mayoritariamente sufrió este cambio seguida de la región Costa y finalmente la región Oriente por tal razón la producción de leche que pertenece a la región Sierra es la que más aporta con un valor del 75.9% y en el orden anterior decrece respectivamente el porcentaje de producción de leche. De igual manera la producción de leche en litros por vaca en promedio en la Sierra es 6.7 siendo alimentados estos animales con la gran variedad de pastos y cultivos que existen en esta región. Caracterizándose por ser una región con una biodiversidad de flora incomparable del país. (INEC)

La producción de queso industrial en el año 2003 fue de 126,237 toneladas. Conociendo que la mayoría de micro o pequeñas empresas lo producen de manera artesanal el queso fresco por lo general. (GONZALES Edgar)



Figura 1-1: Destino de la leche en el Ecuador (2009)
Fuente:Escuela Politecnica Nacional

1.2.2. Definición de Queso fresco

El CODEX ALIMENTARIUS define al queso como un producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante:

a) coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada/descremada, leche parcialmente desnatada/descremada, nata (crema), nata (crema) de suero o leche de mantequilla/manteca, o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los materiales lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso; y/o

b) técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado (a) (CODEX ALIMENTARIUS)

Queso fresco. Es el queso no madurado, ni escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular, preparado con leche entera, semidescremada, coagulada con enzimas y/o ácidos orgánicos, generalmente sin cultivos lácticos. También se designa como queso blanco.

Según Ramírez – López menciona una definición de queso desde el punto físico químico como un sistema tridimensional tipo gel, constituido principalmente por un complejo de caseína, fosfato y calcio que por medio de la coagulación compacta partículas de agua, grasa, lactosa, albuminas, globulinas, albuminas, vitaminas y otras sustancias menores de la leche que permanecen en una fase retenidas. (RAMIREZ C. Lopez)

1.2.3. Clasificación de los quesos

Según la NTE .INEN 1528-2012 de acuerdo a su composición y características físicas el producto, se clasifica en:

Según el contenido de humedad

- a) Duro
- b) Semiduro

c) Semiblando

d) Blando

Según el contenido de grasa láctea

a) Rico en grasa

b) Entero ó Graso

c) Semidescremado ó bajo en grasa

d) Descremado ó Magro (CODEX ALIMENTARIUS)

Tabla 1-1: Clasificación de los quesos en función del contenido de humedad y grasa.

Tipo o Clase	Humedad % max	Contenido de grasa en extracto en % masa
Semiduro	55	-
Duro	40	-
Semiblando	65	-
Blando	80	-
Rico en grasa	-	60
Graso	-	45
Semigraso	-	20
Magro	-	0.1
Semimagro	-	0.5

Fuente: Norma técnica Nicaragüense 03 022-99

Según la norma técnica Nicaragüense 03 022-99 lo ha clasificado al queso de acuerdo a su composición y características físicas en los siguientes tipos:

Según características del proceso

- Fresco: Para consumir hasta 10 días después de su fabricación.
- Semiduro: Para consumir después de reposar entre 10 y 30 días después de su fabricación.
- Madurado: Para consumir después del tiempo asignado según el tipo de queso.
- Madurado por mohos.
- Fundido. (NORMA TECNICA NICAGUARENSE, 03 022 – 99)

Según la corteza

- Sin corteza : quesos frescos
- Corteza seca: son los que hacen ellos mismos su corteza de forma natural al secarse. Cuanto más tiempo, más secado y más o menos corteza. Luego hay que lavarlos e incluso cepillarlos.
- Corteza enmohecida: en su proceso se les hace una corteza por moho que se deposita en su exterior y dicha corteza puede comerse si se quiere.

- Corteza artificial: son los que se les coloca voluntariamente una corteza exterior para protegerles: como hojas, carbón vegetal, cera, extractos vegetales. (Anónimo. Disponible en :http://www.bedri.es/Comer_y_beber/Queso/Tipos_de_quesos.htm)

1.2.4. Proceso de elaboración de los quesos frescos

- Enfriar la leche a 38°C
- Para recuperar el calcio perdido en el proceso de calentamiento agregar cloruro de calcio.
- Agregar un mililitro de cuajo por cada diez litros de leche o si es sólido el cuajo disolver un cuarto de la pastilla de cuajo en media taza con agua.
La función principal de los fermentos es decir de las bacterias lácticas que se encuentran en la leche es la transformación de la lactosa a ácido láctico que facilitan la formación y desuerado de la cuajada, evita la proliferación y crecimiento de microorganismos perjudiciales para la salud del ser humano debido a que el pH disminuye a 5 dándole un sabor característico del queso ácido. Además las bacterias dan lugar a las sustancias que se encargan del aroma y ayudan a la maduración del queso mediante la proteólisis (ruptura de las proteínas) y lipólisis (ruptura de las grasas). (LIC. GONZALEZ VILLAREAL. Septiembre 2002.)
- Agitar por el lapso de un minuto con una paleta.
- Dejar a la leche en reposo por 45 minutos.
- Cortar la cuajada con ayuda de una paleta bien limpia o cuchillo en cuadritos de aproximadamente un centímetro cuadrado.
- Mover la cuajada suavemente con una paleta de acero inoxidable durante cinco minutos.
- Calentar la cuajada a 40°C por cinco minutos.
- Dejar en reposo la cuajada durante cinco minutos.
- Desuerar la cuajada en bandeja de acero inoxidable.
- Recolectar el suero puede ser de utilidad para otros procesos requesón.
- Agregar sal gruesa de cocina.
- Amasar la cuajada en material de acero inoxidable
- Moldear la cuajada amasada
- Colocar el queso fresco en bandejas de acero inoxidable.
- Conservar en refrigeración a cuatro grados centígrados.
- El rendimiento que se obtiene por cada diez litros de leche semidescremada será de tres libras de queso fresco en promedio. (FAO)

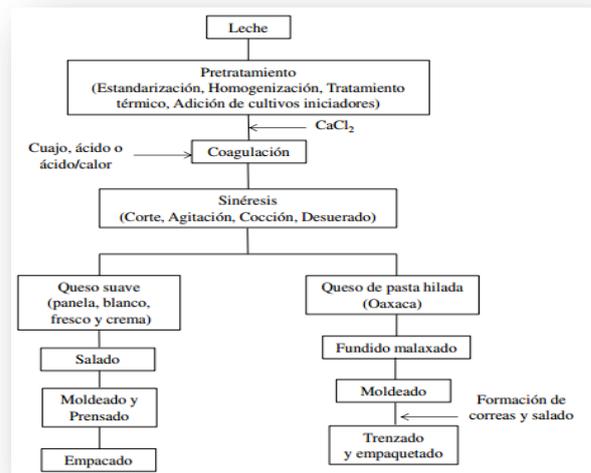


Figura 2-1: Diagrama general para la elaboración de queso fresco

Fuente: C. Ramírez López

1.2.5. Composición química del queso fresco

El queso está compuesto por varios nutrientes que se estima aproximadamente que por cada 100 gramos de queso el aporte de calorías es 103 kilocalorías. Los nutrientes que contiene son:

- ❖ Agua en un 80%
- ❖ Grasas en un 4.51%
- ❖ Proteínas en un 12.49%
- ❖ Carbohidratos en un 2.68%
- ❖ Fibra no contienen en un 0%

Como aporte en contenido de minerales también es muy rico en sodio, fósforo, potasio, calcio y en menor cantidad el selenio.

Además poseen en su composición vitaminas de gran aporte para la salud entre las cuales tenemos:

- Vitamina D
- Vitamina A
- Pequeñas cantidades de vitamina B
- Vitamina B12
- Vitamina E(BOTANICALONLINE)

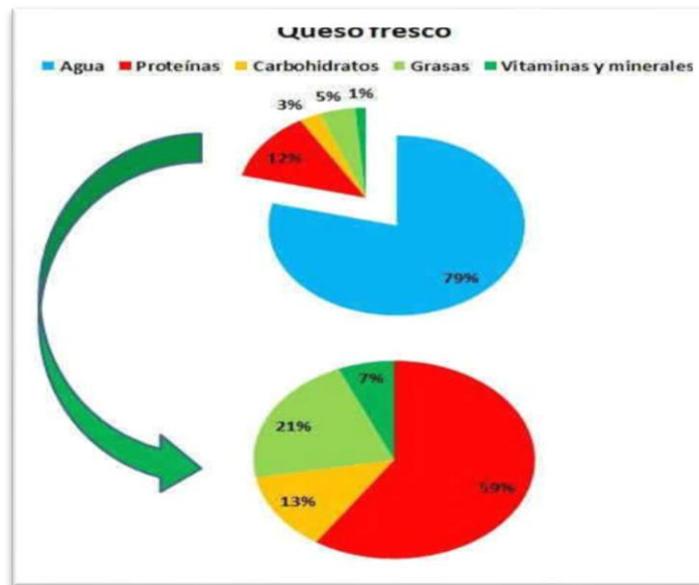


Figura 3-1: Composición del queso fresco
Fuente: Botánica online

1.2.6. Aporte nutricional del queso fresco

Como se ha ido conociendo a lo largo del crecimiento de la humanidad que la leche es el alimento más completo que existe por esta razón el queso fresco como producto derivado poseen un destacado valor nutricional, teniendo muy en cuenta que depende de la variedad de queso para el aporte de nutrientes a la dieta es decir existe en el mercado quesos enriquecidos con vitaminas, calcio, potasio y un sinnúmero de sustancias químicas que pueden ser añadida para agregarle un valor nutricional y por lo tanto influye en el costo económico. Saber que en la alimentación no debe faltar el queso por su importancia en el crecimiento y formación de huesos, dientes sanos y fuertes, además de influir directamente en el aumento de peso en personas que pretenden reducir medidas por el aporte de muchas calorías por la presencia de grasas saturadas que contiene este producto por ser un derivado de origen animal.

No solamente podemos hablar de grasas sino al contrario aporta:

- Vitaminas A, D, B12 y B12 ayudando al funcionamiento del sistema nervioso y cardiovascular, mejorando el proceso de cicatrización, protegiendo la piel, protección frente a infecciones.
- Proteínas de buena calidad: posee una similitud con el aporte de proteínas que proporciona la carne roja con el queso fresco caracterizándose por reparar y mantener los tejidos del cuerpo.

Calcio y Fosforo: ayuda en el refuerzo y crecimiento de los huesos, mientras que una porción de 100g de queso fresco equivale a 1000mg, siendo un gran aporte de este mineral en cantidad suficiente lo anteriormente mencionado. Una porción diaria para niños y adolescentes es de 40g mientras que en adultos es de 30g, de esta manera se constituye en alimento con un alto valor nutritivo que contiene todos los nutrientes de la leche pero de manera sólida y concentrada. Al ser un alimento que carece de vitamina C debe ser complementado en la alimentación con alimentos que sustituyan este defecto para mantener una dieta equilibrada diaria y no tener problemas de déficit de nutrientes. (ANONIMO)

Todo el valor nutritivo que aporte el queso va a depender del manejo zootécnico que se realice a la vaca por lo tanto se incrementa la producción en cantidad y calidad de alimento que se va a obtener, del estado de salud del animal va a depender estos parámetros de calidad y del tipo de alimentación que se le dé. (ZAMORA Roxana, SALVADOR Alejandro, ALVARADO Carlos y BETANCOURT Ricardo.)

De esta forma se puede mencionar algunos aportes nutritivos que proporciona el queso para la salud del ser humano:

- Alto contenido en calcio que varía en función del tipo de queso. Una ración de queso puede aportar un tercio de la cantidad diaria recomendada.
- Mantenimiento de la estructura ósea específicamente huesos en estado normal por el contenido de calcio que posee.
- Alto valor biológico por su alto contenido de proteínas de buena calidad.
- Fuente de péptidos bioactivos.
- Funcionamiento óptimo del sistema inmunitario por el aporte elevado de vitamina B12 en su composición.
- Estado de salud óptimo ya que disminuye el cansancio y fatiga en personas por su aporte mayoritario de magnesio.
- Control de la presión arterial normal por su alto contenido en potasio.
- Síntesis de los hidratos de carbono de manera adecuada por su composición de ciertos quesos con alto contenido de zinc.
- Cuidado de la piel por su alto contenido de vitamina A. (SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MEDICINA Y COLABORADORES.)

El valor nutricional del queso depende del tipo de leche utilizada en su elaboración, de su proceso de fabricación, y de las condiciones de maduración, que condicionan las pérdidas de componentes que experimentan los mismos. A pesar de esto, de manera general, el consumo de

queso reporta en gran número de beneficios entre los que destaca su gran valor nutricional. Es una buena fuente de proteínas con alto valor biológico y con elevado contenido en aminoácidos esenciales; posee un alto valor energético, dependiendo fundamentalmente de la cantidad de grasa, y de su aporte en algunos ácidos grasos esenciales. Además, contiene cantidades apreciables de minerales, especialmente de calcio de fácil asimilación, vitaminas esenciales excepto el ácido ascórbico y puede ser consumido por aquellas personas intolerantes a la lactosa ya que, la que no desaparece durante el proceso de desuerado, va a ser transformada a ácido láctico. Aunque desde el punto de vista nutritivo, su consumo es recomendable a cualquier edad, es especialmente importante en etapas de crecimiento y desarrollo, así como para el mantenimiento de la masa muscular y ósea.

El aporte energético necesario para cubrir las necesidades corporales proviene esencialmente de la ingesta diaria de alimentos, en particular de aquellos nutrientes llamados energéticos, es decir, los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas. La energía potencialmente poseen los alimentos, y que se encuentra almacenada en forma química, se cuantifica en unidades de calor llamadas Kilocalorías y expresan el valor energético o calórico que tienen los alimentos.

Para determinar la energía de un alimento se pueden utilizar métodos directos, como la bomba calorimétrica, que cuantifica el calor de combustión liberado por una cantidad conocida de un alimento. Sin embargo, debido a las pérdidas digestivas, tan sólo parte de la energía de los alimentos, la denominación energía metabólica, es aprovechada por células. (CASTILLO Glenda.Espoch.2013.pp 14-17)

1.2.7. Factores que influyen en el crecimiento microbiano en el queso

El control de crecimiento en los quesos frescos corresponde a una variedad de parámetros físicos como la concentración de la humedad, la cantidad de sal, a la actividad del agua, el pH, la presencia de ácidos orgánicos, la temperatura de conservación, el potencial redox y la adición de nitratos. Además influyen una serie de parámetros biológicos como es la disponibilidad de nutrientes para una serie de reacciones que se da en los microorganismos y la interacción entre los microorganismos presentes en el queso.

Los valores de la actividad de agua en los quesos después del salado depende de la cantidad de sal y la cantidad de suero que salga del producto y suele ser inferior a 0.988. Estos valores suelen ser significativamente inferiores a los ideales para la mayoría de las bacterias, incluidas las bacterias lácticas y por lo tanto se contribuye al control de la multiplicación microbiana. La actividad de agua mínima para las bacterias lácticas oscila entre 0.93 a 0.98 dependiendo de las

cepas. Por lo tanto la sal disminuye la actividad de agua e inhibe el crecimiento microbiano y la concentración de sal va ser variable.

El pH adecuado para el crecimiento microbiano esta en torno a la neutralidad y el crecimiento es escaso a pH ácidos menores a 5. Los microorganismos que intervienen en la elaboración de quesos son normalmente mesofilos y termófilos, con crecimiento óptimo a 30 y 42°C.

El potencial redox suele ser negativo, en el interior del queso es anaerobio por lo que el crecimiento microbiano suele ser flora anaerobia o anaerobia facultativa por lo que microorganismos aerobios no crecen en el centro del queso.

1.3. Control de calidad en la elaboración del queso

1.3.1. Higiene de los alimentos

El desarrollo y elaboración de un plan de protección sanitaria de los consumidores de alimentos debe ser analizado en primera instancia las situaciones prioritarias que afectan directamente con la finalidad de obtener un beneficio, garantizando la salud y manteniendo un acuerdo con las políticas de inocuidad de los alimentos refiriendonos a las actividades de control sanitario y el estado de salud de la población. Por lo tanto se debe trabajar en conjunto con las personas que sean involucradas directa e indirectamente y los propios consumidores en resguardo de su bienestar.

La responsabilidad del MSP es la protección sanitaria de los alimentos como organismo rector de la salud poblacional a través de los organismos encargados de funciones específicas en el control y regulación de la seguridad alimentaria haciendo un llamado a todas las personas involucradas dentro de este proceso para lograr elevar la calidad de los productos de expendio en mercados, centros comerciales, etc. (CABALLERO Angel y CARDONA Marta, pp 224-228)

Se define como higiene de manera general a la ciencia encargada de mantener y cuidar la salud. Mientras tanto higiene refiriendonos a los alimentos se centra en cuidar y promover la salud de las personas asegurando la sanidad e inocuidad de los alimentos. Previo a un estudio minucioso de conocer cuál es la higiene que tienen los alimentos es fundamental contar con un conocimiento básico de que es la contaminación, como se da y como se puede solucionar este problema y se menciona una definición de contaminación a la presencia de materia de naturaleza extraña a la del alimento en el cual se encuentra; entonces se concluye con esto que

la higiene de los alimentos se ve enfocada a eliminar o reducir al máximo la contaminación en los alimentos.

1.3.2. Actividad de agua y deterioro de los alimentos

A la actividad del agua se define como la cantidad de agua libre que hay en un alimento, es decir, la cantidad de agua disponible para reaccionar químicamente con otras sustancias y provocar el crecimiento microbiano. El resto de agua que permanece en el alimento es el agua ligada, está combinada con otros elementos y no está disponible para los microorganismos, por tanto no afecta al crecimiento microbiano.

La actividad del agua es probablemente el parámetro más importante en el campo de la conservación de alimentos ya que es un indicador del crecimiento microbiano de los alimentos y de la velocidad de deterioro. En el campo de la seguridad alimentaria, conociendo la actividad del agua de un alimento, puede predecirse qué tipo de microorganismos se van a desarrollar. También es un indicador de propiedades físicas, tales como la textura, color, el sabor, la consistencia y el aroma.

Cuando un producto está expuesto al aire ambiente, la actividad del agua del producto tiende a equilibrarse con la humedad relativa del aire que lo rodea. Productos con alta actividad del agua tienen una textura jugosa, húmeda, blanda, cuando baja la actividad del agua se vuelve resecos. Productos con baja actividad del agua tienen una textura seca, crujiente, cuando sube la actividad del agua se vuelven blandos, pasados, remojados. (ANÓNIMO. http://www.iberfluid.com/consierge/docs/1458_articles_786_Actividad%20del%20agua.pdf)

Actividad de agua (aw)	Bacterias	Mohos	Levaduras	Alimentos en este rango de aw
0,95 a 0,99	si	no	no	Carne y pescado, fruta, verduras, frutas enlatadas, vegetales enlatados, embutidos
0,90 a 0,94	si	si	si	Queso fresco, jamón, leche evaporada
0,87 a 0,89	si	no	si	Leche condensada azucarada, quesos curados, carne seca, tocino
0,80 a 0,86	no	si	si	
0,71 a 0,79	no	si	no	Mermeladas, mazapán, higos secos
menor a 0,60	no	no	no	Caramelos, miel, cacao,

Figura 4-1: Valores de actividad de agua en los alimentos

Fuente: Disponible en: <http://gastronomiasolar.com/actividad-de-agua-alimentos/>

1.3.3. Control microbiológico

La leche cruda para el procesamiento de cualquier producto lácteo debe cumplir los requisitos microbiológicos establecidos en la NTE INEN 09 los mismos que se observa en la Tabla 2-1.

Tabla 2-1: Requisitos microbiológicos de la leche cruda.

Requisito	Límite máximo	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos REP, UFC/cm ³	1,5 x 10 ⁶	NTE INEN 1529 – 5
Recuento de células somáticas/cm ³	7,0 x 10 ⁵	AOAC – 978.26

Fuente: NTE INEN 09

La leche pasteurizada debe cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en la NTE INEN 10, los mismos que se observan en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1: Requisitos microbiológicos de la leche pasteurizada.

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Recuento de microorganismos mesófilos, UFC/cm ³	5	30 000	50 000	1	NTE INEN 1 529-5
Recuento de coliformes, UFC/cm ³	5	< 1	10	1	AOAC 991.14
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	0	-	0	ISO 11290-1
Detección de <i>Salmonella</i> /25 g	5	0	-	-	NTE INEN 1529-15
Recuento de <i>Escherichia coli</i> , UFC/g	5	<10	-	0	AOAC 991.14

Fuente: NTE INEN 10

De acuerdo a la NTE INEN 1528: 2012 de queso fresco, en los requisitos microbiológicos se establece que “los quesos frescos no madurados deben dar ausencia de microorganismos patógenos, de sus metabolitos y toxinas” como se indica en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1: Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Enterobacteriaceas, UFC/g	5	2x10 ²	10 ³	1	NTE INEN 1529-13
<i>Escherichia coli</i> , UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991.14
<i>Staphylococcus aureus</i> UFC/g	5	10	10 ²	1	NTE INEN 1529-14
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	ausencia	-		ISO 11290-1
<i>Salmonella</i> en 25g	5	AUSENCIA	-	0	NTE INEN 1529-15

Fuente: NTE INEN 1528-2012

1.4. Enfermedades transmitidas por los alimentos.

1.4.1. Definición

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos pueden generarse a partir de un alimento o de agua contaminada. Son llamadas así porque el alimento actúa como vehículo de transmisión de organismos dañinos y sustancias tóxicas. Un brote de ETA se da cuando dos o más personas sufren una enfermedad similar después de ingerir un mismo alimento y los análisis epidemiológicos señalan al alimento como el origen de la enfermedad, que luego es confirmado por el laboratorio. (CASTILLO Glenda.EsPOCH.2013.pp 33)

En la transmisión de ETAS participan tres elementos los cuales son agente, huésped y medio ambiente conocidos en conjunto con el nombre de triada ecológica. Estos tres elementos interactúan juntos caso contrario si uno de ellos no está presente no se dará la transmisión por lo tanto las medidas de control debe realizarse al eslabón que resulte más fácil de actuar, económico y que asegure el bloqueo de ese problema. (CABALLERO Angel y CARDONA Marta.pp 235-240)

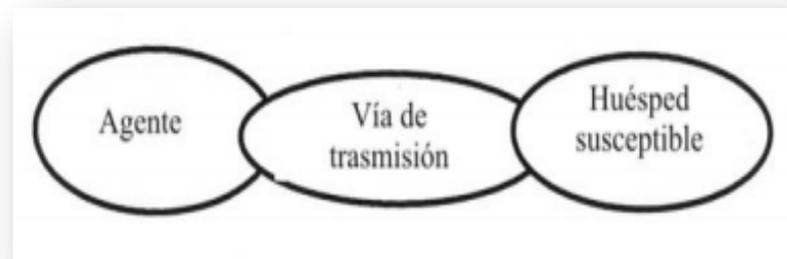


Figura 5-1: Triada ecológica de enfermedades transmisibles

Fuente: Ángel E. Caballero Torres.

El consumir productos alimenticios y/o agua que se encuentren contaminados con agentes patógenos en cantidades suficientes que afecten la salud del ser humano ya sea de manera individual o colectiva se lo conoce como enfermedades transmitidas por los alimentos.

En Ecuador no existe estadísticas sobre casos de ETA debido al consumo de queso fresco sin embargo, este es uno de los alimentos de mayor consumo, encontrándose una cantidad importante del producto comercializado en el mercado, procedente de pequeños productores, quienes sin preparación técnica alguna, se aventuran a realizar esta actividad. Entre los errores que se cometen, destacan el empleo de materia prima inadecuada y sin ningún tratamiento de

higienización, condiciones sanitarias inapropiadas durante el proceso, deficiente refrigeración en el producto terminado y ausencia de empaque acorde, lo que conlleva a una potencial presencia de *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. (CASTILLO Glenda.Espoch.2013.pp 33-34)

País	Total de brotes	No. de afectados	Total fallecidos
Argentina	147	3149	5
Bolivia	5	1248	2
Brasil	432	10701	4
Chile	3	48	0
Colombia	1	19	0
Costa Rica	1	4	0
Ecuador	28	1871	12
El Salvador	13	249	0
México	461	9889	41
Nicaragua	105	1059	0
Panamá	14	101	1
Paraguay	65	1055	0
Perú	83	3849	31
Rep. Dominicana	62	1681	0
Uruguay	94	2312	1
Venezuela	193	5322	9

Figura 6-1: Brote de ETA en América Latina, periodo 1997-2002

Fuente: Harrison 2004

1.4.2. Clasificación

Las ETAS se pueden clasificar o manifestar de las siguientes formas:

- Infecciones transmitidas por alimentos: Son enfermedades que se contraen al consumir alimentos contaminados con microorganismos patógenos que colonizan, se multiplican e invaden el cuerpo. En esta no tenemos elaboración de toxinas por parte del microorganismo.
- Intoxicaciones alimentarias: Enfermedad que se genera por ingesta de alimentos contaminados o que contienen sustancias tóxicas-toxinas, de origen biológico o no. - 35 - Son sustancias difíciles de detectar, debido a que no tienen olor ni sabor. Estas sustancias también son capaces de provocar ETA, aun después de destruir los microorganismos (la toxina no se destruye).
- Toxiinfección alimentaria; enfermedad que resulta de la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos patógenos que, además de multiplicarse e invadir el cuerpo, producen toxinas.
- Lesiones físicas transmitidas por alimentos; enfermedad o lesión que resulta de la ingesta de alimentos con objetos físicos (vidrios, metal, etc.).

- Alergias causadas por alimentos; reacción adversa que se da con la ingesta de alimentos o aditivos alimentarios en personas sensibles a estos mismos. (CASTILLO Glenda.Espoch.2013.pp 35)

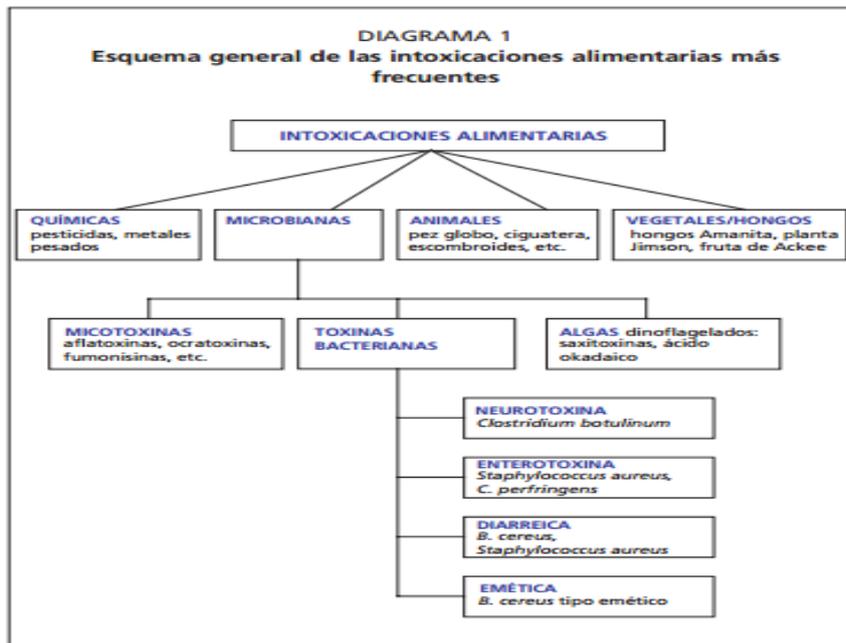


Figura 7-1: Esquema general de las intoxicaciones alimentarias más frecuentes
Fuente: FAO

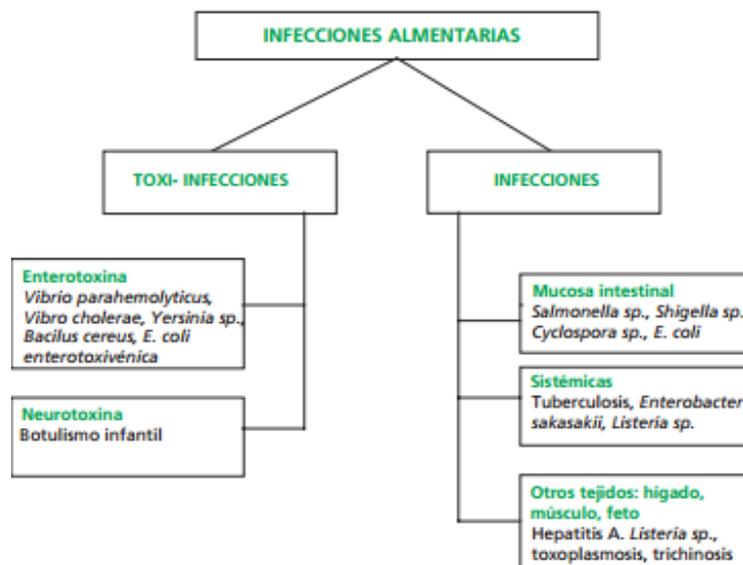


Figura 8-1: Esquema general de las infecciones alimentarias más frecuentes
Fuente: FAO

1.4.3. Sintomatología de las ETAS

Los síntomas varían de acuerdo al tipo de contaminación, así como también según la cantidad del alimento contaminado consumido. Los síntomas más comunes son vómitos y diarreas,

también pueden presentarse dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, síntomas neurológicos, visión doble, ojos hinchados, dificultades renales, etc.

Según la Food and Drug Administration (FDA) del Gobierno de EE. UU. El 2% o 3% de ETA pueden llevar a una enfermedad de largo plazo. Por ejemplo, *Escherichia coli* O157: H7 puede provocar fallas en el riñón en niños e infantes, las Salmonelas pueden provocar artritis reactiva y serias infecciones y *Listeria monocytogenes* puede generar meningitis o aborto. Sin embargo, existen malestares provocados por los alimentos que no se consideran ETA, como las alergias, las que no se pueden asociar con los alimentos que la provocan y que son los que han sufrido un proceso de fermentación (vinos, cerveza, quesos, yogur).

Para las personas sanas, la mayoría de las ETA son enfermedades pasajeras, que sólo duran un par de días y sin ningún tipo de complicación. Pero algunas ETA más graves pueden llegar - 36 - a ser muy severas, dejar secuelas o incluso hasta provocar la muerte en personas susceptibles como son los niños, los ancianos, mujeres embarazadas y las personas enfermas. (CASTILLO Glenda.Espoch.2013.pp 36)

1.4.4. Causas de las ETAS

- Sustancias químicas (pesticidas, etc.)
- Producción de toxinas (*Clostridium botulinum*)
- Agentes biológicos(bacterias, etc)
- Metales tóxicos (plomo)
- Adición de aditivos(nitritos)

Origen biológico: las enfermedades transmitidas por alimentos menos conocidas son causadas por virus a diferencia de las bacterias que tienen mayor prevalencia y como agentes causales tenemos *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* y *Clostridium*.

Según la OPS las ETAS se encuentran entre las cinco primeras causas de muerte en niños menores de cinco años de edad, se muestra un aumento en la morbimortalidad en nuestra región lo que implica un gasto económico para el país.

Grupo I	Grupo II	Grupo III
(Riesgo severo)	(Riesgo moderado y difusión importante)	(Riesgo moderado y difusión limitada)
<i>C. botulinum</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Bacilo cereus</i>
<i>S. dysenteriae</i>	<i>Salmonella ssp</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>S. typhi</i>	<i>Shigella ssp</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>S. paratyphi</i>	<i>E. coli enteropatógena</i>	<i>Stafilococcus aureus</i>
<i>Virus hepatitis A y E</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Vibrio cholerae no 01</i>
<i>Brucela spp</i>	Rotavirus	<i>Vibrio parahemolyticus</i>
<i>Vibrio cholerae 01</i>	Virus Norwalk	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>Giardia lamblia</i>
<i>Taenia solium</i>	<i>D. latum</i>	<i>Taenia saginata</i>
<i>Trichinella spirales</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	
	<i>C. parvum</i>	

Figura 9-1: Agentes biológicos que constituyen riesgo alimentario
Fuente: Ángel Caballero Torres

La contaminación de los alimentos es uno de los problemas más extendidos en el mundo. El centro para el control y prevención de las enfermedades (CDC) da una estimación de que cada año 76 millones de personas se enferman, más de 300000 son hospitalizados y 5000 mueren como resultado de enfermedades alimentarias.

Principales factores que intervienen en la aparición de ETAS:

- ✓ Temperatura inferior a la necesaria en la cocción el 56%
- ✓ Ingerir alimentos sin refrigerar después de varias horas el 31%
- ✓ Mala manipulación el 25%
- ✓ Mal recalentamiento el 20%
- ✓ Mala preparación el 16%
- ✓ Contaminación cruzada el 9%

Frente a la prevalencia de enfermedades diarreicas agudas que constituye en 70% de la población la OMS Y FAO han destinado un plan de acción para control de estas enfermedades llamado Sistema de vigilancia de enfermedades transmitidas por los alimentos(VETA), cuyo propósito es garantizar la inocuidad de los alimentos y evitando daños a la salud de la comunidad. La prevención de la contaminación, multiplicación o supervivencia de los contaminantes es posible con el cumplimiento de las medidas básicas de saneamiento en el hogar y en la población. Internacionalmente se las conoce como BPM a estas medidas que ayudaran a prevenir estos graves problema epidemiológicos de salud.

1.4.5. Principales enfermedades transmitidas por los alimentos

- Salmonelosis: enfermedad caracterizada por dolor abdominal, diarreas, dolor de cabeza, vómitos y en caso extremo como complicaciones puede afectar articulaciones, corazón, etc. La Salmonella enteritis es la que se ha reportado con mayor frecuencia en estos últimos años. La transmisión se da a través de alimentos contaminados con *Salmonella* cuyos reservorios son animales domésticos, cerdos, pollos y gatos. Este agente biológico se multiplica a cantidades millonarias cuando los productos alimenticios son expuestos a malas condiciones de conservación a temperatura ambiente y por tiempo prolongado entre la elaboración y consumo.
- Fiebre tifoidea: enfermedad caracterizada por aumento de tamaño de hígado y bazo, cefalea, malestar en general, suele presentar complicaciones como perforaciones intestinales con sangramientos lo que puede ocasionar el 10% de muertes en pacientes. Se transmite a través de alimentos y agua contaminados con heces u orina de un paciente o portador generalmente en la leche y productos lácteos, frutas y mariscos.
- Intoxicación estafilocócica: es una enfermedad caracterizada por vómitos, cólicos y cefaleas. Intoxicación producida por enterotoxinas que se forman en los alimentos por la proliferación de microorganismos denominados *Staphylococcus aureus* en cantidades de 10^6 UFC/g en los alimentos que se mantienen a temperatura ambiente y con resistencia a temperaturas elevadas de cocción. El principal reservorio es el hombre localizándose en la cavidad oro faríngeo, manos, brazos y cara y en los animales como la leche y productos lácteos. Los *Staphylococcus* en los alimentos se multiplican y forman enterotoxinas cuya causa principal de los brotes de estas enfermedades alimentarias son por la manipulación de alimentos con deficientes prácticas higiénicas y temperatura ambiente para su multiplicación.
- Campilobacteriosis: enfermedad caracterizada por malestar general, dolor abdominal, diarreas y vómitos cuyas complicaciones son artritis y miocarditis. El reservorio son animales domésticos y se da la transmisión por la ingestión de alimentos contaminados. Existen informaciones epidemiológicas acerca de la participación de la leche como vehículo de esta infección.
- Shigelosis: enfermedad caracterizada por heces frecuentes que contienen sangre, moco y pus causada por el microorganismo denominado *Shigella dysenteriae* y es transmitido por

vía fecal - oral a través de las manos o mediante alimentos o agua contaminada; las moscas también pueden contaminar alimentos que se encuentren al ambiente descubiertos.

- Intoxicación alimentaria por *Clostridium perfringens*: es una enfermedad caracterizada por la aparición repentina de cólicos, seguidos por diarreas, náuseas, vómitos y fiebre cuyas esporas de este microorganismo resisten a altas temperaturas de cocción, germinan y se desarrollan en los alimentos durante el enfriamiento lento, almacenamiento a temperatura ambiente, recalentamiento inadecuado. El reservorio son las vías gastrointestinales del hombre, los animales y el suelo.
- Diarreas causadas por *Escherichia coli*: existen diversas cepas como son *E.coli* entero toxigénica, entero invasiva, entero hemorrágico, entero patógeno, entero adherente y entero agregativo. La más común es causada por ECET con frecuencia produce diarrea en los niños de los países en desarrollo, están presentes en suministros de agua sin purificación. La contaminación se da por la deficiente conservación de productos elaborados.
- Colitis hemorrágica: enfermedad caracterizada por diarreas sanguinolentas cuyas complicaciones son renales hasta manifestaciones de mayor gravedad, siendo su agente causal la *E.coli* entero hemorrágica por ser una bacteria resistente a temperaturas elevadas de cocción. La transmisión se da por carnes mal cocidas, leche como producto de malos hábitos de manipulación de alimentos.
- Cólera: es una de las enfermedades más nombradas y temibles por los humanos transmitidas por los alimentos y el agua que se caracteriza por presentar diarreas acuosas o en algunos de los casos vómitos. Estadísticas muestran que las 7 pandemias de cólera se produjeron por el *Vibrio cholerae* O1 y que en la actualidad ya se conoce otro subtipo llamado Tor. La transmisión se da por alimentos y agua contaminados con heces fecales, a través de las aguas servidas, moscas y otros vectores recordando que este agente puede vivir en el agua durante largo tiempo. La mayor parte se da por el uso de las aguas servidas en los cultivos donde es restringido el agua para los cultivos, zonas rurales insalubres y ciertos lugares en los que no hay agua y no les queda de otra que utilizar aguas residuales para sobrevivir.
- Listeriosis: causada por *Listeria monocitogenes* cuyo reservorio es los animales, sus alimentos y el agua siendo el portador asintomático el hombre. Los brotes de transmisión que se han dado ha sido por la ingestión de leche y quesos no pasteurizados, también por vegetales contaminados por las coles afectadas por los residuales de una explotación ganadera.

- Botulismo: enfermedad caracterizada por presentar visión borrosa, midriasis, parálisis respiratoria, vómitos y diarreas producida por el consumo de la toxina que se produce en el alimento en medios de Ph superiores a 4.5 en anaerobiosis y siendo termolábil perteneciente al *Clostridium botulinum* a diferencia de las esporas que son termo resistentes.
- Giardiasis: es una enfermedad parasitaria causado por *Giardia lamblia* que presenta un cuadro clínico de diarreas crónicas, cólicos abdominales, fatiga y pérdida de peso. La transferencia se da por los quistes de un apersona a otra a través de vía ano-mano-boca.
- Amebiasis: es una enfermedad cuya sintomatología es escalofríos, diarreas sanguinolentas con moco. Se transmite por alimentos contaminados principalmente hortalizas rastreras, falta de lavado de manos además de un proceso de contaminación ano-mano-boca. (CABALLERO Angel y CARDONA Marta.pp 245-258)

1.4.6. Contaminación de los alimentos

Se puede mencionar cuatro tipos de contaminación que pueden sufrir los alimentos entre las cuales están:

Contaminación física

Se refiere a la presencia de materias o cuerpos extraños, a continuación se muestran unos ejemplos:

Tabla 5-1: Agentes de contaminación física

Fuente	Agentes típicos
Maquinaria-Ambiente	Pernos, tuercas, tornillos, trozos de vidrio, virutas de madera y papel
Personal	Joyas, botones, uñas, pelos, etc.
Envases	Grampas, cartón, etc.
Infestaciones	Insectos, gusanos, cucarachas, etc.

Fuente: Tucumán 2010. Guía de elaboración de quesos artesanales

Contaminación química

Se refiere a la presencia de sustancias que pueden provocar la muerte o algún tipo de alteración en el organismo al ser ingeridas a través de los alimentos. Cabe recalcar que estas sustancias nocivas llegan al alimento a través de dos formas:

Natural: toxinas que son secretadas por diferentes tipos de animales y vegetales.

No natural: sustancias tóxicas que se incorporan a los alimentos en la producción, transporte y comercialización de los productos.

A continuación tenemos algunos ejemplos:

Tabla 6-1: Agentes de contaminación química

Fuente	Agentes típicos
Alimentos alterados por bacterias y hongos	Toxinas
Determinadas plantas, hongos, peces y mariscos	Toxinas
Operaciones de cocción	Nitratos, nitritos, etc.
Operación de limpieza	Detergentes, desinfectantes
Control de plagas	Venenos para ratas, cucarachas, insecticidas
Cacerolas, tuberías	Plomo, cobre, aluminio

Fuente: Tucumán 2010. Guía de elaboración de quesos artesanales

Contaminación microbiológica

Es producida por agentes biológicos o seres vivos que se encuentran en los alimentos dentro de los cuales tenemos bacterias, virus, hongos y parásitos que provocan cambios en el producto y alteraciones de salud en el ser humano.

Contaminación cruzada

Esta contaminación es provocada por la migración de cualquier tipo de agente biológico de una determinada zona que esté contaminada o sucia a una zona limpia ya sea a través de la mano del hombre o con ayuda de utensilios como tablas de picar los alimentos, toallas de cocina, cuchillos, etc.

Prevención de la contaminación

Existen técnicas básicas y que no está por demás el conocimiento de aspectos generales que se debe tomar en cuenta para evitar la introducción de cualquier tipo de contaminantes al interior de los alimentos ocasionando cambios físicos y químicos en su naturaleza y afectando la salud del ser humano. La falta de cuidado por parte de los involucrados en la comercialización específicamente de queso fresco puede ocasionar una contaminación alimentaria cuya solución estaría en una práctica y sencilla capacitación al personal que labora, el cumplimiento de normas y parámetros establecidos como son normas internacionales de prohibición de utilización de joyas y materiales que pudieran ocasionar contaminación, uso de vestimenta idónea para las diferentes áreas de trabajo.

Los contaminantes químicos se pueden evitar a través de una correcta y adecuada nominación y uso de sustancias químicas que se encuentren dentro del proceso de elaboración de los alimentos

para evitar equivocaciones al momento de requerir cualquiera de ellas, los manuales de instrucciones y procedimientos en los diferentes procesos debe ser esencial la existencia ya que en ellos tendrán el apoyo para la correcta utilización de sustancias químicas de uso delicado y así se podrá evitar daños irremediables. Existen materiales de cobre, aluminio que al momento de ser utilizados en condiciones desfavorables pueden eliminar sustancias tóxicas, las mismas que se adhieren a los alimentos y provocan una inestabilidad de los productos de consumo humano. Cuya solución para este problema es el uso de material de acero inoxidable muy conocido en la actualidad.

Los contaminantes biológicos requieren de condiciones óptimas de crecimiento para su proliferación caso contrario su crecimiento nulo u muy lento. La prevención de las bacterias supone controlar las siguientes condiciones:

- Tiempo necesario para crecer
- Temperatura a que se le almacena o mantiene el alimento
- Acidez o Ph del alimento
- Actividad de agua
- Oxígeno en la atmosfera que rodea al alimento
- Compuestos químicos: conservantes
- Destrucción (TUCUMAN 2010.)

Prevención de contaminación alimentaria

Se puede realizar métodos de trabajo para la prevención de la contaminación alimentaria como son:

- Inspecciones sanitarias y re inspecciones: es decir realizar un control y dar seguimiento continuo para comprobar el cumplimiento de parámetros de calidad sanitaria que el MSP establezca.
- Muestreo: es para controlar la higiene de los alimentos que se realiza en los laboratorios de análisis de los alimentos y de mucha importancia para los estudios de brotes de ETAS.
- Decomisos: es la acción de aislar o retirar la totalidad o una parte del producto alimenticio que por su mala calidad sanitaria debido a contaminaciones o alteraciones que tengan los mismos pueden ocasionar daño a la salud del hombre.
- Educación sanitaria: una de las actividades que no trae consecuencias, se lo puede realizar de manera individual o mejor colectiva ya que se pueden intercambiar diferentes puntos de vista y evidenciar de mejor manera la protección sanitaria de los productos brindando una educación de calidad a todos los miembros involucrados. Evitando tener conflictos con las

otras actividades de control que realizan las autoridades pertinentes. (CABALLERO Angel y CARDONA Marta, pp 265)

1.5. Métodos de identificación de carga microbiana en quesos frescos

1.5.1. Placas Petrifilm

Las placas Petrifilm son medios de cultivo deshidratados sobre películas plásticas que contiene compuestos selectivos, compuestos que gelifican en frío y colorantes para teñir las colonias facilitando su recuento e identificación., usadas en laboratorios microbiológicos e industrias alimenticias, las mismas que están compuestas por adhesivos, películas y nutrientes, para llevar a cabo pruebas microbiológicas rápidas, reproducibles, de alta eficiencia y facilidad para leer, reduciendo errores como en los métodos tradicionales de agar. Las placas Petrifilm estandarizan y facilitan procesos de ensayos al minimizar las horas en las pruebas microbiológicas. (3M, 2016)

Existe una placa para cualquier prueba microbiológica:

- Recuento de Aeròbios
- Recuento de *E.coli*/Coliformes totales

Las Placas Petrifilm para el Recuento de *E. coli* y Coliformes Totales contienen nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad Glucoronidasa y un tinte indicador que facilita la enumeración de las colonias. Aproximadamente el 97% de las colonias de *E. coli* producen beta glucoronidasa la que a su vez forma un precipitado azul asociado a la colonia. La película superior atrapa el gas producido por la fermentación de la lactosa por parte de los Coliformes y *E. coli*. Cerca del 95% de las *E. coli* producen gas, representado por colonias entre azules y rojo azuladas asociadas con el gas atrapado en la Placa Petrifilm EC (dentro del diámetro aproximado de una colonia).

La AOAC internacional y el Manual de Bacteriología Analítica (BAM) de la US FDA definen Coliformes como bacilos Gram negativos que producen ácido y gas de la fermentación metabólica de la lactosa. Las colonias de Coliformes en las Placas Petrifilm EC durante su crecimiento van generando ácido, por lo que el indicador de pH va oscureciendo o profundizando el color del gel. El gas queda atrapado alrededor de la colonia confirmando la presencia de un coliforme.

El tiempo de incubación y la temperatura varían según el método. Los métodos comúnmente aprobados son:

- **AOAC método oficial 991.14**
Para Coliformes:
Incubar 24 hrs. (+/- 2 hrs) a 35°C (+/- 1°C)
Para *E. coli*:
Incubar 48 hrs. (+/- 2 hrs) a 35°C (+/- 1°C)
- **AOAC método oficial 998.08**
Para *E. coli* (carnes aves y mariscos)
Incubar 24 hrs. (+/- 2 hrs) a 35°C (+/- 1°C)
- **NMK método 147.1993**
Para Coliformes:
Incubar 24 hrs. (+/- 2 hrs) a 37°C (+/- 1°C)
Para *E. coli*:
Incubar 48 hrs. (+/- 2 hrs) a 35°C (+/- 1°C)

Figura 10-1: Temperaturas de incubación para *Escherichia coli* y coliformes totales.

Fuente: 3M 2016

- Staph Express (para recuento de *Staphylococcus aureus*)

El sistema de recuento 3M™ Petrifilm Staph Express consiste en una placa de recuento Petrifilm Staph Express y un disco Petrifilm Staph Express. La placa de recuento Petrifilm Staph Express contiene un sistema de medio de cultivo preparado. El medio cromogénico de Baird-Parker modificado de la placa es selectivo y diferencial para *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* aparece como colonias rojo-violeta en la placa. Otras colonias que no sean de color rojo-violeta también pueden aparecer en la placa (figura 5).

El disco Petrifilm Staph Express ha sido diseñado para la detección de las reacciones de desoxirribonucleasa (DNasa) específicas de *Staphylococcus aureus* aislado en la placa de recuento Petrifilm Staph Express; contiene azul-O toluidina que facilita la visualización de las reacciones de DNasa. El disco Petrifilm Staph Express debe de usarse siempre que aparezcan en la placa otras colonias que no sean de color rojo-violeta.

- Recuento de Mohos y Levaduras

Las Placas Petrifilm son aprobadas por organismos internacionales, tales como:

- **AOAC** (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS)
- **AFNOR** (ASOCIACIÓN FRANCESA DE NORMALIZACIÓN)
- **NCIMS** (U.S. GRADE A PASTEURIZED MILK ORDINANCE)
- **CANADA-HEALTH PROTECTION BRANCH HPB** (COMPENDIUM OF ANALYTICAL METHODS)
- **AUSTRALIA, NEW SOUTH WALES DAIRY TEST MANUAL.** (3M, 2016)

1.5.2. Medios de cultivo convencionales

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. La diversidad metabólica de estos es tan grande que la variedad de medios de cultivo es enorme, no existiendo un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos, ni siquiera refiriéndonos a las bacterias con exclusividad.

- Tipos de medios de cultivos

MEDIOS GENERALES. Son aquellos que permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos.

MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO. Son aquellos que favorecen el crecimiento de un determinado tipo de microorganismo sin llegar a inhibir totalmente el crecimiento de los demás.

MEDIOS SELECTIVOS. Son aquellos que permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos determinado, inhibiendo el desarrollo de los demás.

MEDIOS DIFERENCIALES. Son aquellos en los que se pone de manifiesto propiedades que un determinado tipo de microorganismos posee. (UNIVERSIDAD DE GRANADA.2016.pp 4).

Agar Manitol Salado

Es un medio selectivo utilizado para aislar *Staphylococcus*, fundamentado en la tolerancia que presentan a una concentración elevada de cloruro de sodio. Además sirve como medio diferencial de cepas fermentadoras de manitol como lo es *Staphylococcus aureus*. (ALVAREZ, Victoria, BOQUET, Ernesto, FEZ, Isabel. 1995, p.32)

Agar eosina - azul de metileno

Es un medio diferencial que se utiliza para las *Enterobacteriaceae*. La incorporación de lactosa en el medio permite diferenciar a los microorganismos que fermentan el azúcar de los que no fermentan. La flora Gram positiva (excepto *Streptococcus fecalis*) es inhibida por los colorantes. (ALVAREZ, Victoria, BOQUET, Ernesto, FEZ, Isabel. 1995, p.32)

Agar verde bilis brillante (NMP)

La determinación de microorganismos coliformes totales por el método del Número más Probable (NMP), se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas al incubarlos a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 h., utilizando un medio de cultivo que contenga sales biliares. Esta determinación consta de dos fases, la fase presuntiva y la fase confirmativa. En la fase presuntiva el medio de cultivo que se utiliza es el caldo lauril sulfato de sodio el cual permite la recuperación de los microorganismos dañados que se encuentren presentes en la muestra y que sean capaces de utilizar a la lactosa como

fuentes de carbono. Durante la fase confirmativa se emplea como medio de cultivo caldo lactosado bilis verde brillante el cual es selectivo y solo permite el desarrollo de aquellos microorganismos capaces de tolerar tanto las sales biliares como el verde brillante.

La determinación del número más probable de microorganismos coliformes fecales se realiza a partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva y se fundamenta en la capacidad de las bacterias para fermentar la lactosa y producir gas cuando son incubados a una temperatura de $44.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ por un periodo de 24 a 48 h. Finalmente, la búsqueda de *Escherichia coli* se realiza a partir de los tubos positivos de caldo EC, los cuales se siembran por agotamiento en medios selectivos y diferenciales (Agar Mac Conkey, Agar eosina azul de metileno) y posteriormente realizando las pruebas bioquímicas básicas (IMViC) a las colonias típicas.(pp 4-9).

➤ Preparación de medios de cultivo

En la actualidad, la mayoría de los medios de cultivo se encuentran comercializados; normalmente bajo la forma de liofilizados a los que es preciso rehidratar. En estos casos la preparación del medio de cultivo se reduce sencillamente a pesar la cantidad deseada del mismo y disolverla en agua destilada siguiendo las instrucciones del fabricante. Las sustancias termolábiles, se esterilizan por filtración y se añaden al resto de los componentes después de que estos hayan sido previamente esterilizados en el autoclave y enfriados a temperatura ambiente ó a $40\text{-}50^\circ\text{C}$ si se trata de medios con agar. Antes de su esterilización los medios líquidos se reparten en los recipientes adecuados (tubos, matraces, etc.).

Si es un medio sólido y se ha de distribuir en tubos o en matraces será necesario fundir el agar en baño María u horno microondas, una vez fundido y homogenizado, se distribuye en caliente a los tubos ó matraces (no en placas Petri) se tapa y se esteriliza en la autoclave. Una vez finalizada la esterilización los medios se dejaran enfriar a temperatura ambiente y en el caso de medios sólidos contenidos en tubos deberán, en su caso, inclinarse para que al solidificarse adopten la forma de agar inclinado o pico de flauta(slant) si tal es su finalidad.

Las placas de Petri se preparan vertiendo el medio fundido y estéril dentro de ellas y en un ambiente aséptico (por ejemplo en la proximidad de la llama de un mechero Bunsen) es conveniente homogenizar el medio en el transcurso de la operación para evitar que el agar sedimente en el fondo del recipiente y no se distribuya por igual en todas las placas. También es posible conservar el medio destinado a preparar placas Petri solidificado y estéril en tubos que se fundirán al baño María en el momento de la preparación de las mismas. Los caldos y medios sólidos pueden conservarse, una vez esterilizados, a temperatura ambiente pero para reducir su

deshidratación y el consiguiente cambio en las concentraciones de sus componentes es preferible conservarlos a 4°C. (UNIVERSIDAD DE GRANADA.2016.pp 5).

1.5.3. Tinción Diferencial de Gram

Esta tinción diferencial utiliza de inicio un colorante primario (Cristal Violeta), el que va a teñir a todas las células, se realiza un lavado y se coloca en el segundo reactivo que es una solución de lugol, se lava nuevamente con agua, se decolora con alcohol etílico/acetona algunas células, se escurre y se lava con agua y finalmente se coloca el cuarto y último colorante, la safranina que es el colorante de contraste que teñirá las células recién decoloradas. Las bacterias Gram positivas y Gram negativas se teñirán según la constitución de la estructura de las paredes celulares. (NUÑEZ Vanes. 2015, pp. 20-25).

La tinción propuesta por el médico danés Christian Gram en 1884, es una de las tinciones diferenciales más utilizadas en bacteriología, que clasifica los cultivos bacterianos de menos de 24 horas en Gram positivas y Gram negativas. La reacción de la tinción de Gram se basa en la cantidad de peptidoglucano que se encuentra en las paredes celulares de estas bacterias. Las bacterias Gram positivas tienen muchas capas de peptidoglucano, las cuales a su vez, sostienen moléculas de ácido teicoico. El ácido teicoico reacciona con el cristal violeta y el yodo utilizado en este proceso de tinción. Un complejo de las moléculas cristal violeta-yodo-ácido teicoico es muy difícil de remover.

Como la pared celular de las células Gram positivas retiene estos compuestos, es más difícil decolorar una célula Gram positiva que una Gram negativa. Una mezcla de alcohol remueve el cristal violeta de la célula Gram negativa, pero no de la Gram positiva. Esta mezcla de alcohol también disuelve mucho de la capa exterior de lipopolosacárido de la pared celular de la pared Gram negativa, lo cual acelera la remoción del colorante primario cristal violeta de estas células. Cuando otro colorante, usualmente safranina, se añade, las células Gram positivas siguen de color azul-violeta mientras que las Gram negativas absorben el color rojizo de la safranina. Al final del procedimiento de tinción, las células Gram positivas serán del color del cristal violeta, o colorante primario, y las células Gram negativas serán del color de la safranina que es el colorante de contraste. (Disponible en: <http://biologiadelarmvz.wikispaces.com/file/view/Pr%C3%A1ctica+3+Tinci%C3%B3n+de+Gram.pdf>)

1.6. Mercado “SAN ALFONSO “

1.6.1. Ubicación

Mercado San Alfonso, RIOBAMBA, CHIMBORAZO se encuentra ubicado en la parroquia RIOBAMBA del cantón RIOBAMBA perteneciente a la provincia CHIMBORAZO, Ecuador.

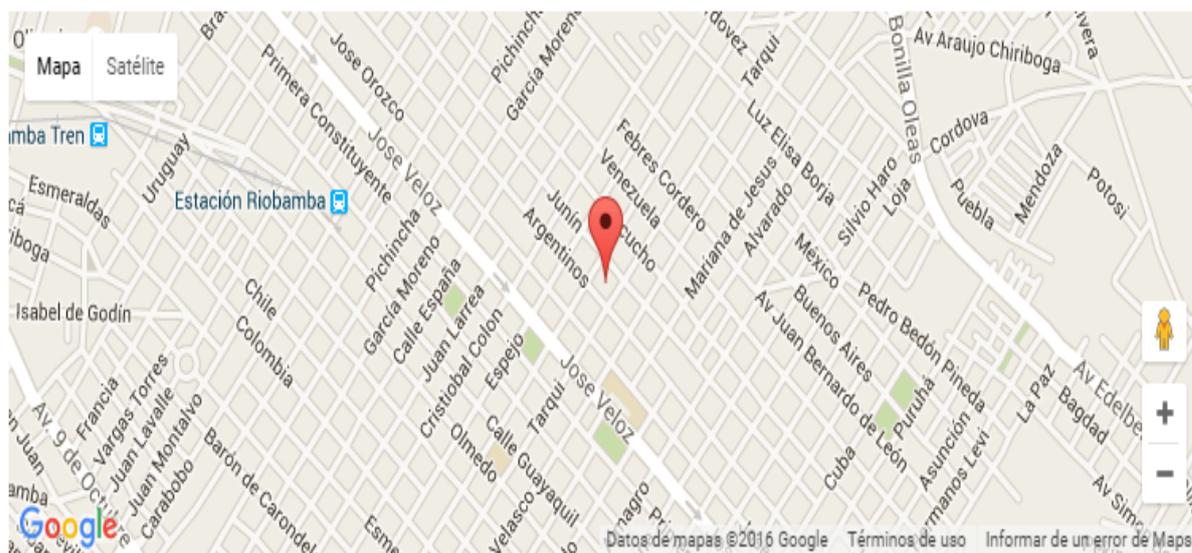


Figura 11-1: Mapa de ubicación del mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba

Fuente: Disponible en: <http://www.ecuador-local.com/riobamba/mercado/mercado-san-alfonso>

Con una atención de domingo a domingo desde las 7:00 hasta las 18:00, los comerciantes que laboran dan lo mejor de sí para sus clientes ofreciendo productos frescos.

1.6.2. Descripción

El mercado de San Alfonso, donde los sábados acuden los habitantes de la región a intercambiar sus productos, en un trasiego de gentes y mercancías, lleno de colores, olores, ruidos de comerciantes en el Mercado.



Figura 12-1: Mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba

Fuente: MENDOZA Cesar .UFAP Comunicación Social

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Población de Estudio y Localización del Muestreo

La zona de estudio está ubicada en el mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo, es aquí donde se efectuó los muestreos.

En la sección de productos lácteos del mercado se recolectó siete muestras, considerando cada uno de los puestos de comercialización aproximadamente a las nueve de la mañana.

Para la ejecución del análisis microbiológico se realizó en:

- **LUGAR:** Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológico - Facultad de Ciencias - Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- **CANTÓN:** Riobamba
- **PROVINCIA:** Chimborazo.

2.2. Materiales, Equipos y Reactivos

Tabla 1-2: Materiales, Equipos y Reactivos de laboratorio

Materiales	Mandil
	Cofia
	Guantes desechables
	Mascarilla
	Celular con cámara
	Marcador
	Algodón
	Toallas adsorbentes
	Alcohol industrial
	Envases de vidrio estériles de 100ML
	Cooler con bloques de hielo
	Baja lenguas
	Pipetas fijas de 1000µL
	Cinta testigo
	Puntas azules
	Placas 3M ^M Petrifilm Aerobios mesofilos
	Placas 3M TM Petrifilm <i>E. Coli</i> -Coliformes totales
	Hisopos de algodón
	Placas 3M TM Petrifilm <i>Staph Express</i>
	Discos STX
	Asa de platino
	Papel aluminio
	Matraces de 100,500 mL
	Maski
	Hojas de papel bond

	Lámpara de alcohol
	Reverbero
	Agar Eosina Azul de Metileno
	Agar PCA
	Agar Manitol Salado
	Erlenmeyer de 500 mL
	Filtros
	Probeta de 50, 100 ,500 mL
	Cajas Petri
	Placas portaobjetos
	Parafilm
Equipos	Cámara de flujo laminar
	Estufa bacteriológica
	Microscopio
	Autoclave
Reactivos	Agua destilada
	Kit de Tinción Gram:
	- cristal violeta
	- lugol
	- alcohol-acetona
	- safranina

Elaborado por: Jessica Haro

2.3. Métodos y Técnicas

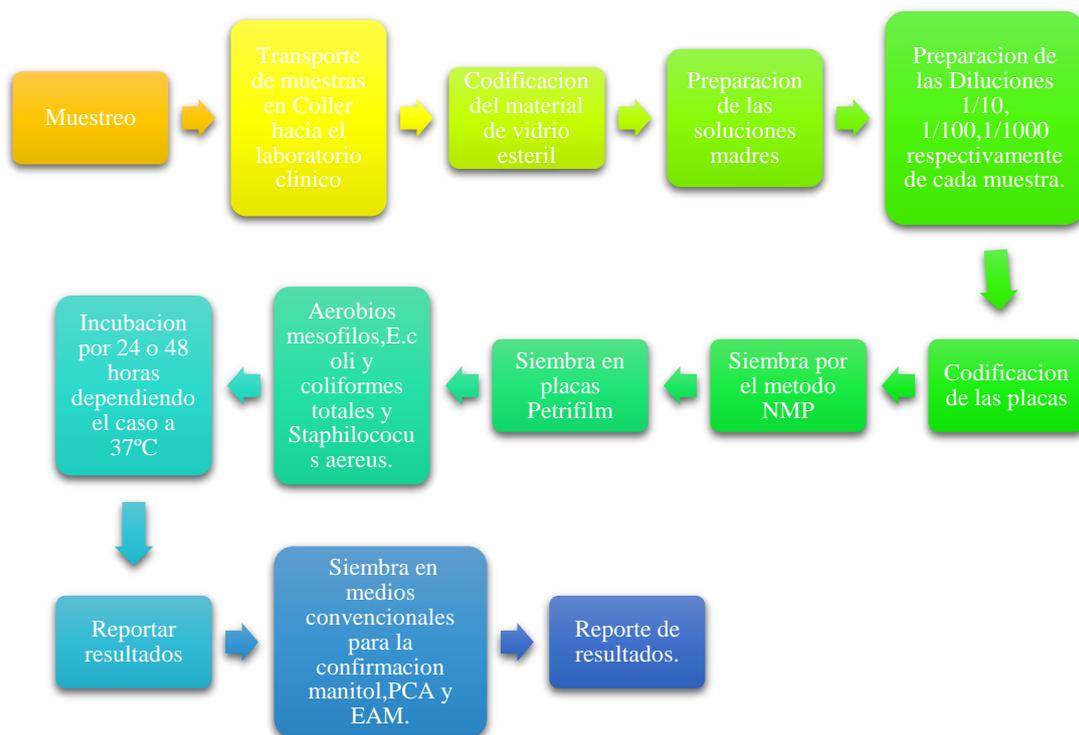


Grafico 1-2: Esquema del proceso de análisis microbiológico

Elaborado por: Jessica Haro

El método utilizado para el conteo de microorganismos es en Placas Petrifilm por siembra directa.

2.3.1. Muestreo

Para el plan de muestreo se tomó referencia la norma técnica Ecuatoriana de Leche y productos lácteos, muestreo NTE INEN 0004:1984; y realizando en condiciones asépticas la toma de muestras en los puestos de comercialización de quesos. Recoger las muestras de quesos frescos en fundas Ziploc y codificar.



Figura 1-2: Etapas del muestreo
Fuente: ECOTECH

Para productos envasados o empacados en recipientes o unidades pequeñas, cada muestra deberá formarse extrayendo al azar el número de unidades o recipientes indicados en la Tabla 2-2; cada unidad o envase constituirá una unidad de muestreo.

Tabla 2-2: Muestreo para unidades pequeñas

Tamaño del lote	Unidades para muestreo
menos de 100	1
101 - 1 000	2
1 001 - 10 000	3
más de 10 000	*
* 4, más 1 por cada 2 500 unidades adicionales o fracción de tal cantidad	

Fuente: NTE INEN 0004(1984)

Condiciones pequeñas al muestreo:

- Deberá fijarse a cada muestra una tarjeta que incluya un número de identificación y la fecha de muestreo.
- Los envases o empaques que contengan las unidades de muestreo deberán sellarse y marcarse con las rúbricas de las partes interesadas, y deberá suscribirse una acta de muestreo que incluya la siguiente información:
 - a) número de la norma INEN de referencia: INEN 4.
 - b) número de identificación de la muestra,
 - c) fecha de muestreo,
 - d) nombre del producto y marca comercial,
 - e) identificación del lote o de partida;
 - f) masa o volumen total del lote o de la partida;
 - g) número de unidades de muestreo obtenidas;
 - h) lugar de procedencia del producto,
 - i) lugar de toma de las muestras,
 - j) observaciones que se consideren necesarias, y
 - k) nombres, firmas y direcciones de las partes interesadas.
- Las tres muestras deberán destinarse, respectivamente, al fabricante o distribuidor, a un laboratorio de análisis y a la entidad que deba actuar en caso de discrepancia.
- La muestra destinada al laboratorio deberá enviarse tan pronto como sea obtenida, tomando precauciones durante el transporte para que no haya exposición directa del producto a la luz y para que la temperatura no sea menor de 0°C ni mayor de 10°C. Cuando las muestras sean destinadas a examen microbiológico, deberá usarse un recipiente aislado que permita mantener una temperatura comprendida entre 0°C y 5°C, excepto en el caso de productos lácteos en conserva envasados en sus recipientes originales, o en el caso de distancias cortas de transporte. Las muestras de queso deberán mantenerse en condiciones que eviten la separación de grasa o humedad, y el queso fresco deberá mantenerse siempre a una temperatura comprendida entre 0°C y 5°C.(NTE INEN 004-1984)

2.3.2. Análisis microbiológico

2.3.2.1. Siembra en placas Petrifilm (por triplicado)

El análisis microbiológico inicia con la desinfección de la cámara de flujo, con ayuda del UV, por unos 30 minutos aproximadamente.

Preparación de la muestra

1. Desinfectar el área de trabajo con alcohol o tego.
2. Codificar los envases de vidrio en donde se colocara la muestra.
3. Retirar la muestra del queso fresco de la funda ziploc y de la funda de envase.
4. Pesar 10 g de queso fresco en el envase de vidrio de cada una de las muestras a analizar.
5. Añadir 90 mL de agua de peptona a los gramos de queso, “Solución madre”.
6. Homogenizar.
7. Esperar 15 minutos aproximadamente hasta que se sedimente.
8. Del sobrenadante tomar 1000 μ L + 9 mL de agua de peptona. (1/10)
9. Homogenizar
10. De la solución anterior tomar 1000 μ L + 9 mL de agua de peptona. (1/100)
11. Homogenizar
12. De la solución anterior tomar 1000 μ L + 9 mL de agua de peptona. (1/1000)
13. Homogenizar
14. De esta última dilución tomar 1000 μ L y sembrar en los respectivos medios para el crecimiento de unidades formadoras de colonias.

Inoculación de placas

1. Se coloca la Placa 3M Petrifilm en una superficie lisa y plana.
2. Se levanta la lámina superior y con una pipeta se agrega perpendicularmente 1 ml de la muestra en el centro de la lámina inferior.
3. Se suelta la lámina superior sobre la muestra, para evitar la formación de burbujas de aire.
4. Se coloca el 3M Petrifilm Difusor, de la parte lisa contar el centro de la Placa 3M Petrifilm. Se presiona suavemente el centro del 3M Petrifilm Difusor, para distribuir homogéneamente la muestra.
5. Se retira el 3M Petrifilm Difusor y se deja reposar la Placa 3M Petrifilm por lo menos 1 minuto para permitir que se forme el gel. (3M, 2016)

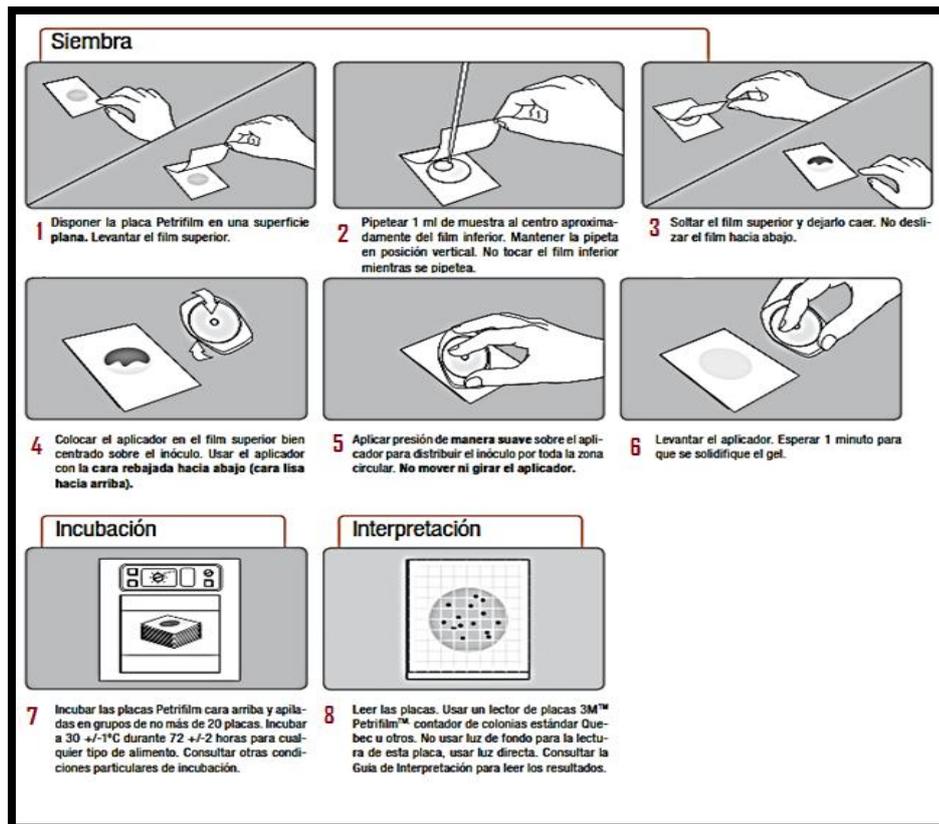


Figura 2-2:Instrucciones de uso de placas Petrifilm

Fuente:3M Petrifilm 2016

Incubación

Se Incuba las Placas 3M Petrifilm en posición horizontal con la zona transparente hacia arriba en pilas de no más de 20 placas. Se pueden utilizar varios tiempos y temperaturas de incubación según los métodos de referencia locales actuales. (3M, 2016)

Interpretación

Las Placas 3M Petrifilm se pueden contar usando una lupa. Se debe realizar el recuento de todas las colonias de color independientemente del tamaño o la intensidad. (3M, 2016)

Terminado el periodo de incubación , se cuantifica las unidades formadoras de colonias; para la detección de coliformes totales(colonias rojas y azules con gas) se incuba a 24 horas (± 2 horas) a 35° (± 1 °C); y para *Escherichia coli*(colonias azules con gas) se incuba a 48 horas (± 2 horas) a 35° (± 1 °C).

Cuantificar las colonias y calcular el recuento de UFC; mediante el cálculo del recuento de *Escherichia coli* y coliformes totales utilizando el factor de correlación que es el número de colonias por el factor de dilución.

Una vez transcurrido el período de incubación en la estufa, se cuantifica las unidades formadoras de colonias color rojo-violeta si en placa se aprecia este tipo de colonias la prueba se completa; teniendo en cuenta que para la detección de *Staphylococcus aureus* se incuba a 35 °C ± 1 °C ó 37 °C ± 1 por 24 horas (± 2 horas) a 35°. De existir la presencia de colonias diferentes de rojo-violeta como negras o azul-verdosas, se procede a utilizar el disco de confirmación Staph Express Petrifilm; se incuba la placa con el disco de confirmación de 1 a 3 horas a 35°C ± 1 °C o a 37 °C ± 1 °C.

Cuantificar las colonias y calcular el recuento de UFC; mediante el cálculo del recuento de *Staphylococcus aureus* utilizando como factor de correlación que es el número de colonias por el factor de dilución.

2.3.2.2.. Siembra en agar Manitol

Se suspende 10,8 g de medio deshidratado en 1 litro de agua destilada. Se mezcla vigorosamente. Se calienta agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente los ingredientes. Ajustar pH a $7,4 \pm 0,2$. Se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Se deja enfriar hasta una temperatura entre 40-45°C y se vierte en placas estériles y se deja solidificar a temperatura ambiente antes de su utilización.

Prueba utilizada para la confirmación de cocos Gram positivos como es *Staphylococcus aereus* observando la fermentación en el medio de cultivo.

2.3.2.3. Siembra en agar Eosina Azul de Metileno

Se suspende 37,5 g en 1 litro de agua destilada, se calienta y se agita hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. No sobrecalentar. Ajustar a pH $7,2 \pm 0,2$ y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Prueba utilizada para la confirmación de bacilos Gram negativos como es *Escherichia coli* observando la presencia de colonias de color verde metálicas características de la presencia de este microorganismo.

2.3.2.4. Siembra en agar PCA

Se mide 1 ml con pipeta estéril de la dilución a sembrar, se vierte la misma en una placa de Petri, levantando lo menos posible la tapa. Agregar 10 a 12 ml de medio APC fundido y a una temperatura no mayor de 45°. Tapar rápidamente e imprimir a la placa movimientos circulares suaves en un sentido y otro (aproximadamente 5 veces cada sentido). Dejar solidificar, invertir la placa de manera que la tapa quede en la base, y llevar a estufa de cultivo a 30°C.

El tiempo de incubación es de 72 +/- 2 hs. Transcurrido dicho periodo, efectuar la lectura. Cada una de las células aisladas dará lugar, después de la incubación correspondiente, a una colonia, de forma que el número de éstas nos permitirá estimar el número de células presentes en la muestra original sembrada. Para que el sistema de recuento en placa tenga validez estadística, es necesario contar entre 30 y 300 colonias con objeto de disminuir el error de la medida. (UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL.2009)

Prueba utilizada para la confirmación de cocos Gram positivos como es *Staphylococcus aureus* observando la fermentación en el medio de cultivo.

2.3.2.5. Siembra por el metodo NMP en agar verde bilis brillante



Grafico 2-2:Esquema del proceso de siembra
Fuente:Jessica Haro

NUMERO DE TUBOS POSITIVOS EN CADA DILUCION			NMP POR GRAMO O cm ³	LIMITES DE CONFIANZA DEL 95%		CATEGORIA
DILUCION 10 ⁻¹	DILUCION 10 ⁻²	DILUCION 10 ⁻³		INFERIOR	SUPERIOR	
0	0	0	0	-	-	-
0	0	1	3	0,5	9	3
0	1	0	3	0,5	13	2
1	0	0	4	0,5	20	1
1	0	1	7	1	21	3
1	1	0	7	1	23	2
1	1	1	11	3	36	4
1	2	0	11	3	36	3
2	0	0	9	1	36	1
2	0	1	14	3	37	3
2	1	0	15	3	44	2
2	1	1	20	7	89	4
2	2	0	21	4	47	3
2	2	1	28	10	150	4
3	0	0	23	4	120	1
3	0	1	39	7	130	2
3	0	2	64	15	380	4
3	1	0	43	7	210	1
3	1	1	75	14	230	2
3	1	2	120	30	380	3
3	2	0	93	15	380	1
3	2	1	150	30	440	2
3	2	2	210	35	470	3
3	3	0	240	36	1 300	1
3	3	1	460	71	2 400	1
3	3	2	1 100	150	4 800	1

Figura 3-2: Metodología para la determinación de coliformes(NMP)
Fuente: INEN, 1990.

2.3.3. Tinción Gram

Una vez estabilizado el aislado bacteriano, realizar la tinción Gram con cada una de las colonias:

1. Tomar una pequeña muestra de la cepa y diluirla en la solución salina colocada en el porta objetos.
2. Con ayuda del mechero fijar la muestra, sin calentar más de lo que la mano puede soportar.
3. Colocar cristal violeta esperar 1 minuto y enjuagar.
4. Colocar lugol esperar 1 minuto y enjuagar.
5. Colocar alcohol cetona esperar 50 segundos y enjuagar.
6. Colocar safranina esperar 1 minuto y enjuagar.
7. Secar la muestra y observar en el microscopio a 100X.

(OCAÑA Evelyn.2015.ESPOCH).

Si después de realizar tinción Gram las bacterias desarrolladas en la placa, resultan como cocos Gram Positivos, se confirma que las mismas corresponden a bacterias del genero Staphylococcus.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados presentados en las tablas corresponden a valores obtenidos en las determinaciones microbiológicas de cada uno de los muestreos que se realizó en los siete puestos de comercialización de quesos, se obtuvieron tres muestras tomadas tres sábados consecutivos de cada uno de los puestos de expendio del mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba perteneciente a la provincia de Chimborazo.

3.1. Analisis de Bacterias Aerobios mesófilos

Tabla 1-3: Recuento de Bacterias Aerobios Mesófilos

Fecha de muestreo	Numero de muestra	de Unidades Formadoras de Colonias(UFC/mL)	Media
05-12-2015	M1	0	6.29×10^3
	M2	0	
	M3	0	
	M4	8×10^3	
	M5	1.3×10^4	
	M6	1×10^4	
	M7	1.3×10^4	
12-12-2015	M1	5×10^6	4.96×10^6
	M2	5.4×10^6	
	M3	2.6×10^6	
	M4	6×10^6	
	M5	1.3×10^5	
	M6	7.6×10^6	
	M7	8×10^6	
19-12-2015	M1	0	1.43×10^6
	M2	1.2×10^3	
	M3	5×10^4	
	M4	7.1×10^5	
	M5	1.4×10^6	
	M6	5.7×10^5	
	M7	7.3×10^6	

Fuente: Jessica Haro

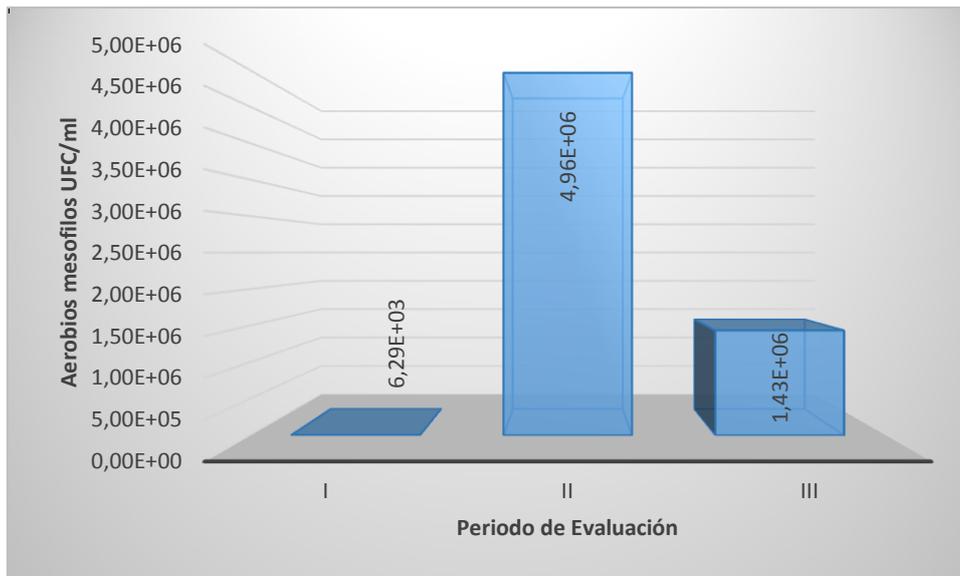


Grafico 1-3: Recuento de bacterias aerobios mesófilos en placas Petrifilm 3M
Fuente: Jessica Haro

En el grafico 1-3 se puede observar claramente la presencia de aerobios mesófilos en el queso fresco comercializado en el mercado de San Alfonso, en la primera fecha de muestreo se encontró $6,29 \times 10^3$ UFC/ml, valores que difieren significativamente de la presencia de microorganismos en el segundo y tercer muestreo puesto que en el segundo y tercer muestreo se registró $4,96 \times 10^6$ y $1,43 \times 10^6$ UFC/ml, debiéndose señalar que las dos últimas semanas de evaluación se determinó una alta carga microbiana en los quesos.

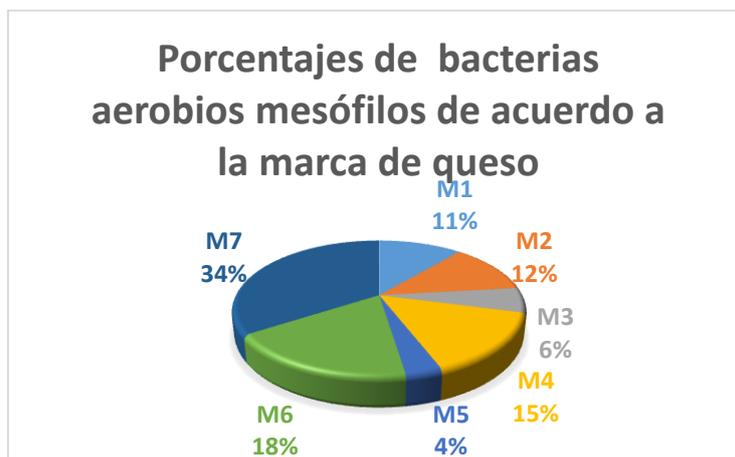


Grafico 2-3: Porcentajes de bacterias aerobios mesófilos de acuerdo a la marca de queso.
Fuente: Jessica Haro

En el grafico 2-3 se muestra la presencia de aerobios mesófilos en porcentajes en el queso fresco comercializado en el mercado de San Alfonso en función de las marcas analizadas, la muestra número siete indica un 34% siendo el valor más alto de conteo de bacterias, la muestra número seis presenta el 18%, en la muestra número cuatro se encontró un 15%, la

muestra número dos muestra el 12%, la muestra número uno indica un 11%, la muestra número tres señala un 6% y por último la muestra cinco indica un 4% de presencia de aerobios mesófilos, indicando que en este caso la muestra siete tiene un alto porcentaje de bacterias aerobios mesófilos esto quizá se deba a un proceso de mala práctica higiénica en el proceso de elaboración o de comercialización.

Nubia Vasquez, Luis Duran y colaboradores en el 2012 en Venezuela, realizó un estudio sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas del queso blanco encontrándose un valor de bacterias aerobios mesófilos de $(302 \times 10^5 - 28 \times 10^5 \text{ UFC/mL})$ valores que son superiores a los establecidos en las normas venezolanas COVENIN 938-(83), de esta manera concluyeron que los parámetros microbiológicos de los quesos expandidos en este estado son deficientes pudiendo ser un riesgo para la salud de la población. Comparando con los resultados obtenidos $(6.29 \times 10^3, 4.96 \times 10^6, 1.43 \times 10^6 \text{ UFC/mL})$ de esta investigación son similares lo que muestra que estos productos están altamente contaminados y atentan a la salud del consumidor caracterizándose por ser productos muy susceptibles de contaminación.

Ayala Luis, Ramírez Fanny, Mayo 2013 Abril 2014 Vol.1 No.1 99-102, realizó un estudio del análisis microbiológico de queso fresco tipo ranchero producido artesanalmente en el municipio de Petatlán, Guerrero encontrando como resultado de su investigación $(8.21 \times 10^8 \text{ UFC/mL})$ de bacterias aerobios mesófilos lo que se podría indicar que hubo un mal manejo en la materia prima y en el procesamiento no se observó las condiciones higiénicas aptas e indica este estudio que en la Sierra se elabora productos lácteos con leche sin pasteurizar. Una carga microbiana alta afecta a la calidad del producto por lo tanto a estabilidad y vida útil del mismo lo cual habría un deterioro rápido de queso fresco. Los resultados obtenidos en esta investigación muestran exponentes de 10^3 UFC/mL hasta 10^6 UFC/mL observando claramente que la contaminación es inferior a la presentada en el foro de alimentos de estudios realizados por Guerrero. Sin embargo estos datos muestran que hay contaminación alta y están fuera de los rangos establecidos por las normas de control.

Ronald Maldonado y Luis Llanca, realizaron un estudio de la calidad del queso de mano comercializado en el municipio Girardot, estado Aragua, Venezuela, en donde el conteo de mesófilos aerobios fue de $4,3 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$ lo que muestra que estos valores están por encima de los valores establecidos en las normas Venezolanas llamadas COVENIN, esto implica una variación significativa y acarrearía problemas de salud pública grandes. Los valores obtenidos en el presente estudio son de $(6.29 \times 10^3, 4.96 \times 10^6, 1.43 \times 10^6 \text{ UFC/mL})$ mostrándose inferiores a comparación del estudio realizado en Venezuela sin embargo son altos para los valores de referencia en las normas INEN establecidas en Ecuador esto se podría darse debido a

las malas condiciones de almacenamiento que manejan los comerciantes y a factores ambientales que afectan la naturaleza del queso fresco.

La presencia de bacterias aerobios mesófilos en quesos frescos en la investigación fueron (6.29×10^3 , 4.96×10^6 , 1.43×10^6 UFC/ mL) valores que indican la media de cada uno de los muestreos que se realizó, lo que refleja una mala higiene y manipulación del producto. Según la norma NTE INEN 1528(2012) en los requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados, índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad es 2×10^2 UFC/ mL de Entero bacteriáceas parámetro en el cual están involucradas las bacterias en análisis y el índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad es de 2×10^3 UFC/ mL lo que se demuestra claramente que los resultados están por encima de los valores de referencia establecidos lo que implica que los quesos frescos comercializados en el mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba no están aptos para el consumo humano y posiblemente se deba a una mala prácticas de condiciones asépticas en la elaboración del producto, mal almacenamiento entre otros.

3.2. Anàlisis de Bacterias Coliformes totales y *Escherichia coli*

Tabla 2-3: Recuento de Bacterias Coliformes totales y *Escherichia coli*

Fecha de muestreo	Numero de muestra	Unidades Formadoras Colonias <i>E.coli</i> (UFC/mL)	Unidades Formadoras de Colonias de Coliformes totales(UFC/mL)	Media <i>E.coli</i>	Media Coliformes totales
05-12-2015	M1	0	0	1.13×10^4	4.19×10^4
	M2	0	0		
	M3	0	0		
	M4	4.9×10^4	9×10^4		
	M5	0	3×10^3		
	M6	0	1.49×10^5		
	M7	3×10^4	5.1×10^4		
12-12-2015	M1	1.2×10^5	2.5×10^5	3×10^4	1.19×10^5
	M2	0	1×10^4		
	M3	0	1.6×10^5		
	M4	9×10^4	1.8×10^5		
	M5	0	1×10^4		
	M6	0	1.1×10^5		
	M7	0	1.1×10^5		
19-12-2015	M1	1×10^4	2×10^3	1.46×10^5	2.29×10^5
	M2	0	1.1×10^4		
	M3	5×10^4	0		
	M4	7.1×10^4	1.3×10^5		

M5	0	1.4×10^6
M6	5.7×10^5	2.2×10^4
M7	3.2×10^5	4×10^4

Fuente: Jessica Haro

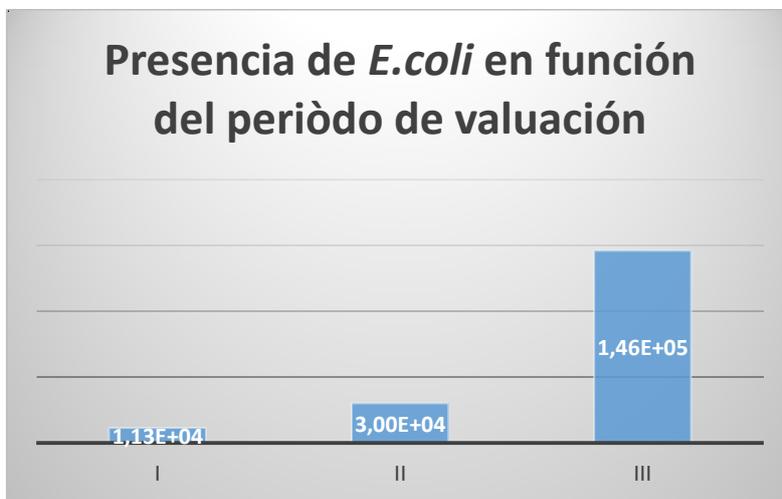


Grafico 3-3: Recuento de bacterias *Escherichia coli* en placas Petrifilm 3M

Fuente: Jessica Haro

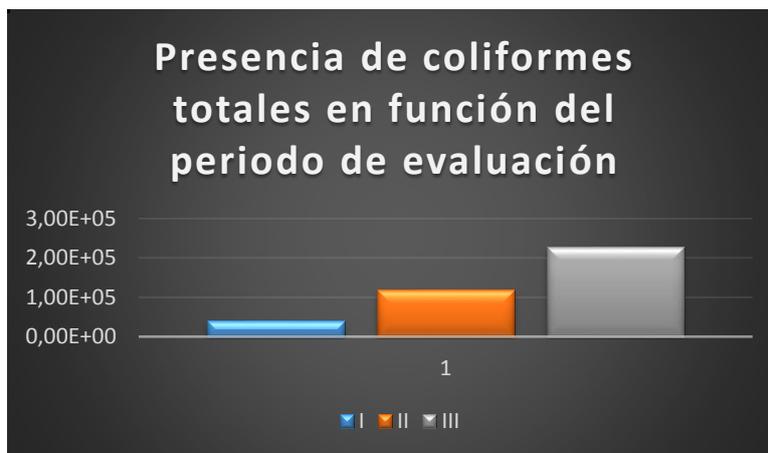


Gráfico 4-3: Recuento de bacterias coliformes totales en placas Petrifilm 3M

Fuente: Jessica Haro

En el gráfico 3-3 se puede observar claramente la presencia de *Escherichia coli* en el queso fresco comercializado en el mercado de San Alfonso, en la primera fecha de muestreo se encontró $1,13 \times 10^4$ UFC/ml, valores que no difieren significativamente de la presencia de microorganismos en el segundo y tercer muestreo puesto que se registró $3,00 \times 10^4$ y $1,46 \times 10^5$ UFC/ml. Mientras que en el gráfico 3-4 se puede observar claramente la presencia de coliformes totales en la primera fecha de muestreo se encontró $4,19 \times 10^4$ UFC/ml, valores que no difieren significativamente de la presencia de microorganismos en el segundo y tercer muestreo puesto que en el segundo y tercer muestreo se registró $1,19 \times 10^5$ UFC/ml y $2,29 \times 10^5$ UFC/ml.

Debiéndose señalar que la primera y segunda semana de evaluación se determinó una similar carga microbiana en los quesos, y la tercera semana una alta carga microbiana pero que no difiere de la primera y segunda, esto quizá se deba a que estos productos fueron procedentes de fábricas lácteas donde hubo una contaminación con materia fecal de dudosa procedencia. Por lo tanto estaría en malas condiciones para el consumidor.

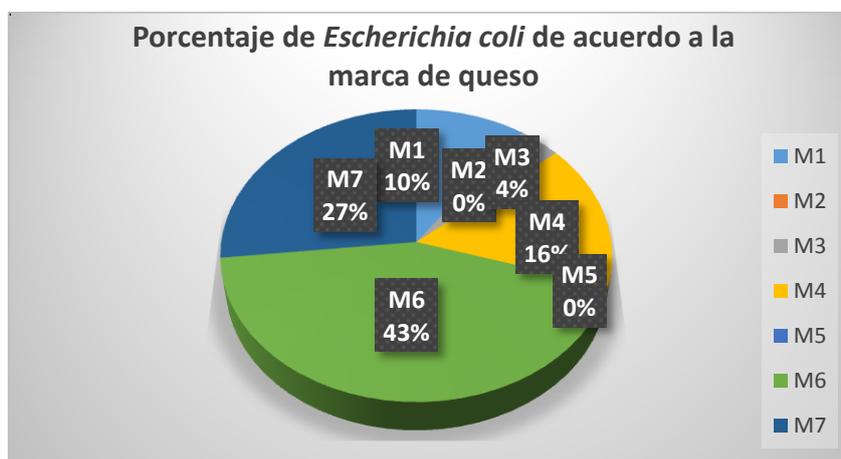


Grafico 5-3: Porcentajes de *Escherichia coli* de acuerdo a la marca de queso.
Fuente: Jessica Haro

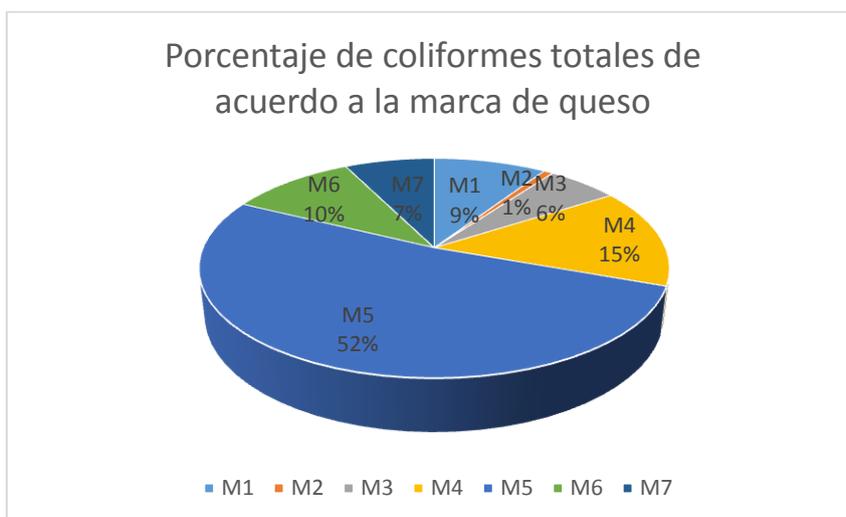


Grafico 6-3: Porcentajes de coliformes totales de acuerdo a la marca de queso.
Fuente: Jessica Haro

En el gráfico 5-3 se muestra la presencia de *Escherichia coli* en porcentajes en el queso fresco comercializado en el mercado de San Alfonso en función de las marcas analizadas, la muestra número seis indica un 43% siendo el valor más alto de contaje de bacterias, la muestra número siete presenta el 27%, en la muestra número cinco y dos no se encontró la presencia de este tipo de bacterias, indicando que en este caso la muestra seis tiene un alto porcentaje de *E.coli* esto quizá se deba a un proceso de contaminación con materia fecal ya sea de humanos o

animal que generalmente sucede al momento del ordeño y no elaboran los productos con leche pasteurizada.

En el gráfico 6-3 se muestra la presencia de coliformes totales parámetro indicador de la totalidad de bacterias coliformes es decir de la familia *Enterobacteriaceae* representado gráficamente en porcentajes en el queso fresco comercializado en el mercado de San Alfonso, en función de las marcas analizadas, la muestra número cinco indica un 52% siendo el valor más alto de conteo de bacterias, la muestra número cuatro presenta el 15%, en la muestra número seis se encontró un 10%, la muestra número uno muestra el 9%, la muestra número siete indica un 7%, la muestra número tres señala un 6% y por último la muestra dos indica un 1% de presencia de coliformes totales, indicando que la marca número cinco tiene un alto porcentaje de bacterias coliformes totales, aclarando que no siempre los coliformes totales son indicativos de contaminación fecal ya que incluye a todos los géneros inmersos en este grupo de bacterias se presume que se deba a contaminación por otro tipo de bacterias que no fueron analizados pero nos da una visión de la cantidad de microorganismos presentes y un enfoque a tomar medidas de control urgente.

Nubia Vasquez, Luis Duran y colaboradores en el 2012 en Venezuela, realizaron un estudio sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas del queso blanco encontrándose un valor de *Escherichia coli* de ($1,3 \times 10^4$ - 40 UFC/mL) valores que son superiores a los establecidos en las normas venezolanas COVENIN 938-(83), de esta manera concluyeron que los parámetros microbiológicos de los quesos expendidos en este estado son deficientes pudiendo ser un riesgo para la salud de la población. Comparando con los resultados obtenidos que son ($1,13 \times 10^4$, 3×10^4 , $1,46 \times 10^5$ UFC/mL) de esta investigación son similares lo que muestra que estos productos que están altamente contaminados y atentan a la salud del consumidor. Además se muestra un conteo de coliformes totales de (104 - 102 UFC /mL) en el estudio y comparando con los datos obtenidos de este estudio ($4,19 \times 10^4$, $1,19 \times 10^5$, $1,19 \times 10^5$ UFC /mL) son datos relativamente altos lo que muestra algún tipo de alteración en el producto.

Ayala Luis, Ramírez Fanny, Mayo 2013 Abril 2014 Vol.1 No.1 99-102, realizaron un estudio del análisis microbiológico de queso fresco tipo rancho producido artesanalmente en el municipio de Petatlán, Guerrero encontrando como resultado de su investigación ($6,89 \times 10^8$ UFC /mL) de bacterias coliformes totales lo que se podría decir que hubo un mal manejo en la materia prima y en el procesamiento, no se observó las condiciones higiénicas aptas e indica este estudio que en la Sierra se elabora productos lácteos con leche sin pasteurizar. Una carga microbiana alta afecta a la calidad del producto por lo tanto a estabilidad y vida útil del mismo lo cual habría un deterioro rápido del queso fresco. Los resultados obtenidos en esta

investigación muestran expotenciales de 10^4 UFC /mL hasta 10^5 UFC /mL observando claramente que la contaminación es inferior a la presentada en el foro de alimentos de Guerrero. Sin embargo estos datos muestran que hay contaminación alta de diferente origen ya que este parámetro nos indica que necesariamente fue contaminación fecal y estan fuera de los rangos establecidos por las normas de control.

La presencia de *E.coli* y *coliformes totales* en quesos frescos en la investigacion fueron (1.13×10^4 , 3×10^4 , 1.46×10^5 UFC/mL); ($4,19 \times 10^4$, $1,19 \times 10^5$, $1,19 \times 10^5$ UFC/mL) valores que indican la media de cada uno de los muestreos que se realizó, lo que refleja una contaminación a lo largo del proceso de elaboración presumiendo que fue ser fecal o no necesariamente debido a una mala higiene y manipulación del producto. Según la norma NTE INEN 1528(2012) en los requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados el índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad es menor a 10 UFC/mL de *E.coli* y el índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad es de 10 UFC/mL lo que se demuestra claramente que los resultados están por encima de los valores de referencia establecidos lo que implica que los quesos frescos comercializados en el mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba no están aptos para el consumo humano y posiblemente se deba a una mala prácticas de condiciones asépticas en la elaboración del producto, mal almacenamiento entre otros; Además para confirmar la presencia de *E.coli* se realizó la siembra en agar Eosina Azul de metileno y para coliformes totales se realizó la siembra por el método del número más probable (NMP).

Pruebas confirmatorias

Para una mejor interpretación de resultados y fácil comprensión del trabajo únicamente se realizó las pruebas confirmatorias para la muestra M1, M3 y M6.

✓ Siembra en agar Eosina Azul de metileno

Tabla3-3:Recuento de *Echerichia coli* en agar EMB

Fecha de muestreo	Numero de muestra	Unidades Formadoras de Colonia (UFC)
05-12-2015	M1	Incontables(colonias verdes metalicas)
12-12-2015	M3	Incontables(colonias verdes metalicas)
19-12-2015	M6	Incontables(colonias verdes metalicas)

Fuente:Jessica Haro

Con la observación macroscópica de las colonias verdes metálicas y descrito en la tabla 3-3 de resultados de recuento de *E. coli* en agar EMB en las placas Petri se pudo confirmar la presencia de *Escherichia coli* característica propia de este tipo de bacterias y confirmando el análisis en las placas Petrifilm para mayor seguridad del estudio realizado. Según Álvarez y Boquet el agar Eosina azul de metileno es un medio diferencial de Enterobacteriaceae y permite diferenciar los microorganismos que fermentan el azúcar de los que no fermentan.

✓ **Siembra por el metodo del numero mas probable(NMP)**

Tabla4-3:Resultados de coliformes totales por el metodo NMP

Fecha de muestreo	Numero de muestra	Resultado			Resultado NMP/g
		1/10	1/100	1/1000	
05-12-2015	M1	1	0	0	4
	M3	1	0	0	4
	M6	1	0	1	7
12-12-2015	M1	1	1	1	11
	M3	1	1	1	11
	M6	1	1	1	11
19-12-2015	M1	1	1	0	7
	M3	0	1	1	6
	M6	1	0	1	7

Fuente:Jessica Haro

La tabla 4-3 muestra los resultados obtenidos de coliformes totales en el queso fresco del mercado San Alfonso, confirmándose la presencia de estas bacterias perjudiciales para la salud del ser humano lo que implica que los procesos de elaboración de productos lacteos no se estan haciendo como deberían hacerse bajo las BPM para que sea un producto inocuo y de calidad.Comparando con el estudio realizado por Candida Diaz y Bedirva Gonzales de Garcia en quesos frescos en Venezuela que ha realizado la confirmacion en caldo verde bilis brillante y concluye que existe una contaminación por encima de los valores establecidos.

3.3. Anàlisis de *Staphylococcus aureus*

Tabla 5-3:Recuento de *Staphylococcus aureus*

Fecha de muestreo	Numero de muestra	Unidades Formadoras de Colonias(UFC/mL)	Media
05-12-2015	M1	0	4.29 x 10 ³
	M2	0	
	M3	0	
	M4	6×10 ³	
	M5	1.5×10 ⁴	
	M6	4×10 ³	

12-12-2015	M7	5×10^3	1.73×10^5
	M1	7×10^4	
	M2	0	
	M3	1.3×10^5	
	M4	5.4×10^5	
	M5	3×10^5	
	M6	7×10^4	
19-12-2015	M1	1×10^3	6.99×10^4
	M2	0	
	M3	1.2×10^3	
	M4	5×10^4	
	M5	0	
	M6	4.3×10^5	
	M7	7×10^3	

Fuente: Jessica Haro

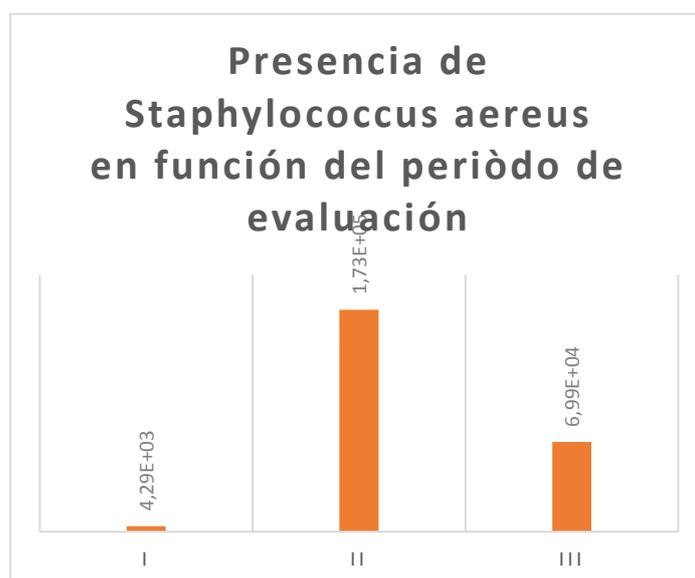


Grafico 7-3: Recuento de *Staphylococcus aureus* en placas Petrifilm 3M

Fuente: Jessica Haro

En el gráfico 7-3 se puede observar claramente la presencia de *Staphylococcus aureus* en el queso fresco comercializado en el mercado de San Alfonso, la primera fecha de muestreo se encontró $4,29 \times 10^3$ UFC/ml, valores que difieren significativamente de la presencia de microorganismos en el segundo y tercer muestreo puesto que en el segundo y tercer muestreo se registró $1,73 \times 10^5$ y $6,99 \times 10^4$ UFC/ml, debiéndose señalar que las dos últimas semanas de evaluación se determinó una alta carga microbiana en los quesos, esto quizá se deba a que estos productos fueron procedentes de fábricas en las cuales no existe la asepsia necesaria para la producción de alimentos inocuos de consumo apto .

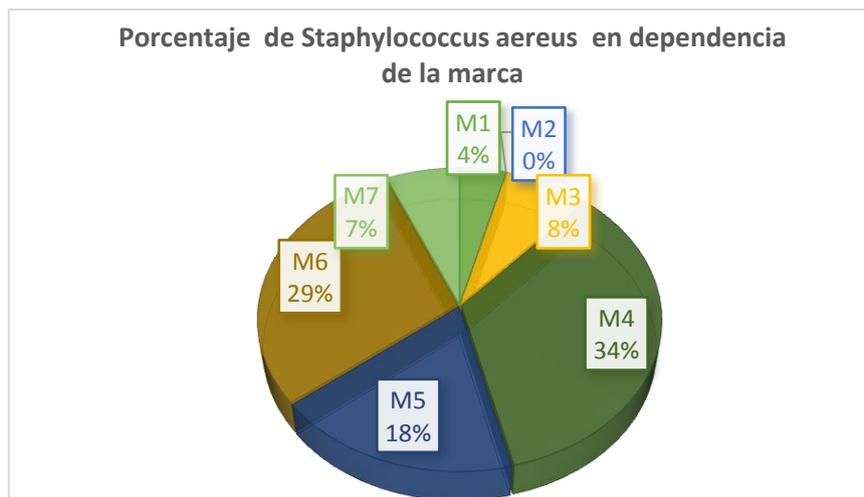


Gráfico 8-3: Porcentajes de *Staphylococcus aureus* de acuerdo a la marca de queso.
Fuente: Jessica Haro

En el gráfico 8-3 se muestra la presencia de *Staphylococcus aureus* en porcentajes en el queso fresco comercializado en el mercado de San Alfonso en función de las marcas analizadas, la muestra número cuatro indica un 34% siendo el valor más alto de conteo de bacterias, la muestra número seis presenta el 29%, en la muestra número cinco se encontró un 18%, la muestra número tres muestra el 8%, la muestra número siete indica un 7%, la muestra número uno señala un 4% y por último la muestra dos no indica la presencia de *Staphylococcus aureus*, indicando que la muestra cuatro tiene un alto porcentaje de *Staphylococcus aureus* esto quizá se deba a un proceso de mala práctica higiénica en el proceso de elaboración o de comercialización.

Nubia Vasquez, Luis Duran y colaboradores en el 2012 en Venezuela, realizaron un estudio sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas del queso blanco encontrándose un valor de *Staphylococcus aureus* de $(119 \times 10^2 - >10 \text{ UFC/mL})$ valores que son superiores a los establecidos en las normas venezolanas COVENIN 938-(83), de esta manera concluyeron que los parámetros microbiológicos de los quesos expandidos en este estado son deficientes pudiendo ser un riesgo para la salud de la población. Comparando con los resultados obtenidos $(4.29 \times 10^3, 1.73 \times 10^5, 6.99 \times 10^4 \text{ UFC/mL})$ en esta investigación son sumamente altos, lo que muestra que estos productos están altamente contaminados y atentan a la salud del consumidor.

Ayala Luis, Ramírez Fanny, Mayo 2013 Abril 2014 Vol.1 No.1 99-102, realizó un estudio del análisis microbiológico de queso fresco tipo rancho producido artesanalmente en el municipio de Petatlán, Guerrero encontrando como resultado de su investigación $6.66 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$ de *Staphylococcus aureus* lo que se podría indicar que hubo un mal manejo en la materia prima y en el procesamiento, no se observó las condiciones higiénicas aptas e indica este estudio que en

la Sierra se elabora productos lácteos con leche sin pasteurizar . Una carga microbiana alta afecta a la calidad del producto por lo tanto a estabilidad y vida útil del mismo lo cual habría un deterioro rápido de queso fresco.Los resultados obtenidos en esta investigación muestran exponentes de 10^3 UFC/mL hasta 10^5 UFC/mL observando claramente que la contaminación es inferior a la presentada en el foro de estudios de alimentos de Guerrero .Lo que muestra que estos datos están fuera de los rangos establecidos por las normas de control.

Ronald Maldonado y Luis Llanca, realizaron un estudio de la calidad del queso de mano comercializado en el municipio Girardot, estado Aragua, Venezuela, en donde el conteo de *Staphylococcus aureus* fue de 2.9×10^6 UFC/mL lo que muestra que estos valores están por encima de los valores establecidos en las normas Venezolanas llamadas COVENIN, esto implica una variación significativa y acarrearía problemas de salud pública grandes. Los valores obtenidos en el presente estudio son de (4.29×10^3 , 1.73×10^5 , 6.99×10^4 UFC/mL) mostrándose inferiores a comparación del estudio realizado en Venezuela sin embargo son altos para los valores de referencia en las normas INEN establecidas en Ecuador esto se podría dar debido a las malas condiciones de almacenamiento que manejan los comerciantes y a factores ambientales que afectan la naturaleza del queso fresco.

La presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos en la investigación fueron (4.29×10^3 , 1.73×10^5 , 6.99×10^4 UFC/mL) valores que indican la media de cada uno de los muestreos que se realizó, lo que refleja una mala higiene y manipulación del producto. Según la norma NTE INEN 1528(2012) en los requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados el índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad es 10^2 UFC/mL de *Staphylococcus aureus* parámetro en el cual están involucradas las bacterias en análisis y el índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad es de 10^2 UFC/mL lo que se demuestra claramente que los resultados están por encima de los valores de referencia establecidos lo que implica que los quesos frescos comercializados en el mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba no están aptos para el consumo humano y posiblemente se deba a una mala prácticas de condiciones asépticas en la elaboración del producto, mal almacenamiento entre otros.

Pruebas confirmatorias

✓ Siembra en agar PCA

Tabla 6-3:Recuento de *Staphylococcus aureus* en agar PCA

Fecha de muestreo	Numero de muestra	Unidades Formadoras de Colonias(UFC/mL)
05-12-2015	M1	No hay crecimiento
	M3	No hay crecimiento
	M6	25 colonias blancas cremosas
12-12-2015	M1	10 colonias blancas cremosas
	M3	20 colonias blancas cremosas
	M6	30 colonias blancas cremosas
19-12-2015	M1	No hay crecimiento
	M3	15 colonias blancas cremosas
	M6	25 colonias blancas cremosas

Fuente: Jessica Haro

La tabla 6-3 muestra claramente los resultados de las pruebas confirmatorias de la siembra en agar PCA observando la presencia de *Staphylococcus aureus* y macroscòpicamente colonias blancas cremosas características de este microorganismo.

✓ **Siembra en agar manitol salado**

Tabla 7-3: Recuento de *Staphylococcus aureus* en agar manitol salado

Fecha de muestreo	Numero de muestra	Unidades Formadoras de Colonias(UFC/mL)
05-12-2015	M1	No hay crecimiento
	M3	6 colonias fermentan
	M6	8 colonias fermentan
12-12-2015	M1	No hay crecimiento
	M3	2 colonias fermentan
	M6	5 colonias fermentan
19-12-2015	M1	No hay crecimiento
	M3	3 colonias fermentan
	M6	1 colonias fermentan

Fuente: Jessica Haro

La tabla 7-3 muestra los resultados de la prueba confirmatoria de *Staphylococcus aureus* sembrado en agar manitol salado específico para este tipo de microorganismo y observándose macroscòpicamente la fermentación por lo tanto el cambio de color del agar de crema a amarillo fuerte.

✓ **Tinción Gram**

Tabla 8-3: Resultados de la Tinción Gram

	Morfologías bacterianas		Total
	Bacilos	Cocos	
Gram Negativos	75	0	75
Gram Positivos	0	25	25

Fuente: Jessica Haro

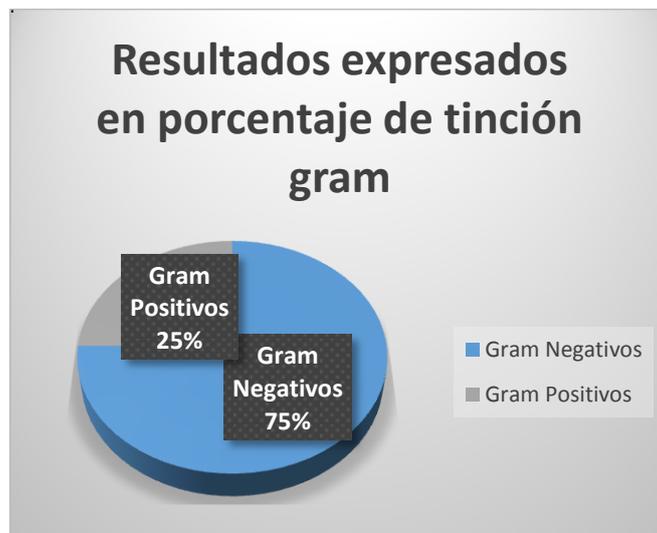


Gráfico 9-3: Resultados expresados en porcentaje de la Tinción Gram

Fuente: Jessica Haro

En el gráfico 9-3 se puede observar que en las muestras de quesos analizados, el 75% corresponde a bacterias Gram Negativas evidenciando así una alta carga microbiana que incluye a la bacteria *Escherichia coli* dentro de esta familia y confirmando la gran cantidad de bacterias de este tipo; mientras que el 25% corresponde a bacterias Gram Positivas confirmando la presencia de *Staphylococcus aureus* y así se pudo determinar toda la carga microbiana presente en estos productos de consumo masivo.

CONCLUSIONES

- ✚ La recolección de muestras de queso fresco se realizó bajo los estándares enmarcados en la norma NTE INEN 0004 para muestreo de leche y productos lácteos primera edición del año 1984.
- ✚ El recuento total de bacterias aerobias mesófilas presentes en el queso fresco comercializado en el mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba provincia de Chimborazo fue de ($6,29 \times 10^3$, $4,96 \times 10^6$, $1,43 \times 10^6$ UFC/mL) valores correspondientes a las medias de los tres periodos de evaluación.
- ✚ El número de *Staphylococcus aureus* registrados en el estudio microbiológico de los quesos frescos comercializados en el mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba fue de ($4,29 \times 10^3$, $1,73 \times 10^5$, $6,99 \times 10^4$ UFC/mL) datos promedios al muestreo por triplicado, valores que exceden los requerimientos establecidos en la NTE-INEN 1528.
- ✚ Se determinó que el número de coliformes totales presentes en las muestras de queso fresco comercializado en el mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba provincia de Chimborazo fue de ($4,19 \times 10^4$, $1,19 \times 10^5$, $2,29 \times 10^5$ UFC/mL) valores correspondientes a las medias de los tres periodos de evaluación el cual nos indica una mala práctica de condiciones higiénicas.
- ✚ Se reportó que el número de *Escherichia coli* en el estudio microbiológico de los quesos frescos comercializados en el mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba fue de ($1,13 \times 10^4$, 3×10^4 , $1,46 \times 10^5$ UFC/mL) valores promedios al muestreo por triplicado que se realizó; parámetro que indica contaminación fecal y superan los límites establecidos en la NTE-INEN 1528.

RECOMENDACIONES

- Capacitar periódicamente a los comerciantes acerca de las medidas higiénicas sanitarias que deben tomar al momento de la venta de los productos lácteos.
- Realizar un control permanente por parte de las autoridades de control que tengan los puestos de comercialización los equipos necesarios para conservar el producto en buenas condiciones.
- Continuar con el análisis microbiológico para aislar y determinar otros tipos de bacterias de riesgo para la salud del ser humano.
- Realizar un diagnóstico médico por lo menos semestral a los comerciantes de quesos frescos del mercado.
- Sabiendo que en la región sierra existe un alta producción lechera y por ende es un porcentaje alto de la misma que es destinado a la elaboración de quesos frescos se recomienda a las autoridades implementar procesos de BPM para que el producto final tenga un valor agregado y sean beneficiados los productores y así garanticen un producto de calidad para el consumidor.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ÁLVAREZ, M. Victoria, BOQUET, Ernesto y DE FEZ, M. Isabel.** MANUAL DE TÉCNICAS EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. 2da. ed. España: Asociación Española de Farmacéuticos Analistas, 1990. 111 p.pp32-35.
2. **AYALA-GUERRERO, Luis Mario, FANNY-SÁNCHEZ, Ramírez, ESPINOSA-ENRÍQUEZ, José Luis y BAÑOS-ESPÍNOLA, Bernardette** (2014). Análisis microbiológico de queso fresco tipo ranchero producido artesanalmente en el municipio de Petatlán, Guerrero. pp 99-102. [Consulta: 06 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.fesgro.mx/journal/articulos/Alimentos-99-102.pdf>
3. **ANÓNIMO.** La página de Bedri queso. [Consulta: 07 de enero de 2016].Disponible en: http://www.bedri.es/Comer_y_beber/Queso/Tipos_de_quesos.htm
4. **ANÓNIMO.** [Consulta: 08 de enero de 2016].Propiedades nutritivas del queso. Disponible en: <http://maby.snarvaez.com.ar/salud/2012/08/15/propiedades-nutritivas-del-queso/>
5. **ANÓNIMO.** Tinción Diferencial de Gram. [Consulta: 12 de enero de 2016].Disponible en:<http://biologiadelarmvz.wikispaces.com/file/view/Pr%C3%A1ctica+3+Tinci%C3%B3n+de+Gram.pdf>
6. **ANÓNIMO.** Método para la determinación de bacterias *coliformes*, *coliformes fecales* y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple (número más probable o NMP). [Consulta: 16 de enero de 2016].Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Analisis_Agua_NMP_22309.pdf
7. **ANÓNIMO.** Medición de la actividad del agua. [Consulta: 16 de enero de 2016]. pp 1-4.Disponible en: http://www.iberfluid.com/consierge/docs/1458_articulos_786_Actividad%20del%20agua.pdf

8. **BOTANICALONLINE.** Beneficios de los quesos. [Consulta: 08 de enero de 2016]. Disponible en: http://www.botanical-online.com/Beneficios_de_queso.htm y <http://www.alimentatubienestar.es/los-productos-lacteos-y-la-soja/>
9. **CASTILLO Glenda.** “PREVALENCIA DE BACTERIAS PATÓGENAS Listeria monocytogenes Y Staphylococcus aéreos, EN QUESOS FRESCOS ELABORADOS ARTESANALMENTE EN LAS PARROQUIAS RURALES DEL CANTÓN RIOBAMBA.”. Espoch. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. 2013. pp 14-17 [Consulta: 08 de enero de 2016]. Disponible en : <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/2614/1/56T00388.pdf>
10. **CABALLERO TORRES Angel e y CARDONA GALVEZ Marta .** Protección sanitaria de alimentos. Métodos de higiene de los alimentos. pp 224-228. [Consulta: 08 de enero de 2016]. Disponible en: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/232017/Archivos_syllabus/Causas_de_descomposicion_de_Alimentos.pdf#page=224
11. **CASTILLO Maritza C. y HUALPA Diana S.** Inocuidad en los alimentos. Consumo de lácteos sin procesar un RIESGO LATENTE. CETTIA – Universidad Técnica Particular de Loja. [Consulta: 06 de enero de 2016]. Disponible en: http://www.alimentosecuador.com/descargas/bt4be80e89c9036_Inocuidad%20de%20los%20alimentos.pdf
12. **CODEX ALIMENTARIUS;** Leche y productos lácteos; [Consulta: 07 de enero de 2016]. Disponible en ftp://ftp.fao.org/codex/publications/booklets/milk/Milk_2007_ES.pdf
13. **C. RAMÍREZ - LÓPEZ.** Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos (2012). [Consulta: 07 de enero de 2016]. Disponible en: <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Ramirez-Lopez-et-al-2012.pdf>
14. **CABRERA Jairo.** Trabajo de titulación previo a la obtención de Ingeniero industrial de la Politécnica Nacional. ESTUDIO DE PRE FACTIBILIDAD E IMPACTO AMBIENTAL PARA EL ESTABLECIMIENTO DE UNA PLANTA DE PROCESAMIENTO DE LÁCTEOS EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS. CASO LEFRIDERSA S.A. [Consulta: 16 de enero de 2016]. Disponible en <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/3978/3/CD-3755.pdf>

15. **DÍAZ Cándida -Rivero y Bedirva GONZÁLEZ de García.** Vol. 2 No.3 Julio-Septiembre 2001. Staphylococcus aureus EN QUESO BLANCO FRESCO Y SU RELACIÓN CO DIFERENTES MICROORGANISMOS INDICADORES DE CALIDAD SANITARIA. . [Consulta: 06 de enero de 2016]. Disponible en: http://www.hablemosclaro.org/Repositorio/biblioteca/b_147_Queso-blanco-calidad%20sanitaria.pdf

16. **ECOTECH.** [Consulta: 16 de enero de 2016]. Disponible en: https://www.google.com.ec/search?q=protocolo+de+muestreo+de+quesos+frescos+de+la+FAO&biw=1366&bih=667&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiXIypxrfKAhWMOiYKHbA0D_0Q_AUIBigB#tbm=isch&q=protocolo+de+muestreo+de+alimentos&imgsrc=C0elrtE6x365rM%3a

17. **EL TELÉGRAFO.** La industria lechera busca generar valor agregado. . [Consulta: 16 de enero de 2016].Disponible en: <http://www.telegrafo.com.ec/economia/item/la-industria-lechera-busca-generar-mayor-valor-agregado.html>

18. **FAO.** Procesos para la elaboración de productos lácteos. Manual de procedimiento de elaboración de queso fresco. [Consulta: 07 de enero de 2016].Disponible en: http://coin.fao.org/coin-static/cms/media/11/13305375675880/manual_lacteos_3_atinar_ii.pdf

19. **FAO.** Estudio de Caso – Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Costa Rica. [Consulta: 16 de enero de 2016].Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i0480s/i0480s01.pdf>

20. **FUENTES Anacleto Félix, CAMPAS BAYPOLI Olga Nydia y MEZA MONTENEGRO Mercedes.** Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora. CALIDAD SANITARIA DE ALIMENTOS DISPONIBLES AL PÚBLICO DE CIUDAD OBREGÓN, SONORA, MÉXICO. Julio-Septiembre Vol 6 No. 3 2005. [Consulta: 06 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revsalpubnut/spn-2005/spn053c.pdf>

21. **GONZALES Edgar.** Caracterización de la composición físico química del queso fresco elaborado artesanalmente en Sehualaca, municipio de Minatitlán, Veracruz. .

[Consulta: 16 de enero de 2016]. Disponible en <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/29722/1/Gonzalez%20Ramirez.pdf>

22. **INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. INEN.** Norma general para quesos frescos no madurados. Primera edición. pp 1-5. [Consulta: 06 de enero de 2016]. Disponible en: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1528.2012.pdf>
23. **INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. INEN. (NTE. INEN 10:2012.** Leche pasteurizada requisitos. Primera edición. pp 4. [Consulta: 10 de enero de 2016]. Disponible en: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0010.2012.pdf>
24. **INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. INEN. (NTE. INEN 09:2012)** Leche cruda requisitos. Primera edición. pp 3-5. [Consulta: 10 de enero de 2016]. Disponible en: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0009.2008.pdf>
25. **INEC.** Datos estadísticos agropecuarios. . [Consulta: 16 de enero de 2016]. Disponible en: http://www.inec.gob.ec/espac_publicaciones/espac-2011/INFORME_EJECUTIVO%202011.pdf
26. **LIC. GONZÁLEZ VILLAREAL Manuel.** “Tecnología para la Elaboración de Queso Blanco, Amarillo y Yogurt”. Septiembre 2002. [Consulta: 08 de enero de 2016]. Disponible en: http://www.argenbio.org/doc/tecnologia_para_la_elaboracion_de_queso.pdf
27. **MALDONADO Ronald y LLANCA Luis.** Estudio de la calidad del queso de mano comercializado en el municipio Girardot, estado Aragua, Venezuela. Rev. Cient. (Maracaibo) v.18 n.4 Maracaibo ago. 2008. Laboratorio de Físico-Química, Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay. Apartado postal Aragua 2105. Venezuela. [Consulta: 06 de enero de 2016]. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-22592008000400014&script=sci_arttext.
28. **MALDONADO, LLANCA Ronald, Luis.** Estudio de la calidad del queso de mano comercializado en el municipio Girardot, Estado Aragua, Venezuela. [Consulta: 06 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/26057>

29. **MÁRQUEZ José Gregorio y GARCÍA R Carmen Elena.** Micro flora patógena del queso blanco “telita” elaborado en cuatro estados de Venezuela. Disponible en: <http://anales.fundacionbengoa.org/ediciones/2007/1/art3.pdf>
30. **MÁRQUEZ Cristina.** [Consulta: 07 de enero de 2016]. Disponible en: <http://edicionimpresa.elcomercio.com/es/14110000d448dafc-9b09-4a7d-9a3f-9457000131e2>
31. **MINISTERIO DE COORDINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN, EMPLEO Y COMPETITIVIDAD.** Mayo 2011. Agendas para la transformación productiva territorial. Chimborazo. [Consulta: 07 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/02/AGENDA-TERRITORIAL-CHIMBORAZO.pdf>
32. **3M 2016.** [Consulta: 10 de enero de 2016]. Disponible en: http://solutions.productos3m.es/wps/portal/3M/es_ES/FoodSafetyEU/FoodSafety/ProductInformation/ProductCatalogue/?PC_Z7_RJH9U5230ODK40IMRSPA7P2O65000_nid=2BJ86690LFbe8SD7TQV1GLgl
33. **3M 2016.** [Consulta: 10 de enero de 2016]. Disponible en: [file:///E:/Trabajo%20de%20titulacion/cartillas-aureuspetrifilm-120227183918-phpapp01%20\(1\).pdf](file:///E:/Trabajo%20de%20titulacion/cartillas-aureuspetrifilm-120227183918-phpapp01%20(1).pdf)
34. **3M 2016.** [Consulta: 10 de enero de 2016]. Disponible en : [file:///C:/Users/Jaime/Downloads/e-coli-y-totales-para-recuento%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Jaime/Downloads/e-coli-y-totales-para-recuento%20(1).pdf)
35. **MENDOZA Cesar.** UFAP Comunicación Social. [Consulta: 14 de enero de 2016]. Disponible en: <http://barriosanalfonso.blogspot.com/p/autor.html>
36. **NORMA TÉCNICA NICAGUARENSE, 03 022 - 99 NORMA DE QUESOS FRESCOS NO MADURADOS.** [Consulta: 07 de enero de 2016]. Disponible en <http://www.oirsa.org/aplicaciones/subidoarchivos/marcolegalcria/nton0302299nileche.htm>
37. **NTE INEN 1528(2012).** Norma general para quesos frescos no madurados y requisitos. Primera revision. [Consulta: 16 de enero de 2016]. Disponible en: [https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1528.2012.pdf\(inen 1528\)](https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1528.2012.pdf(inen 1528)).

38. **NÚÑEZ Vanesa.** ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMO MINEROMEDICINALES DEL BALNEARIO “EL SALADO” DE BAÑOS DE AGUA SANTA-TUNGURAHUA”. Espoch. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia.2013.pp 20-25. [Consulta: 08 de enero de 2016].
39. **NTE. INEN 0004(1984).** Leche y productos lácteos muestreo. [Consulta: 14 de enero de 2016].Disponible en: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0004.1984.pdf>
40. **PLAZA IBARRA Luis Antonio, MORALES ROMO Leroux Ma. Fernanda,** ESPOL .Facultad de Ingeniería Mecánica y ciencias de la producción- Ingeniería en alimentos. Análisis Microbiológico en Quesos Frescos que se Expenden en Supermercados en la Ciudad de Guayaquil. Determinando la Presencia o Ausencia de Listeria y Salmonella. [Consulta: 06 de enero de 2016]. Disponible en <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/24428/1/resumen%20luis%20plaza.pdf>.
41. **Ruth L. DELGADO Cristóbal y Dora J. MAURTUA TORRES.** Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de Lactobacillus spp. pp 158-163. [Consulta: 06 de enero de 2016]. Disponible en <http://www.scielosp.org/pdf/rpsp/v14n3/a02v14n3>.
42. **REVISTA EL AGRO.** Industria láctea principal eslabón en la producción pecuaria. [Consulta: 14 de enero de 2016]. Disponible en <http://www.revistaelagro.com/2013/04/25/industria-lactea-importante-eslabon-en-la-produccion-pecuaria/>
43. **SIRVETA** (Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos). [Consulta: 07 de enero de 2016].Disponible en: <http://www.panalimentos.org/panalimentos/files/Informe%20consulta%20veta.pdf>
44. **SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MEDICINA Y COLABORADORES.** QUESO, YOGUR Y OTRAS LECHES FERMENTADAS. [Consulta: 08 de enero de 2016]. Disponible en http://www.lacteosinsustituibles.es/p/archivos/pdf/monografia_queso_yogur_otrasleche_sfermentadas.pdf

45. **STANIER Roger, INGRAHAM John, WHEELS Mark, PAINTE Page.** Microbiología. Segunda Edición. Editorial Reverte. Capítulo 2, pp 17-25. [Consulta: 14 de enero de 2016]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=2u-6Q2XCMDgC&pg=PA18&lpg=PA18&dq=siembra+en+agar+PCA&source=bl&ots=4UihlewEUu&sig=0g2sPzP2-t9xf_LZzVykxYmO0cM&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiJ3Yah2bLKAhXMTCYKHbx5DvQQ6AEINjAH#v=onepage&q=siembra%20en%20agar%20PCA&f=false
46. **TUCUMÁN 2010.** Guía de elaboración de quesos artesanales. [Consulta: 10 de enero de 2016]. Disponible en http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/procal/proyectospiloto/2009/2009_lacteos_tucuman_01_guiaqueos.pdf
47. **UNIVERSIDAD DE GRANADA.** [Consulta: 10 de enero de 2016]. Preparación de medios de cultivo. Disponible en: <http://www.ugr.es/~cjl/medios%20de%20cultivo.pdf>
48. **UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL 2009.** Siembra y recuento de microorganismos. [Consulta: 14 de enero de 2016]. Disponible en: http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicoII.pdf
49. **VÁSQUEZ Nubia, DURAN Luís, SÁNCHEZ Cecilia e ACEVEDO Iría. (2012).** Evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas del queso blanco a nivel de distribuidores, estado Lara, Venezuela. Vol. 30. Zootecnia Trop. vol.30 no.3 Maracay set. 2012. Universidad Centoccidental Lisandro Alvarado (UCLA). [Consulta: 06 de enero de 2016]. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S079872692012000300001&script=sci_arttext&tlng=es
50. **ZAMORA Roxana, SALVADOR Alejandro, ALVARADO Carlos y BETANCOURT Ricardo.** Producción y Composición de la Leche y Queso Fresco Pasteurizado de Cabras Mestizas Canarias Suplementadas con Grasa Sobre pasante. [Consulta: 08 de enero de 2016]. Disponible en http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-65762011000100005

ANEXOS

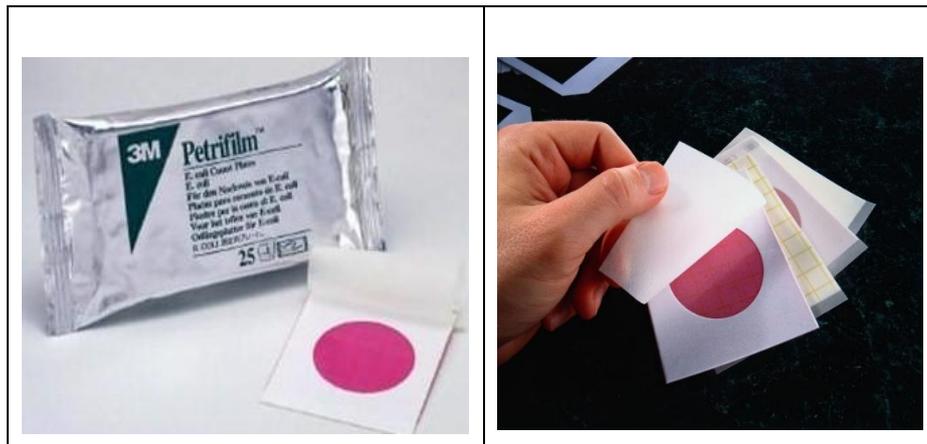
Anexo A

Mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba(Sección lácteos)



Anexo B

Reactivos Utilizados



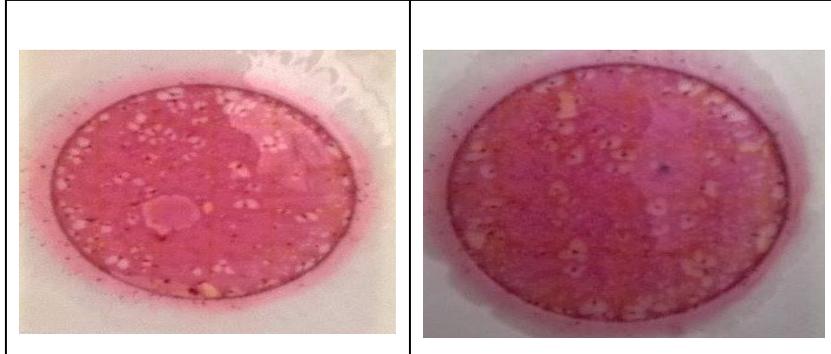
Anexo C

Transporte de muestras



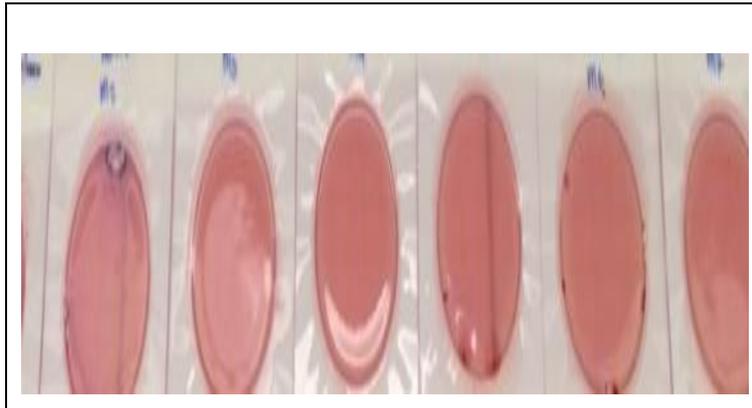
Anexo D

Determinación de *Escherichia coli* y coliformes totales en placas Petrifilm 3M



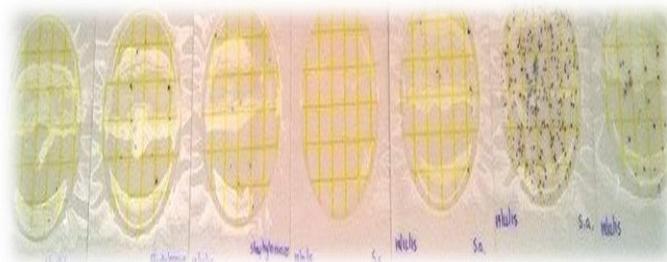
Anexo E

Determinación de Aerobios mesófilos en placas Petrifilm 3M



Anexo F

Determinación de *Staphylococcus aureus* en placas Petrifilm 3M



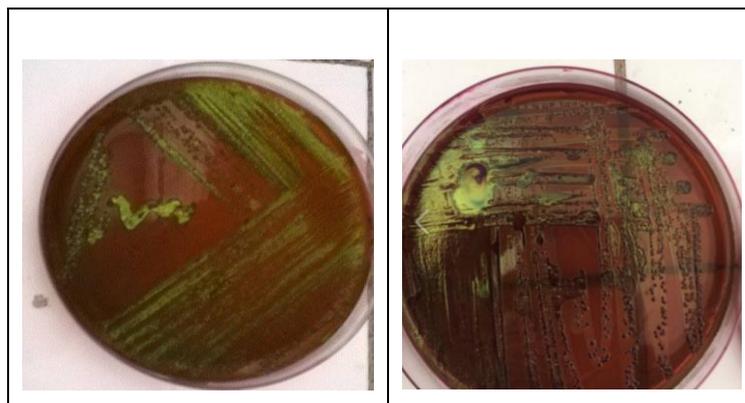
Anexo G

Determinación de coliformes totales por el metodo del NMP



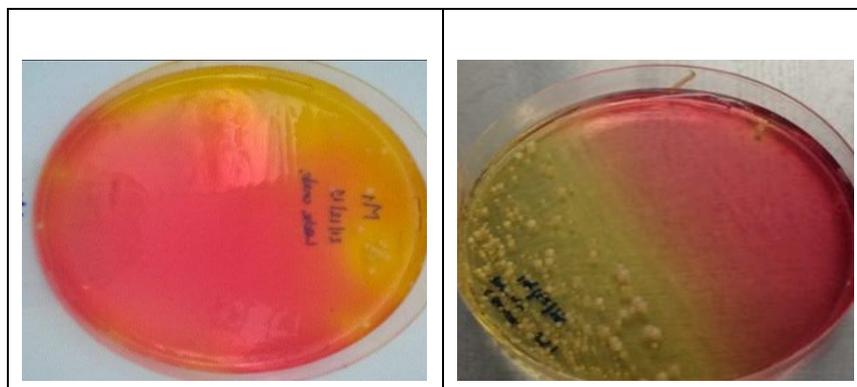
Anexo H

Confirmación de *Escherichia coli* en agar EAM



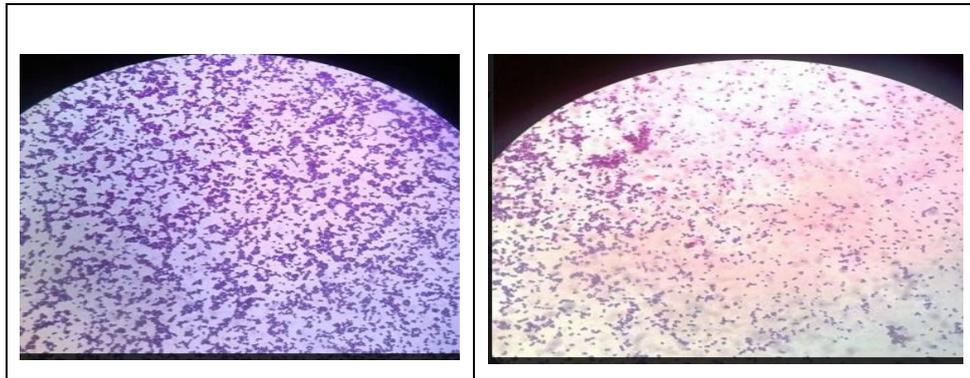
Anexo I

Confirmación de *Staphylococcus aureus* en agar Mnitro salado



Anexo J

Resultados de la Tinción Gram



Anexo K

Análisis estadístico

Aerobios mesofilos (UFC/mL)					
Marcas	Período de muestreo			Fisher	P. F.
	I	II	III		
M1	0	5000000	0		
M2	0	5400000	1200		
M3	0	2600000	50000		
M4	8000	6000000	710000		
M5	13000	130000	1400000		
M6	10000	7600000	570000		
M7	13000	8000000	7300000		
ADEVA					
F. Var	gl	S. Cuad.	C. Medio	Fisher	P. F.
Total	20	1,79E+14			
Marcas	6	4,11E+13	6,85E+12	1,75E+00	0,19
Período de m	2	9,11E+13	4,55E+13	1,16E+01	0,002
Error	12	4,70E+13	3,92E+12		
CV %				9,27E+01	
Media			2,13E+06		

Escherichia coli (UFC/mL)					
Marcas	Período de muestreo			Fisher	P. F.
	I	II	III		
M1	0	120000	10000		
M2	0	0	0		
M3	0	0	50000		
M4	49000	90000	71000		
M5	0	0	0		
M6	0	0	570000		
M7	30000	0	320000		
ADEVA					
F. Var	gl	S. Cuad.	C. Medio	Fisher	P. F.
Total	20	3,79E+11			
Marcas	6	8,86E+10	1,48E+10	8,20E-01	0,58
Período de m	2	7,44E+10	3,72E+10	2,07E+00	0,17
Error	12	2,16E+11	1,80E+10		
CV %			2,15E+02		
Media			6,24E+04		

Coliformes totales (UFC/mL)					
Marcas	Período de muestreo			Fisher	P. F.
	I	II	III		
M1	0	250000	2000		
M2	0	10000	11000		
M3	0	160000	0		
M4	90000	180000	130000		
M5	3000	10000	1400000		
M6	149000	110000	22000		
M7	51000	110000	40000		
ADEVA					
F. Var	gl	S. Cuad.	C. Medio	Fisher	P. F.
Total	20	1,80E+12			
Marcas	6	4,34E+11	7,24E+10	6,98E-01	0,66
Período de m	2	1,24E+11	6,22E+10	5,99E-01	0,56
Error	12	1,24E+12	1,04E+11		
CV %			2,48E+02		
Media			1,30E+05		

Staphylococcus aerus (UFC/mL)					
Marcas	Período de muestreo			Fisher	P. F.
	I	II	III		
M1	0	70000	1000		
M2	0	0	0		
M3	0	130000	1200		
M4	6000	540000	50000		
M5	15000	300000	0		
M6	4000	70000	430000		
M7	5000	100000	7000		
ADEVA					
F. Var	gl	S. Cuad.	C. Medio	Fisher	P. F.
Total	20	4,64E+11			
Marcas	6	1,05E+11	1,76E+10	8,19E-01	0,58
Período de m	2	1,01E+11	5,05E+10	2,36E+00	0,14
Error	12	2,57E+11	2,14E+10		
CV %			1,78E+02		
Media			8,23E+04		