



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE Bacillus cereus EN ALIMENTOS DESHIDRATADOS

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a n :

EUFROSINA ALBA GUTIERREZ RODRIGUEZ

FRINE IMELDA MENENDEZ CREAMER

México, D. F.

1980

M-21688



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado originalmente según el tema:

Presidente:	Enrique García Galeano
Vocal:	Rosa Ma. Ramírez Gama
Secretario:	Mercedes Irueste Alejandre
1er. suplente:	Olga Velázquez Madrazo
2do. suplente:	Javier Lumbreras Guerrero

Sitio donde se desarrolló el tema:

Cía. Nestlé, S.A.

Nombre de los sustentantes:

Eufrosina Alba Gutiérrez Rodríguez

Friné Imelda Menéndez Creamer

Nombre del asesor del tema:

Mercedes Irueste Alejandre

A nuestros padres:

Pablo y Nieves

Héctor e Imelda

Con inmenso cariño, por todo lo que representan
para nosotros

A nuestros hermanos:

	Claudia
Leopoldo	Patricia
Rosa Ma.	Cecilia
Silvia	Héctor
Eugenia	Alvaro
José Luis	Galo

A ti, José

por todo lo que eres

A Alvaro con amor

A la Maestra Mercedes Irueste
por su orientación y confianza en la
elaboración de este trabajo

Agradecemos a todo el personal de "LABO",
las facilidades y la ayuda que nos brindaron durant
te el desarrollo de esta investigación

Al Ing. Arq. Jesús F. Díaz nuestro agradec
cimiento por su colaboración en el diseño gráfico

A nuestros familiares y amigos, quienes
por su cooperación, comprensión y aliento facilitan
ron el desarrollo de este trabajo

C O N T E N I D O

I.	Introducción.	1
II.	Objetivo.	6
III.	Generalidades.	
	1. Características Generales de la familia Bacillaceae	7
	2. Características de <u>Bacillus cereus</u>	8
	3. Características de la toxina.	
	3.1. Purificación, Producción y Síntesis.	9
	3.2. Toxicidad.	13
IV.	Experimentación.	
	1. Material y Métodos de Análisis.	16
	1.1. Descripción del material.	16
	1.2. Medios de cultivo y reactivos.	17
	1.3. Productos analizados.	17
	1.4. Técnicas del Análisis	18
	1.4.1. Cuantificación de microorganismos aerobios mesófilos.	20
	1.4.2. Cuantificación de esporas de mi-- croorganismos aerobios mesófi-- los.	21
	1.4.3. Cuantificación de esporas de <u>Baci-</u> <u>llus cereus</u>	22

1.4.3.1.	Agar de Donovan.	25
1.4.3.2.	KG Agar.	25
1.4.3.3.	MYP Agar	26
1.4.4.	Aislamiento de colonias.	27
1.4.5.	Pruebas Bioquímicas.	
1.4.5.1.	Fermentación de Carbohidratos: (glucosa y manitol).	27
1.4.5.2.	Medio de Voges-Proskauer modificado para <u>Bacillus cereus</u>	28
1.4.5.3.	Caldo Nitratos..	29
1.4.5.4.	Catalasa.	31
2.	Parte Experimental.	31
V.	Resultados y Discusión.	34
VI.	Conclusiones.	42
VII.	Bibliografía.	44

I.- INTRODUCCION.

Los trastornos gastrointestinales son la causa principal de morbilidad en gran diversidad de países, sobre todo en aquellos que, como México, se encuentran en vías de desarrollo.

En 1978 la Dirección General de Salubridad registró, sólo en el Distrito Federal, más de 45,000 casos de gastroenteritis, de los cuales, solamente el 1.24% correspondió a intoxicaciones de origen alimenticio debidas a bacterias (como puede apreciarse en la tabla No. 1). La incidencia real, sin embargo, puede ser mucho más alta debido a que muchas personas afectadas no buscan tratamiento médico o si lo hacen puede parecer que presentan trastornos esporádicos, por lo que no se siguen investigaciones detalladas. Aunque la mortalidad es usualmente baja, los males entéricos contribuyen a una considerable morbilidad.

Se reconocen tres grupos principales de bacterias productoras de intoxicaciones de origen alimenticio: el primer grupo requiere de la multiplicación de los microorganismos en el tubo digestivo del huésped para provocar la infección; el segundo grupo comprende aquellas bacterias cuyas toxinas están ya preformadas en el alimento cuando éste es consumido, siendo la causa directa de la enfermedad; por último, en el tercero se agrupan los organismos

Tabla No. 1 : Número de casos de enfermedad registradas sólo en el D.F.

Año	Intoxicación bacteriana por alimentos	Enfermedades de tipo diarreico y enteritis
1969	265	62,833
1970	263	58,106
1971	119	28,296
1972	425	60,623
1973	454	55,498
1974	566	55,625
1975	494	55,812
1976	531	52,592
1977	410	61,464
1978	594	47,981

Información obtenida de la Dirección General de Salubridad en el Distrito Federal. Oficina de estadística. Concentración Semestral y Anual de las labores realizadas por 24 distritos sanitarios.

cuyo mecanismo de acción no es bien conocido, es decir, no se sabe si actúan por sus toxinas o por su multiplicación en el aparato digestivo. Existe una estrecha relación entre los dos últimos grupos, ya que ambos necesitan de la presencia elevada de microorganismos en el alimento para que se manifieste la enfermedad. Al tercer grupo pertenecen Clostridium perfringens, Streptococcus faecalis, Streptococcus faecium y Bacillus cereus. (Thatcher, 1972).

Bacillus cereus es una bacteria considerada con frecuencia, como no patógena y los trastornos alimenticios debidos a este microorganismo son ignorados o no identificados así. En los Estados Unidos el número de reportes de intoxicaciones por Bacillus cereus es muy inferior a los detectados en Europa, los cuales mencionan síntomas semejantes a los provocados por Clostridium perfringens y Staphylococcus aureus. La tabla No. 2, muestra los datos clínicos y epidemiológicos de casos debidos a C. perfringens, S. aureus y Bacillus cereus, en donde se observa su gran similitud.

La sintomatología de una intoxicación provocada por Bacillus cereus se caracteriza por un período, transcurrido entre la ingestión del alimento hasta la aparición de síntomas, que varía usualmente de 1 a 16 horas. Estos síntomas incluyen diarrea, que va desde ligera a profusa, dolores abdominales, náuseas que pueden provocar vómito y a ve

TABLA N° 2

DATOS CLINICOS Y EPIDEMIOLOGICOS DE INTOXICACIONES ALIMENTICIAS CAUSADAS POR CLOSTRIDIUM PERFRINGENS, Bacillus cereus Y STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

	<u>Cl. perfringens</u>	<u>B. cereus</u> [*]	<u>B. cereus</u> ^{**}	<u>Staph. aureus</u>
Período de incubación (hrs.)	8-22	8-16	1-5	2-6
Duración de la enferm. (hrs.)	12-24	12-24	6-24	6-24
Diarrea	Extremadamente común	Extremadamente común	Regularmente común	Común
Vómito	Raro	Ocasional	Extremadamente común	Extremadamente común
Alimentos frecuentemente implicados.	Carne cocida y aves.	Productos cárnicos sopas, vegetales, pudines, y salsas.	Arroz frito de comida china y tiendas de paso.	Carne cocida, aves y productos lácteos.

* Intoxicaciones reportadas desde 1950 en varias ciudades incluyendo Noruega, Dinamarca, Italia, Holanda, Hungría, Suecia, Polonia, Rumania, la URSS, EUA, Alemania y Canadá.

** Intoxicaciones desde 1971 en Gran Bretaña, Canadá, Australia, Finlandia, Holanda y EUA.

ces se presenta fiebre.

El primer informe completo sobre B. cereus provino de Noruega en 1950, después de la investigación de cuatro ataques violentos que involucraron a 600 personas. La enfermedad se caracterizó por síntomas de diarrea y dolores abdominales dentro de las 8 y 16 horas después de la ingestión del alimento. Un gran número de B. cereus fué aislado de los residuos alimenticios.

En Gran Bretaña en 1971, en el transcurso de 4 meses, un total de 30 personas presentaron síntomas de envenenamiento de origen alimenticio caracterizado por náuseas y vómito dentro de 1 a 6 horas y algunas veces diarrea dentro de 2 a 5 horas, después del consumo de diversos alimentos. La causa de los incidentes fué B. cereus presente en gran número, sin embargo los síntomas no fueron los típicos descritos anteriormente.

En Hungría entre 1960 y 1968, de todas las intoxicaciones provenientes de alimentos, B. cereus fué el causante de la tercera parte.

Es extraño que existan pocos reportes de esta enfermedad en los Estados Unidos de América y en el Reino Unido, en donde la intoxicación por B. cereus en alimentos es poco frecuente, quizá pueda deberse a que la enfermedad es muy suave y por eso pase inadvertida, o a que los síntomas han sido confundidos y clasificados como ocasionados

por otros microorganismos como C. perfringens o S. aureus. La tabla No. 3, señala el número de brotes y casos de enfermedades alimenticias en los Estados Unidos, mostrando que la intoxicación debida a B. cereus se registró sólo con 7 brotes, involucrando a 121 personas en un período de cinco años.

Como B. cereus se encuentra normalmente en polvo y suelo, resulta muy difícil disminuir su número en el ambiente, por lo que es evidente que se presente en muchos alimentos. Se han considerado entre otros: picadillo, embutido de hígado, pescado, aves, vegetales, papas, cocoa, arroz cocinado, sopas, salsas, condimentos, fideos, helados, harinas, leche fresca y en polvo.

Es muy importante, sin embargo hacer notar que para causar los síntomas de intoxicación, el número mínimo de microorganismos es del orden de 10^7 /g de alimento, excepto en los niños pequeños en donde sólo basta 10^5 /g de alimento. (Banwart, 1979; Mossel, 1967).

Varios factores pueden contribuir en el desarrollo exagerado de B. cereus en los alimentos, algunos de estos son: la contaminación de las materias primas, la ocasionada a lo largo del proceso, las malas condiciones de almacenaje, el poco cuidado durante el manejo provocado por falta de higiene personal, la preparación del alimento un día o más antes de servirlo, dejándolo expuesto varias ho

Tabla No. 3 : Número de brotes y casos de enfermedades asociadas al consumo de alimentos con etiología confirmada en los E.U.A.(1972-1976).

Bacteria	Brotos		Casos	
	No.	%	No.	%
Arizona hinshawii	1	0.1	15	0.1
Bacillus cereus	7	0.9	121	0.4
Brucella	1	0.1	4	0.1
Clostridium botulinum	72	9.2	146	0.4
Clostridium perfringens	55	7.0	3,388	10.3
Salmonella	170	21.7	12,583	38.2
Shigella	23	2.9	2,372	7.2
Staphylococcus aureus	168	21.4	9,782	29.7
Streptococcus (grupo A)	3	0.4	610	1.9
Streptococcus (sospechoso grupo D)	4	0.5	138	0.4
Vibrio cholerae	1	0.1	6	0.1
V. parahaemolyticus	9	1.2	927	2.8
Yersinia enterocolitica	1	0.1	286	0.9

Datos del C.D.C. (Communicable Disease Center). Annual Summaries.

ras a la temperatura ambiente con refrigeración posterior y recalentamiento.

Durante la cocción de un alimento contaminado, las células vegetativas y las esporas sensibles al calor son destruidas, pero las esporas resistentes sobreviven, y si el alimento se mantiene a una temperatura que favorezca el crecimiento, se incrementará el número de microorganismos dando lugar a un alimento potencialmente tóxico.

En vista de la aparente existencia de 2 tipos de enfermedades causadas por el mismo microorganismo y los frecuentes reportes de B. cereus en una gran variedad de alimentos, se han emprendido recientemente investigaciones para obtener características que puedan usarse para identificar claramente estos microorganismos. Sin embargo, aún no se ha encontrado un método idóneo que permita diferenciar, en diversos alimentos, a B. cereus de otras especies.

Tomando en cuenta la importancia relevante de su determinación es preciso encontrar el método adecuado que permita su aislamiento e identificación en ciertos alimentos procesados.

II.- OBJETIVO.

Este estudio tiene como finalidad establecer las cualidades e inconvenientes de algunos métodos reportados para el aislamiento e identificación de Bacillus cereus en alimentos deshidratados. Así como observar su incidencia para que puede servir como un pequeño aporte a la investigación y al control de calidad en alimentos; tan necesaria en nuestro país.

III.- GENERALIDADES.

1.- CARACTERISTICAS GENERALES.

En la parte No. 15 del Manual de Bergey (1974), correspondiente a bacilos y cocos formadores de esporas, se encuentran las características de la familia Bacillaceae, la cual comprende básicamente 2 grupos: Bacillus, bacilos aerobios o anaerobios facultativos, Gram positivos y Clostridium, bacilos Gram positivos, anaerobios estrictos.

Aunque algunas especies de Bacillus son patógenas -- (Bacillus anthracis y Bacillus cereus) la mayoría no lo son para el hombre y los animales.

La clasificación del género Bacillus, se facilita por la forma y posición diferente de las esporas según la especie. Esta característica permite dividirlo en 3 grupos:

Grupo I : Bacilos formadores de esporas elipsoidales o cilíndricas, las cuales son centrales o terminales que no distienden ni deforman el esporangio. (En este grupo se incluye a B. cereus)

Grupo II : Bacilos de esporas elipsoidales, centrales o terminales con distensión y deformación del esporangio.

Grupo III : Bacilos con esporas esféricas que distienden el esporangio, dando el aspecto de un alfiler. (R. Buttlaux, 1962).

En la Fig. No. 1, se esquematizan los tres grupos del género *Bacillus* y se indican los microorganismos que lo componen.

2.- CARACTERISTICAS DE *Bacillus cereus*.

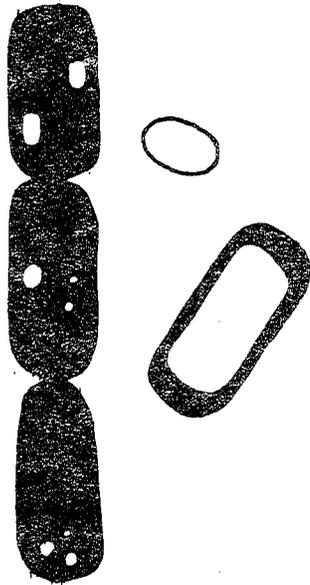
Es un bacilo en forma de cilindro, con una longitud de 3 a 5 micras, con un diámetro de 1 a 1.2 micras, de movilidad variable, puede presentar flagelos peritricos y su reacción al Gram es positiva. Es común encontrarlo en suelo, agua, polvo, aire y en muchos alimentos manufacturados y no procesados.

Es aerobio, sin embargo puede crecer bajo condiciones anaerobias de glucosa o nitratos. La temperatura es otro factor importante en el crecimiento y fluctúa entre 10 y 48 °C, con un óptimo entre 28 y 35°C.

Sus necesidades nutricionales no son complejas, no requiere de vitaminas, pero si de uno o varios aminoácidos.

Usualmente fermenta la glucosa con producción de ácido sin gas, dando como productos: 2,3 butanodiol, acetona, glicerol, CO₂ y ácidos: láctico, succínico, fórmico y acético, con variaciones determinadas por las condiciones. En cambio en la arabinosa, xilosa y manitol no produce fermentación. Esta última característica ha sido usada en

Figura No. 1 . Clasificación del género Bacillus, en base a la forma y posición de las esporas. Microorganismos que lo componen.



B. megaterium

B. cereus

var. mycoides

var. thuringiensis

var. anthracis

B. licheniformis

B. subtilis

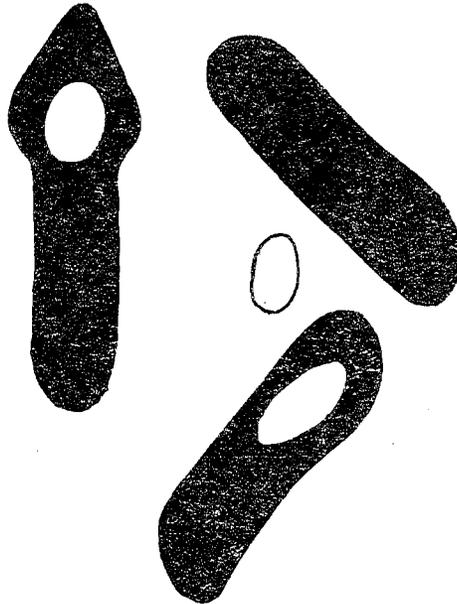
var. atterimus

var. niger

B. pumilus

GRUPO I : Espora central, no deforma el esporangio.

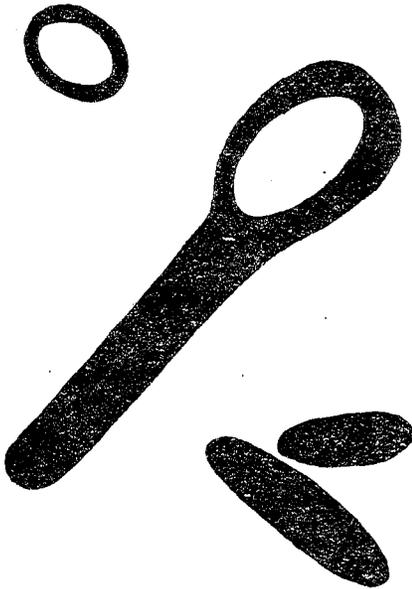
Figura No. 1 . Clasificación del género Bacillus, en base a la forma y posición de las esporas. Microorganismos que lo componen. (Continuación).



- B. polymyxa
- B. macerans.
- B. stearothermophilus
- B. circulans
- B. alvei
- B. laterosporus
- B. pulvificiens
- B. brevis

GRUPO II : Espora subterminal, elipsoidal y con deformación del esporangio

Figura No. 1 . Clasificación del género Bacillus, en base a la forma y posición de las esporas. Microorganismos que lo componen.(Continuación).



B. pantothenicus

B. sphaericus

B. pasteurii

GRUPO III : Espora terminal esférica, deforma el esporangio.

la preparación de un medio específico (MYP agar) para la identificación de B. cereus, utilizándose el azúcar menos sensible al calor, como es el caso del manitol.

Las características bioquímicas del Grupo I son descritas en la Tabla No. 4 y en la Tabla No. 5. Las diferencias entre B. cereus, B. thuringiensis y B. anthracis son para fines de laboratorio indistinguibles, por lo que muchos autores los consideran como variedades de B. cereus. (R. Buttlaux, 1962; Gordon, 1974; Goepfert, 1976).

3.- CARACTERISTICAS DE LA TOXINA.

3.1.- PRODUCCION, PURIFICACION Y SINTESIS.

Entre las toxinas producidas por las bacterias, las más estudiadas han sido las de Clostridium sp. y Staphylococcus sp., por ser las más frecuentemente encontradas en transtornos alimenticios. Sin embargo, últimamente ha cobrado mayor importancia el estudio de otras toxinas como la producida por B. cereus, pero las investigaciones acerca de su composición y mecanismo de acción no son muy claras aún, existiendo mucha controversia acerca de su naturaleza.

La toxina produce diversos efectos biológicos tales como:

- a. La acumulación de fluido en asas ligadas de conejo.

TABLA Nº 4 CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DEL GRUPO I DEL GENERO BACILLUS

MORFOLOGIA		HIDROLISIS				CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS						CRECIMIENTO EN				OTROS		NOMBRE DE LA ESPECIE (Smith, Gordon y Clark, 1952)		
Esperangio y esporas	Diámetro de la célula vegetativa	Almidón	Caseína	Gelatina	Lecitina	Formación de acetoina Reacción VP	Reducción de Nitratos a Nitritos	Catalasa	Utilización de citrato	Formación de ureasa	Ancarobiosis. Gas a partir de Nitritos.	Anacrobiosis. Crecimiento en caldo glucosa	pH en caldo glucosa	Agar nutriente	Agar nutriente glucosado	Agar nitrato glucosado	Agar de soya		Crecimiento en % de NaCl en caldo	Temperatura óptima en °C
Esperangio no distand.	0.9u ó >	+	+	+	-	-	V	+	+	-	-	-	3+	4+	4+	4+		26° a 37°	B. MEGATERIUM	
Espora: oval ó cil., cont. ó terminal. Pared asporal - delgada.		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	3+	4+	-			26° a 37°	B. CEREUS B. CEREUS, var. MYCOIDES B. CEREUS, var. THURINGIENSIS B. CEREUS, var. ANTHRACIS (B. ANTHRACIS)	
Tinción al Gram. positivo	< de 0.9u	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	5.2 a 8.2	3+	3+	1+ o 3+	4+	5% a 8%	32° a 45°	B. LICHENIFORMIS
		+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	5.0 a 8.6	3+	4+	3+	4+	5% a 7%	26° a 45°	B. SUBTILIS B. SUBTILIS, var. ATERRIMUS D. SUBTILIS, var. NIGER
		-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-		2+	2+	1+	3+	5% a 7%	28° a 40°	B. PUMILOS
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	5.0 a 6.2	1+	2+	-	2+	No 5%	33° a 50°	B. COAGULANS
		+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	6.2 a 8.2	2+	-a+	-	-a+	5%	23° a 33°	B. FIRMUS
		+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	8.2 a 9.2	2+	-a+	-	-a+	5%	23° a 33°	B. LENTUS

+ Positivo
± Ligero o limitado
- Negativo
V Variable

1+ Crecimiento claro
2+ Crecimiento moderado
3+ Buen crecimiento

+ Crecimiento positivo a/fermentación de gas

**TABLA Nº 5.- FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS. GENERO BACILLUS.
GRUPO I.**

UTILIZACION DE N AMONICAL.	A Z U C A R E S											ALCOHOLES			O T R O S			Acción en un medio basal conteniendo NH ₄ +Nitrógeno como única fuente de nitrógeno.	Especie
	Glucosa*	Sacarosa*	Lactosa*	Arabinosa*	Xilosa*	Ramnosa	Fructosa	Maltosa	Galactosa	Manosa	Rafinosa	Glicerol	Manitol*	Sorbitol	Salicina	Inulina	Dextrina		
+	A	A	V	UA	UA	-	A	A	UA	A	UA	UA	A	-	A	A	A	Buen crecimiento	B. megaterium
+	A	UA	-	-	-	-	A	A	V	-	-	UA	-	-	UA	-	A	Buen crecimiento	B. cereus
+	A	A	V	A	A	V	A	A	A	A	V	A	A	-	A	V	UA	Buen crecimiento	B. licheniformis
+	A	A	-	A	A	V	A	A	A	A	V	A	A	-	A	V	UA	Buen crecimiento	B. subtilis
+	A	A	-	A	A	-	A	UA	A	A	UA	A	A	-	A	-	V	Buen crecimiento	B. pumilus
±	A	A	UA	V	UA	V	A	A	A	A	A	A	U-	-	A	-	A	Prof. del N. orgán.	B. coagulans
-	SA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.org. necesario para el crecim.	B. firmus
-	SA	-	-	SA	SA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.org. necesario para el crecim.	B. lentus

* CH generalmente usados para la
identificación de rutina.

+ Positivo.

± Ligero.

A Acido solamente.

AG Acido y gas.

UA Usualmente ácido.

SA Ligeramente ácido.

V Variable.

U - Usualmente negativo.

- Negativo.

b. La habilidad de causar reacción necrótica con edema por inyección intradermal en cuyos.

c. Diarrea y manifestación de náusea con arcada bajo administración oral en Monos Rhesus.

Estos efectos se han asociado con las actividades hemolítica, fosfolipolítica y letal de los cultivos filtrados de B. cereus. Los cuales han mostrado actividades biológicas idénticas a la alfa-toxina de C. perfringens, pero existe sin embargo, una marcada diferencia entre ellas, así la toxina alfa de C. perfringens presenta las tres actividades dadas por una sola entidad proteica, mientras que en el caso de B. cereus cada actividad es catalizada por proteínas diferentes.

Mucho se ha investigado acerca de la importancia de factores nutricionales específicos para la síntesis de toxinas microbianas. Así se sabe que, para producir cantidades significantes de toxina de C. perfringens y de C. tetani, sólo se requiere de un medio nutricional apropiado para el crecimiento. En el caso de B. cereus, se han obtenido medios de cultivo que favorecen la síntesis de toxina, pero sin aclarar los factores que afectan su producción. La adición a estos medios de sustancias tales como: aminoácidos, vitaminas, carbohidratos, etc., han demostrado que el crecimiento y la síntesis de toxina no son necesariamente dependientes entre sí.

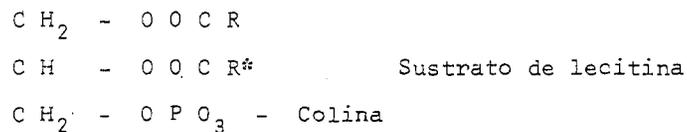
Además de la toxina, B. cereus produce otras sustancias que pueden contribuir a la toxicidad, como es el caso de algunas fosfolipasas y hemolisinas. Estas 3 sustancias se encuentran estrechamente asociadas, siendo difícil su separación por métodos físicos.

Los estudios realizados por Molnar (1962) en columnas de cromatografía, lograron la separación de la toxina en 2 fracciones inactivas, las cuales al ser combinadas mostraban actividad letal. La fosfolipasa fué asociada con solo una de las dos fracciones. Además, se ha observado la presencia de diferentes fosfolipasas en B. cereus, las cuales poseen sensibilidad diferente frente a la tripsina; sólo una de estas fosfolipasas tiene actividad de fosfatasemia y es hemolítica y letal. Johnson y Bonventre (1967), analizaron dicha fosfolipasa, encontrando que se trataba de una fosfolipasa tipo C, ya que libera fosforilcolina y un diglicérido a partir de un sustrato de lecitina (como puede apreciarse en la Fig. No. 2). No se ha encontrado en B. cereus, fosfolipasas del tipo A, B o D.

Bernheimer y Grushoff (1966) estudiaron una potente hemolisina de B. cereus, llamada cereolisina, la cual es una proteína lábil de peso molecular cercano a 52,000. No presenta actividad de fosfolipasa pero es letal cuando se inyecta intravenosamente a ratones.

Algunas de las consideraciones que demuestran que la

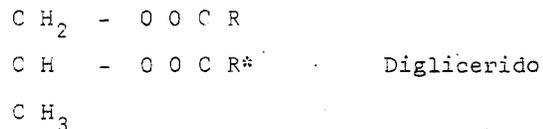
Figura No. 2 : La formación de diglicéridos y fosforilcolina como productos de la interacción enzimática entre la lecitina y la enzima de B. cereus, demostró que la fosfolipasa elaborada durante el crecimiento, es una FOSFOLIPASA tipo C.



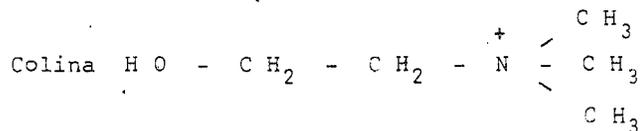
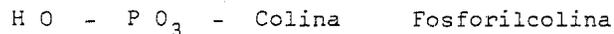
+

Fosfolipasa (Enzima de B. cereus)

↓



+



toxina, la hemolisina y la fosfolipasa son de naturaleza diferente, se describen a continuación:

1. Las tres actividades aparecen simultáneamente en el medio de crecimiento, pero la cinética de síntesis es diferente en todos los casos.

2. Reaccionan en forma diferente cuando se les somete a varios tratamientos:

2.1. Total inactivación de la hemolisina y de la toxina por acción de la tripsina, a diferencia de la fosfolipasa C.

2.2. La fosfolipasa C es relativamente resistente a los efectos de temperatura elevada. A temperaturas de 56°C por 30 min, las actividades hemolítica y letal desaparecen; mientras que a 45°C la hemolisina es totalmente inactivada.

2.3. Inhibición completa de la fosfolipasa C por alcoholes de bajo peso molecular. En tanto, la toxina letal y la hemolisina se ven afectadas parcialmente.

3. La manera que eluyen de la columna de cromatografía (Sephadex G-75) puede indicar que el peso molecular de la hemolisina, toxina y fosfolipasa C, decrece en ese orden. (Johnson y Bonventre, 1967).

Por otra parte, es interesante hacer notar que los cultivos de B. cereus muestran una disminución inicial del pH, seguida por un aumento hacia el rango alcalino.

El primero indica el período de crecimiento vegetativo, en tanto que el punto de aumento marca el comienzo de la esporulación. En este período de transición se alcanza el máximo título de toxina letal. Sin embargo, la síntesis de toxina no es requisito indispensable para la esporulación. Esta puede ocurrir en medios que no reportan cantidades detectables de toxina.

3.2.- TOXICIDAD.

Chu en 1949 encontró que los productos extracelulares de B. cereus daban reacción lipolítica positiva en emulsión de yema de huevo, provocaban lisis a glóbulos rojos, eran dermonecróticos cuando se inyectaban a conejos y cuyos y letales cuando se inyectaban a ratones. Con ello estableció la primera evidencia acerca de la naturaleza tóxica de B. cereus. Se sospechó inicialmente que estas propiedades eran función de un solo producto, sin embargo, los resultados de las investigaciones (expuestas en 3.1.-) han demostrado que la fosfolipasa, la actividad hemolítica y la toxina letal son tres distintos productos extracelulares. Más recientemente Fluor y Ezepechuk(1972), revelaron que la toxina letal exenta de hemolisina y fosfolipasa, produce envenenamiento alimenticio a gatos y fué letal para ratones. Se han encontrado otras sustancias producidas por B. cereus, diferentes a la fosfolipasa

sa y a la hemolisina que pueden inducir acumulación de fluido en asas ileales de conejo y producir reacción necrótica en cuyos. Los agentes responsables de estos efectos pueden ser idénticos a la toxina letal para ratones y ser los causantes del envenenamiento de origen alimenticio en humanos.

Estudios más recientes indican que la hemolisina y la fosfolipasa no son requeridas para una respuesta patológica en varias especies animales, su posible papel como factores auxiliares de virulencia ha sido sugerido por Bonventre y Johnson (Iver y Potter, 1976). Sin embargo se desconoce la contribución de la toxina, de la hemolisina y de la fosfolipasa C a la acción letal o a la patogenia de la enfermedad. La inducción experimental de envenenamiento de origen alimenticio por B. cereus en humanos, ha dado resultados variables aún cuando gran número de microorganismos han sido administrados en el alimento a voluntarios; lo que indica que las condiciones para la producción y la estabilidad de los factores tóxicos son problemáticos.

Existe poca información en cuanto a la producción de hemolisina, fosfolipasa C y toxina letal de B. cereus en alimentos específicos. La mayoría de las investigaciones se han enfocado al estudio de los cultivos filtrados y preparaciones parcialmente purificadas más que a la inves

tigación de estas entidades en el alimento.

Estudios realizados por Prokopova, mostraron que la toxicidad de B. cereus es variable dependiendo de la composición del alimento. (Ivers y Potter, 1976).

Glatz y Goepfert (1976) mencionan, que la enfermedad puede ser causada por la toxina preformada o por la sintetizada por células que se encuentran en el intestino, esto aclararía la diferencia de tiempos observados en ciertos brotes; pero la posibilidad de síntesis de toxina por crecimiento celular en el intestino ha disminuído, ya que se conoce que una cantidad baja de B. cereus generalmente encontrada en muchos alimentos, no puede competir con la flora intestinal normal. Sin embargo, un gran número de microorganismos presentes en alimentos contaminados pueden sobrevivir o crecer suficientemente para producir niveles significativos de toxina. Hasta ahora se ha supuesto que la toxina preformada tiene que ser ingerida en buen estado para provocar síntomas de envenenamiento de origen alimenticio.

IV.- EXPERIMENTACION.

Tomando en cuenta los datos mencionados, se dan las siguientes indicaciones: Bacillus cereus, organismo aerobio, esporulado, Gram positivo, que está presente en suelo, polvo y alimentos, puede provocar intoxicaciones sólamente si está presente en grandes cantidades (del orden de 10^5 /g en alimentos infantiles y 10^7 /g en otros alimentos). Por lo tanto, la investigación de B. cereus no debe ser solamente cualitativa; debe estimarse también en forma cuantitativa.

Para confirmar la presencia de B. cereus se requiere realizar pruebas bioquímicas, serológicas y biológicas. Las principales características de esta bacteria se resumen en la Tabla No. 6.

1.- MATERIAL Y METODOS DE ANALISIS.

1.1.- DESCRIPCION DEL MATERIAL.

- Pipetas estériles de 1 ml graduadas en décimas.
- Pipetas de 10 ml graduadas en décimas, estériles.
- Cajas de Petri estériles.
- Matraces.
- Tubos de 25 X 200 mm secos y estériles.
- Tubos de 16 X 150 mm secos y estériles.
- Asas de cultivo.
- Cuentacolonias.

Tabla No. 6

Principales características de Bacillus cereus.

Características Bioquímicas.:

Actividad de lecitinasa	+
Crecimiento en presencia de polimixina.	+
Actividad fermentativa sobre carbohidratos:	
Glucosa	A
Sacarosa	UA
Glicerina	UA
Salicina	UA
Manitol	-
Xilosa	-
Arabinosa	-
Reducción de nitratos	+
Actividad fermentativa sobre leche tornasolada	+
Hidrólisis de gelatina	+
Hidrólisis de almidón	+
Producción de acetil-metil-carbinol.	+
Catalasa	+

Características Biológicas.:

Acumulación de fluido en asas ligadas de conejo.
 Reacción necrótica con edema en cuyos.
 Diarrea y manifestación de náusea con arcada bajo administración oral en Monos Rhesus.

+ = Positivo.

A = Solamente ácido.

- = Negativo

UA = Usualmente ácido.

Estufa de cultivo.

Baño maría regulable.

Autoclave.

Material para pruebas microbiológicas en general.

1.2.- MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

Agua triptona.

Agar para cuenta en placa.

MYP agar.

KG agar.

Agar de Donovan.

Caldo nutriente.

Caldos carbohidratados rojo de fenol (manitol y glucosa).

Caldo nitratos.

Medio de Voges-Proskauer modificado para B. cereus.

Solución de alfa-naftol.

Solución de potasa al 40%.

Solución de ácido sulfanílico.

Solución de alfa- naftilamina.

1.3.- PRODUCTOS ANALIZADOS.

Los análisis se efectuaron en productos ricos en carbohidratos y proteínas, porque son nutrientes adecuados para el desarrollo de B. cereus, debido a las enzimas amil

lolíticas y proteolíticas presentes en el microorganismo.

La flora microbiana de las harinas y productos afines, pueden tener su origen en el suelo, en el medio ambiente del almacén o en la fase de manipulación y elaboración. Cuando son almacenadas adecuadamente presentan un a_w pequeño, que impide el desarrollo de gran número de microorganismos. En condiciones de a_w favorables, se desarrollan únicamente las bacterias del género Bacillus y algunos mohos.

Los productos lácteos por su carácter altamente nutritivo, están sujetos al ataque de gran número de microorganismos, muchos de los cuales son eliminados en el proceso de pasteurización, sobreviviendo entre otros los bacilos esporulados, los cuales además de ser peligrosos para la salud pueden ocasionar alteraciones en los productos.

De acuerdo a lo anterior, los productos escogidos para investigar la presencia de B. cereus y por ser alimentos dirigidos en su mayor parte, al consumo de niños y lactantes fueron: leche en polvo maternizada, leche en polvo descremada, harina de arroz, harina de soya y hojuelas de papa.

1.4.- TECNICAS DEL ANALISIS.

Se analizaron diez muestras de cada producto, reali-

zadas por duplicado, efectuándose las diluciones correspondientes a cada análisis cuantitativo.

Las pruebas efectuadas en cada alimento fueron:

1.4.1.- Cuantificación de microorganismos aerobios mesófilos, en agar para cuenta en placa (30°C por 72 hrs).

1.4.2.- Cuantificación de esporas de microorganismos aerobios mesófilos, en agar para cuenta en placa (30°C por 72 hrs).

1.4.3.- Cuantificación de esporas de B. cereus, en agar de Donovan, agar de Kim y Goepfert (KG) y el agar de Mossel (MYP). A 30°C por 24 hrs.

1.4.4.- Aislamiento de colonias sospechosas e inoculación en medio sólido (agar nutritivo, 24 hrs a 30°C).

1.4.5.- Pruebas bioquímicas:

1.4.5.1.- Fermentación de carbohidratos: glucosa y manitol.

1.4.5.2.- Medio de Voges-Proskauer modificado para B. cereus.

1.4.5.3.- Reducción de nitratos a nitritos.

1.4.5.4.- Catalasa.

1.4.1.- CUANTIFICACION DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESOFI
LOS.

La determinación de bacterias aerobias mesófilas es uno de los métodos más comúnmente empleados para poner de manifiesto la calidad higiénica de los alimentos.

Medios de cultivo:

Diluyente, se emplea agua triptona de composición:

Triptona	10 g
Cloruro de Sodio	5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver, ajustar a pH 7.0, mezclar y distribuir en tubos de ensayo a razón de 9 ml por tubo. Esterilizar en autoclave durante 15 min. a 121°C.

Agar para cuenta en placa.

Triptona	5.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	12.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los ingredientes, ajustar a pH 7.0 ± 0.1 . -
Esterilizar a 121°C por 15 min, en autoclave.

Procedimiento:

El análisis se efectúa a partir de la serie de diluciones decimales. Con una pipeta estéril de 1 ml, se pone esta cantidad a partir de cada una de las diluciones en

otras tantas cajas de Petri estériles. A continuación se vierten sobre las placas 10 ml del medio de cultivo licuado y enfriado entre 45-50°C. Se mezcla suavemente moviendo la placa 10 veces en un sentido y otras tantas en sentido contrario. Se dejan solidificar y se agregan 5 ml del mismo medio. Las cajas se llevan a incubar en posición invertida a 30°C durante 72 hrs.

Pasado el tiempo de incubación, se cuenta el número de colonias que hayan crecido en el medio, considerando solamente aquellas placas que contengan menos de 300 colonias. El recuento de colonias por gramo se calcula multiplicando el número de colonias contado por el factor de dilución de la placa.

1.4.2.- RECUESTO TOTAL DE ESPORAS AEROBIAS MESOFILAS.

Es la determinación de las formas de resistencia de los microorganismos aerobios mesófilos, los cuales toleran un choque térmico señalado por la elevación de la temperatura a 80°C por 10 min.

Medio de cultivo.

Agar para cuenta en placa. (Ver 1.4.1).

Procedimiento:

La muestra se pasteuriza a 80°C durante 10 min, pasándose luego a un recipiente que contenga agua y cubos de hielo, enfriando hasta 30°C. A partir de la muestra tratada se realizan diluciones decimales y se siembra em-

pleando el agar para cuenta en placa.

La incubación se hace a 30°C durante 72 hrs, después de las cuales se cuentan las colonias y se multiplican por el factor de dilución para obtener el número de colonias por gramo.

1.4.3.- ENUMERACION DE ESPORAS DE B. cereus.

Los medios más empleados para la enumeración de B. cereus, contienen yema de huevo y un antibiótico (polimixina B). De este modo la diferenciación de otras especies de bacilos depende de la detección primaria de la actividad de la fosfolipasa C.

Medios de cultivo.

Agar según Donovan.

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Agar	15 g
Citrato trisódico	5 g
Cloruro de litio	5 g
Agua destilada	1000 ml

Ajustar el pH del medio, de tal forma que después de la esterilización sea de 7.0 ± 0.1 . Esterilizar a 121°C por 15 min. A cada 9 ml de medio estéril y enfriado a 45-50°C, adicionar 1 ml de emulsión de yema de huevo y 500 UI de sulfato de polimixina B.

Agar según Kim y Goepfert (KG agar).

Peptona	10.0	g
Extracto de levadura	0.5	g
Rojo de fenol	0.025	g
Agar	18.0	g
Agua destilada	900.0	ml

Disolver los ingredientes y ajustar el pH a 6.8. Esterilizar a 121°C por 15 min y adicionar por cada 9 ml de medio mantenido entre 45-50°C; 1 ml de emulsión de yema de huevo y 500 U.I. de sulfato de polimixina B.

Agar según Mossel (MYP agar).

Extracto de carne	1.0	g
Peptona	10.0	g
Manitol	10.0	g
Cloruro de sodio	10.0	g
Rojo de fenol	0.025	g
Agar	15.0	g
Agua destilada	900.0	ml

Mezclar los ingredientes. Ajustar el pH a 7.1 ± 0.2 , esterilizar 15 min a 121°C. Enfriar a 45-50°C y adicionar 100 ml de emulsión de yema de huevo y 50,000 U.I. de sulfato de polimixina B.

Emulsión de yema de huevo.

Lavar un huevo fresco con alcohol al 70%. En condiciones asépticas se separa la clara de la yema, colocándo

esta última en un recipiente. Se pesa y se agrega agua destilada en una proporción igual a cuatro veces el peso de la yema. Se agregan unas cuantas esferas de vidrio y se homogeniza. Se conserva en refrigeración y se emplea el mismo día de su preparación.

Sulfato de polimixina B (500,000 U.I.).

Se rehidrata en 100 ml de agua destilada estéril y se guarda en refrigeración para su uso.

Procedimiento:

A partir de la muestra pasterizada a 80°C por 10 min y enfriada a 30°C en agua con hielo, se preparan las diluciones decimales y se vierte 1 ml en otras tantas cajas de Petri estériles. Se adiciona el medio respectivo en cada placa. Se homogeniza el contenido, se deja solidificar y se adiciona una doble capa, se deja enfriar para incubarlas invertidas a 30°C por 24 hrs.

Lectura e interpretación de las placas:

B. cereus produce una reacción fuerte en agar yema de huevo caracterizada por una amplia zona de turbiedad alrededor de la colonia después de 24 hrs de incubación. Con frecuencia estas zonas de turbiedad llegan a coalescer si hay muchos B. cereus presentes y la estimación del número verdadero de colonias se dificulta. Esta situación se desarrolla frecuentemente cuando existen mas de 30 colonias de B. cereus en la placa. Por esta razón el rango

en estos medios está reducido de 3 a 30 colonias, en vez del más comúnmente utilizado de 30 a 300.

1.4.3.1.- AGAR SEGUN DONOVAN.

En este medio, las colonias sospechosas de ser B. cereus son redondas, pequeñas, de color crema, rodeadas de un halo de precipitado denso.

Donovan (1958) diseñó especialmente este medio, para el análisis de leche sin necesidad de un choque térmico previo. Lo formuló a base de extracto de carne-peptona con 2.5% de yema de huevo, con polimixina y cloruro de litio para la inhibición de las bacterias Gram positivas y Gram negativas respectivamente, y citrato trisódico para conseguir una mayor transparencia en el medio, facilitando la diferenciación en la reacción de la yema de huevo.

1.4.3.2.- AGAR SEGUN KIM Y GOEPFERT (KG)▲

El medio de Kim y Goepfert (1971) fué diseñado a manera de promover la esporulación, en un período de incubación corto (24 hrs). La incorporación de bajos niveles de peptona y extracto de levadura dentro del medio basal, favorece la producción de lecitinasa y la formación de esporas libres.

Las colonias típicas de B. cereus son regulares, rodeadas de un halo de precipitado por la acción de la le-

citinasa. Una ventaja adicional de este medio es que ciertos bacilos del grupo II, los cuales producen lecitinasa y pueden aparecer como presuntas colonias positivas en MYP agar, son incapaces de formar lecitinasa bajo las pobres condiciones nutricionales impuestas por el KG agar.

1.4.3.3.- AGAR SEGUN MOSSEL (MYP).

Mossel, Koopman y Jongerius (1967), desarrollaron un agar manitol-yema de huevo-rojo de fenol para la enumeración de formas vegetativas y esporuladas. Tomando en consideración la incapacidad de B. cereus para asimilar la arabinosa, la xilosa y el manitol, formularon el medio de MYP con el último carbohidrato mencionado, por su mayor estabilidad térmica.

Según Kim y Goepfert el uso de una cantidad relativamente alta de peptona en este medio, proporciona los elementos nutricionales adecuados para el crecimiento de las células vegetativas pero no favorece la esporulación.

En MYP, las colonias de B. cereus se presentan de color anaranjado o rosado, redondas y rodeadas de un halo de precipitado,

El número de colonias presentes por gramo de alimento, en cada uno de los medios utilizados (Donovan, KG y MYP agar), se obtiene multiplicando el número de colonias contado por el factor de dilución de la placa.

El aspecto de la colonia típica de B. cereus en los tres medios, se sintetiza en la Tabla No. 7.

1.4.4.- AISLAMIENTO DE COLONIAS.

De las colonias sospechosas de ser B. cereus en MYP, KG y Donovan, se transfiere a un medio sólido para su conservación y microscopía (el medio usado se describe en el punto 1.4.1). Y a un caldo nutritivo para su propagación.

Caldo nutritivo.

Extracto de carne	10 g
Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los ingredientes. Ajustar el pH a 7.5 ± 0.1 y esterilizar por 15 min a 121°C.

1.4.5.- PRUEBAS BIOQUIMICAS.

1.4.5.1.- FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS.

B. cereus se caracteriza por su incapacidad de fermentar el manitol y por la producción de ácido sin gas a partir de glucosa.

Medio.

Caldo carbohidratado rojo de fenol.

Tripticasa ó proteosa-peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Extracto de carne	1 g

Tabla No. 7 : Características de la colonia de B. cereus.

Medios de aislamiento	Características
Agar de Donovan	Colonia redonda pequeña, de color crema, rodeada de un halo de precipitado denso.
KG agar	Colonia amarilla de forma regular, que al crecer en la superficie presenta un color rosado y se encuentra rodeada de un halo de precipitado ligero.
MYP agar	Colonia de color anaranjado o rosado, redonda y rodeada de un halo de precipitado.

Rojo de fenol (Sol. 0.25%)	7.2 ml
Carbohidrato específico (manitol o glucosa)	10.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

Disolver los ingredientes, ajustar el pH a 7.3 ± 0.1 . Se distribuyen en tubos con campana de Durham, se esteriliza 20 min a 115°C .

Procedimiento:

Los tubos inoculados se incuban a 30°C durante 24 hr. Obteniendo un resultado positivo con la aparición de acidez en el caldo, mostrado por el viraje de rojo a amarillo del indicador. Esta prueba permite además, observar la formación de gas por medio de la campana de Durham.

1.4.5.2.- REACCION DE VOGES-PROSKAUER.

Esta reacción es usada para mostrar la capacidad de los cultivos para producir acetil-metil-carbinol (acetoina).

Medio.

Voges-Proskauer modificado para B. cereus.

Proteosa-Peptona	7 g
Glucosa	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los ingredientes, repartir a razón de 5 ml

en tubos de 18 mm. Esterilizar 15 min a 121°C.

Reactivos:

Solución de alfa-naftol.

Alfa-naftol, p.f. 92.5°C	5 g
Alcohol etílico absoluto	100 ml

Preparar la solución cada día. Disolver el naftol en el alcohol.

Solución acuosa de potasa al 40%.

Procedimiento:

El tubo inoculado se encuba a 30°C por 48 hrs. Al término de este tiempo, la reacción de Voges-Proskauer se efectúa con la adición de 0.6 ml de solución de naftol y 0.2 ml de potasa por ml de medio de cultivo.

La aparición de un color rojo indica la presencia de acetilmetilcarbinol.

1.4.5.3.- CALDO NITRATOS.

Esta prueba se utiliza para identificar los organismos que reducen nitratos a nitritos.

Medio.

Caldo nitratos.

Triptona o tripticasa	20 g
Fosfato disódico	2 g
Glucosa	1 g
Agar	1 g

Nitrato potásico	1 g
Agua destilada.	1000 ml

Disolver los ingredientes, distribuir en volúmenes de 5 ml en tubos de 18 mm, esterilizar a 121°C por 15 min.

Si el medio se preparó con dos o más días de anterioridad, deberá hervirse durante 2 min antes de utilizarlo.

Reactivos.

Solución de ácido sulfanílico.

Acido sulfanílico	1 g
Acido acético 5 N	125 ml

Disolver el ácido sulfanílico en ácido acético.

Solución de alfa-naftil-amina.

Alfa naftil-amina	0.5 g
Acido acético 5 N	100.0 ml

Disolver la alfa naftil-amina en el ácido.

Procedimiento:

La prueba se puede hacer tan pronto como se tenga un buen crecimiento (18 a 48 hrs a 30°C).

La investigación de nitritos, procedentes de la reducción de nitratos, se lleva a cabo por adición de ácido sulfanílico y de alfa naftil-amina en cantidades iguales (0.5 a 1.0 ml) a cada tubo. En presencia de nitritos se desarrolla rápidamente un color rojo o rosa y algunas veces se forma un precipitado naranja-amarillento.

1.4.5.4.- CATALASA.

La prueba se realiza a partir de la colonia desarrollada en un medio sólido, la cual se mezcla con agua oxigenada, la formación de burbujas indica una prueba positiva.

2.- PARTE EXPERIMENTAL.

Los productos analizados, como anteriormente se menciona, fueron: hojuelas de papa, leche en polvo descremada, harina de soya, leche en polvo maternizada y harina de arroz.

La cantidad de muestra analizada en cada caso fue de 10 g, lo que permitió obtener una suspensión madre con la adición de 90 ml de diluyente estéril, con una concentración de 0.1 g por ml (sol 10^{-1}).

La muestra así preparada, se coloca en un baño maría regulado a 45-50°C durante 15 min, para activar los microorganismos presentes en el alimento. Esta muestra se divide en dos porciones; una en la que se investiga los microorganismos aerobios mesófilos y la otra en la que se realiza un choque térmico a 80°C por 10 min, con enfriamiento posterior.

La muestra que recibió el choque térmico, se emplea para la determinación de esporas aerobias mesófilas y para la investigación de los B. cereus esporulados.

En la Figura No. 3, se muestra la secuencia del análisis para la determinación de: microorganismos aerobios mesófilos, esporas aerobias mesófilas y esporas de B. cereus.

En la Figura No. 4, se esquematiza los pasos para la identificación de colonias sospechosas de ser B. cereus. La selección de estas colonias se realiza a partir de las placas de KG, MYP y Donovan, se toma un número representativo de colonias y se inoculan en un caldo nutritivo para su propagación y en un medio sólido para su conservación y microscopía.

Una vez desarrollado el microorganismo, se realiza el examen microscópico, si éste indica que se trata de bacilos Gram positivos, en cadenas cortas o largas enmarañadas, con esporas elipsoidales, centrales o subterminales y sin deformación del bacilo, se procede a efectuar las pruebas bioquímicas.

A partir del caldo nutritivo se inoculan: los carbohidratos (glucosa y manitol), el caldo para la reacción de Voges-Proskauer y el caldo nitratos. Los tubos inoculados se incuban a 30°C.

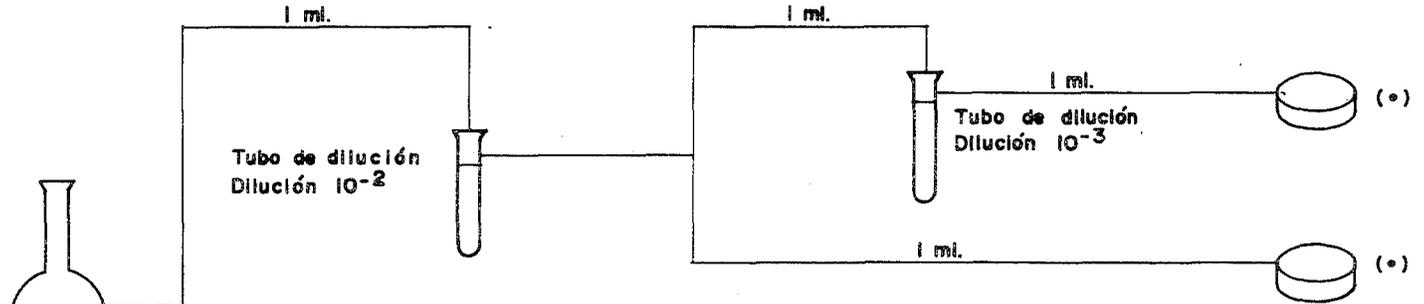
A partir del medio sólido, se realiza la investigación de catalasa.

Las colonias que son positivas a la reacción de Voges-Proskauer, que reducen los nitratos a nitritos, que

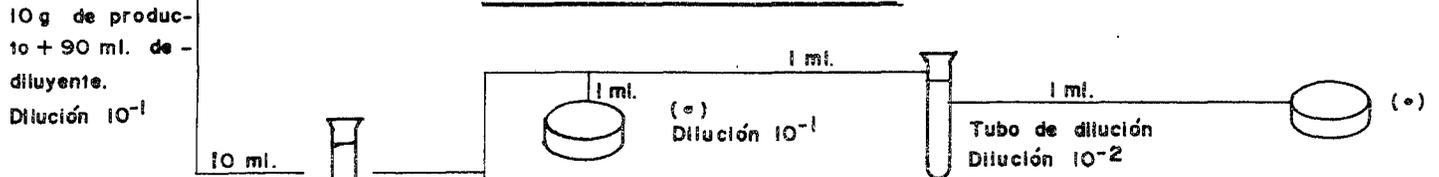
FIGURA Nº 3

ESQUEMA DE LOS ANALISIS EFECTUADOS EN LOS PRODUCTOS ANALIZADOS.

MICROORGANISMOS AEROBIOS MESOFILOS

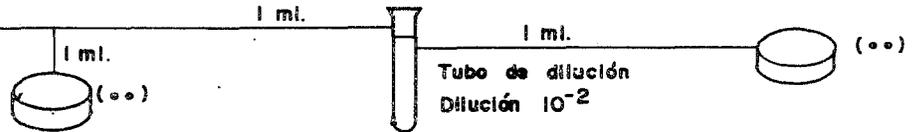


ESPORAS AEROBIAS MESOFILAS



ESPORAS DE BACILLUS CEREUS

Calentamiento a 80°C
por 10' con enfriamiento posterior.

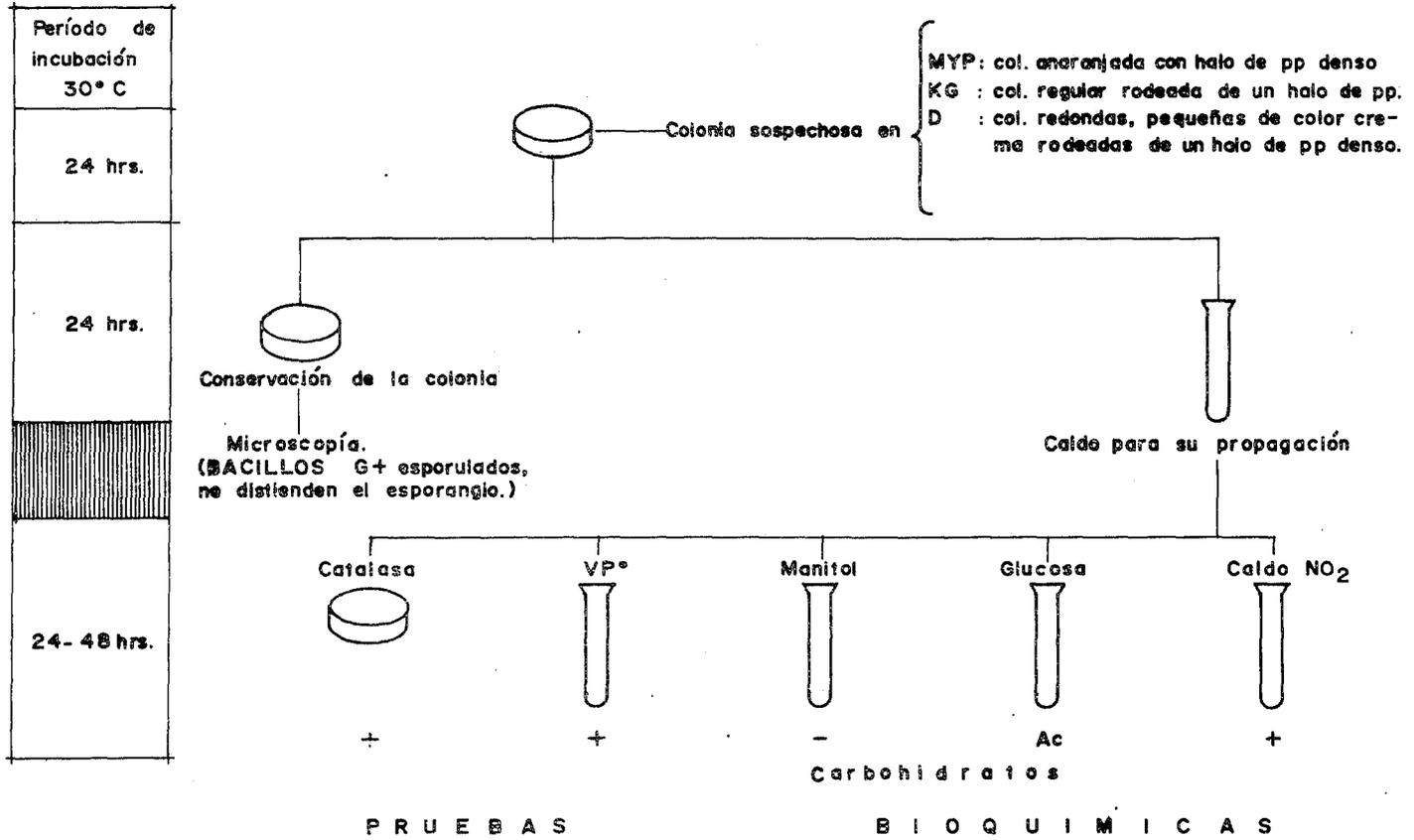


(°) Agar para cuenta en placa.

(°°) Medio selectivo para *Bacillus cereus*.

FIGURA N° 4

PRUEBAS DE IDENTIFICACION DE LA COLONIA SOSPECHOSA DE Bacillus cereus.



° Formación de Acetil-metil-carbinol

fermetan la glucosa sin producción de gas, con catalasa positiva y no fermentan el manitol, son consideradas B. cereus .

Se calcula el número de B. cereus en la muestra de alimento, teniendo en cuenta el porcentaje de colonias como pertenecientes a B. cereus.

V.- RESULTADOS Y DISCUSION.

Básicamente el estudio se enfocó, en la comparación de tres medios que permiten el aislamiento y la cuantificación de Bacillus cereus. Los medios seleccionados fueron: MYP Agar, KG Agar y Agar de Donovan, por haber sido diseñados específicamente para la determinación de este microorganismo. Estos medios se han utilizado en forma individual, no estableciéndose ninguna comparación entre ellos que permita conocer cuál es el idóneo para un producto determinado.

En base a los resultados preliminares fué necesario modificar parámetros y condiciones que impedían la obtención de resultados fidedignos, estos fueron:

1.- Originalmente se analizaron muestras por el método de siembra en superficie, pensando en la facilidad de tomar la colonia para las pruebas bioquímicas subsecuentes. Sin embargo, se observó que las colonias se extienden fácilmente coalesciendo unas con otras, con lo que se dificulta la cuantificación. Este problema es aún más grave en aquellos productos de consistencia espesa, ya que es fácil confundirlos con el crecimiento bacteriano.

2.- Debido a la gran variedad de opiniones acerca del tiempo de incubación de las placas con el medio selectivo para Bacillus cereus entre 16 y 48 hrs (Banwart 1979; Kim y Goepfert 1971), se estableció un lapso de 24 hrs para la

lectura, debido a que a tiempos mayores existe difusión de ácido (MYP Agar) lo que impide la diferenciación. Por otro lado, el incremento de colonias no es significativo para tiempos mayores de 24 hrs.

Las pruebas bioquímicas recomendadas en la literatura (Gordon y Clarck 1968; Mossel 1967; Kim y Goepfert 1971), para establecer la identidad de Bacillus cereus son: Utilización aerobia y anaerobia de glucosa, fermentación de manitol, xilosa, glicerol y salicina, hidrólisis de gelatina, reducción de nitratos a nitritos, fermentación de leche - tornasolada, producción de amilasa, producción de acetil-metil-carbinol en caldo MRVP, crecimiento en 10% de caldo cloruro de sodio y catalasa.

Las pruebas escogidas fueron: utilización aerobia de glucosa y manitol, producción de acetil-metil-carbinol en caldo MRVP modificado para B. cereus, reducción de nitratos a nitritos y catalasa. Estas determinaciones eliminan el mayor número posible de microorganismos de la familia Bacillaceae que pudieran confundirse con B. cereus y presentan sencillez y rapidez en su análisis. Sin embargo, no son lo suficientemente determinantes para asegurar que los microorganismos que den las reacciones esperadas sean ciertamente B. cereus, por lo que su empleo da una orientación, pero es necesario realizar pruebas adicionales.

En cuanto a las muestras de alimentos, se seleccionaron las siguientes: Leche en polvo maternizada, leche en

polvo descremada, hojuelas de papa, harina de arroz y harina de soya, por las razones siguientes:

a) Tomando en cuenta el origen de la materia prima, ya que estos productos pueden ser fácilmente contaminados por microorganismos provenientes del suelo.

b) Considerando la composición química de la papa y las harinas, que al ser ricas en almidones permiten el desarrollo de B. cereus.

c) Tratándose de productos manufacturados, es posible la contaminación de este tipo de microorganismos por un mal manejo.

d) Finalmente, estos alimentos por su composición o fácil preparación, son consumidos en la dieta de niños y ancianos. Por este motivo, es particularmente importante que no presenten contaminaciones debidas a B. cereus.

Para la parte experimental, se analizaron diez muestras corridas por duplicado y empleando dos diluciones para su cuantificación, haciendo un total de 980 análisis.

De las colonias sospechosas de B. cereus obtenidas en cada placa de medio probado, se tomó un número representativo para su identificación por medio de las pruebas bioquímicas elegidas. Todas las colonias que, vistas al microscopio, fueran bacilos Gram positivos y presentaran las reacciones de utilización aerobia de la glucosa y del manitol, positiva y negativa respectivamente y que dieran

la reacción de Voges-Proskauer positiva, presentaran reducción de nitratos a nitritos y catalasa positiva, se consideraron como Bacillus cereus. Y aquellas que presentaran al menos una variante, fueron consideradas como negativas. Al respecto se observó la notable presencia de microorganismos con reacción al Voges-Proskauer negativa en hojuelas de papa y la de microorganismos no reductores de nitratos en harina de soya.

Es conveniente señalar como necesario dentro de los análisis de rutina, el empleo de pruebas serológicas y biológicas para una confirmación y complementación del trabajo, ya que el uso de sueros antigénicos permite la comprobación de que el cultivo es B. cereus, mientras que las pruebas biológicas señalan la posible patogenicidad provocada por la presencia de toxina en el microorganismo encontrado, pero en el presente estudio, desafortunadamente no se contaron con las condiciones adecuadas para su realización.

Los resultados obtenidos en todos los análisis realizados en las leches en polvo maternizada y descremada; en hojuelas de papa y harinas de soya y de arroz, expresados en número de colonias por gramo de alimento se muestran en las tablas No. 8, 9, 10, 11 y 12. A partir de este conjunto de datos, se hicieron los cálculos para determinar la media ponderada, obtenida como se muestra posteriormente,

a manera de lograr un promedio representativo que minimizara los errores que pudieran tenerse en el análisis (diluciones, peso, etc).

En las tablas No. 13, 14, 15, 16 y 17 se mencionan la media ponderada y la proporción que guarda B. cereus con el total de esporas aerobias mesófilas en los diferentes alimentos. En estos datos se aprecia que todos los productos con excepción de la harina de arroz presentan menos del 5% de microorganismos esporulados que son B. cereus. Sin embargo, la calidad higiénica de los productos analizados, dada por los microorganismos aerobios mesófilos, se encuentra dentro de los límites fijados por las normas oficiales establecidas. (Las cuales se muestran en la tabla No. 18). La mayor incidencia de B. cereus en la harina de arroz puede indicar una mayor afinidad del microorganismo por este alimento o un mal manejo del producto o quizá una calidad inferior de la materia prima.

La comparación de los tres medios: MYP Agar, KG Agar y Agar de Donovan, con respecto a la morfología de las colonias, facilidad de aislamiento y/o enumeración, mostró ciertos aspectos cuyas diferencias deben tomarse en consideración, ellos fueron:

1. En el medio de MYP Agar, las colonias de B. cereus presentaban tonos anaranjados a veces ligeramente amari--

llos con halo de precipitado denso por acción de la lecitinasa. Las colonias ligeramente amarillas pueden confundirse con colonias fermentadoras de manitol, sin embargo, con la práctica es fácil su diferenciación.

2. El medio de KG mostró mayor sensibilidad frente a los cambios de pH, virando fácilmente el rojo de fenol al amarillo (reacción ácida), aún con pequeñas partículas de producto. En este medio, la colonia típica de B. cereus apareció de color amarillo, que al crecer en superficie tomó un color rosado, rodeada de un halo ligero de precipitado por acción de la lecitinasa. Sin embargo, en algunas ocasiones, en la placa se desarrollaron manchas amarillas sin colonia aparente, causando confusión. La presencia de un ligero halo en este medio a diferencia del tipo de halo en el MYP Agar, podría explicarse por las condiciones nutricionales pobres del KG Agar.

3. El principal inconveniente que presentó el Agar de Donovan en relación con los dos medios anteriores, es la falta de contraste entre la colonia y el medio, ya que la colonia típica de B. cereus es crema con halo ligeramente denso por acción de la lecitinasa en la yema de huevo. Además mostró un número menor de colonias de B. cereus en todos los alimentos probados.

Observando los análisis estadísticos por media ponderada, la cuenta de B. cereus en los productos anali-

dos, mostró los siguientes resultados:

1. En la leche en polvo maternizada el No. de colonias por gramo de alimento, en los tres medios empleados fué menor de dos. Dando resultados comparables en la - cuantificación: el MYP, el KG y el Donovan.

2. En la leche en polvo descremada los valores obtenidos en el MYP Agar (15 col/g) fueron hasta tres veces más altos que en KG Agar y en el Agar de Donovan.

3. La cuenta de B. cereus en hojuelas de papa fue menor en el Agar de Donovan que en los otros dos medios empleados, cuyos valores fueron comparables.

4. En la harina de arroz tanto el MYP Agar como el Agar de Donovan presentaron más del doble de colonias que en el KG Agar. Además fué el producto que registró la más alta cuenta de B. cereus (116 col/g).

5. El No. de B. cereus encontrado en la harina de soya fué mayor cuando se analizó en el MYP Agar.

En la tabla No. 19 se observa con respecto a los medios de cultivo, que los medios de MYP y KG tienen una - eficiencia de selectividad muy similar y que el medio de Donovan es el más efectivo, ya que las colonias típicas de B. cereus correspondieron a un mayor porcentaje de - identificación positiva que en los otros dos medios señalados. Sin embargo, el aspecto de las colonias en este medio dificulta mucho al analista la selección de las "co-

lonias típicas". En esta tabla también se aprecia el comportamiento diferente de las bacterias aisladas. Así en las hojuelas de papa, se observó una alta proporción de colonias cuya única diferencia con las de B. cereus, fué la reacción de Voges-Proskauer negativa. A su vez, en la harina de soya se observó hasta un 30% de colonias que no reducían los nitratos a nitritos. En la harina de arroz, la proporción de colonias diferentes de B. cereus (Voges-Proskauer y reducción de nitratos a nitritos negativos) fué insignificante.

Tabla No. 8

LECHE EN POLVO DESCREMADA

Resultados expresados en No. de colonias por gramo.

No. Anál.	Microo. Aerobios		Esp. Aerobias		<u>Bacillus cereus</u>					
	Mesófilos		Mesófilas		MYP Agar		KG Agar		Agar de Donovan	
	Diluciones		Diluciones		Diluciones		Diluciones		Diluciones	
	-2	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-1	-2
1	5,200	7,000	210	-	10	<100	40	<100	10	<100
2	8,200	17,000	370	-	10	<100	30	<100	<10	<100
3	1,100	1,000	300	-	<10	<100	20	<100	10	<100
4	1,000	<1,000	490	-	20	<100	<10	<100	10	<100
5	1,000	2,000	850	-	190	100	<10	<100	<10	<100
6	2,000	4,000	940	-	80	<100	<10	<100	30	<100
7	600	3,000	610	-	<10	<100	<10	<100	<10	<100
8	900	2,000	350	-	<10	<100	<10	<100	<10	<100
9	1,600	<1,000	860	-	<10	<100	<10	<100	<10	<100
10	1,700	2,000	610	-	<10	<100	<10	<100	<10	<100
11	<100	<1,000	30	100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
12	<100	<1,000	<10	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
13	200	<1,000	240	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
14	<100	1,000	30	100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
15	700	1,000	180	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
16	100	1,000	170	400	<10	<100	<10	<100	<10	<100
17	100	<1,000	150	100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
18	900	2,000	180	100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
19	100	<1,000	200	300	<10	<100	<10	<100	<10	<100
20	500	<1,000	250	800	<10	<100	<10	<100	<10	<100

Total de análisis: 190

Tabla No. 9

LECHE MATERNIZADA EN POLVO

Resultados expresados en No. de colonias por gramo

No. Anál.	Microo. Aerobios		Esp. Aerobias		<u>Bacillus cereus</u>					
	Mesófilos		Mesófilas		MYP Agar		KG Agar		Agar de Donovan	
	Diluciones		Diluciones		Diluciones		Diluciones		Diluciones	
	-2	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-1	-2
1	100	3,000	100	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
2	<100	<1,000	50	<100	<10	<100	10	<100	<10	<100
3	600	1,000	50	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
4	700	4,000	60	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
5	200	<1,000	130	-	<10	<100	<10	<100	<10	<100
6	200	1,000	140	-	<10	<100	<10	<100	<10	<100
7	<100	<1,000	900	-	<10	<100	20	100	<10	<100
8	<100	<1,000	160	-	<10	<100	<10	<100	<10	<100
9	100	<1,000	40	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
10	100	<1,000	30	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
11	<100	<1,000	<10	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
12	<100	<1,000	20	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
13	200	2,000	10	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
14	100	<1,000	<10	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
15	200	<1,000	20	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
16	<100	<1,000	<10	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
17	<100	<1,000	<10	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
18	1,100	8,000	10	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
19	<100	<1,000	<10	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
20	<100	<1,000	<10	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100

Total de análisis: 196

Tabla No. 10
HOJUELAS DE PAPA

Resultados expresados en No. de colonias por gramo

No. Anál.	Microo. Aerobios		Esp. Aerobias		<u>Bacillus cereus</u>					
	Mesófilos		Mesófilas		MYP Agar		KG Agar		Agar de Donovan	
	Diluciones		Diluciones		Diluciones		Diluciones		Diluciones	
	-2	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-1	-2
1	100	1,000	200	<100	<10	<100	10	<100	<10	<100
2	300	2,000	40	<100	<10	<100	10	<100	10	<100
3	200	1,000	100	100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
4	200	<1,000	80	600	<10	<100	<10	<100	<10	<100
5	100	<1,000	220	<100	30	<100	<10	<100	<10	<100
6	100	<1,000	60	<100	50	100	<10	<100	<10	<100
7	800	<1,000	150	<100	70	<100	40	200	<10	<100
8	500	1,000	180	<100	30	<100	70	<100	<10	<100
9	500	<1,000	20	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
10	300	<1,000	360	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
11	400	<1,000	> 3,000	4,000	<10	<100	50	<100	<10	100
12	300	<1,000	120	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
13	<100	<1,000	80	<100	<10	<100	23	<100	10	<100
14	400	<1,000	80	<100	<10	<100	13	<100	20	<100
15	1,000	1,000	220	300	<10	<100	<10	<100	<10	<100
16	600	1,000	290	900	<10	<100	<10	<100	<10	<100
17	800	6,000	600	300	<10	<100	20	100	<10	<100
18	1,700	5,000	1,800	2,100	10	<100	<10	<100	<10	<100
19	420	<1,000	40	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100
20	100	<1,000	30	<100	<10	<100	<10	<100	<10	<100

Total de Análisis: 200

Tabla No. 11

HARINA DE ARROZ

Resultados expresados en No. de colonias por gramo

No. Anál.	Microo. Aerobios		Esp. Aerobias		<u>Bacillus cereus</u>					
	Mesófilos		Mesófilas		MYP Agar		KG Agar		Agar de Donovan	
	Diluciones		Diluciones		Diluciones		Diluciones		Diluciones	
	-2	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-1	-2
1	>30,000	201,000	230	1,000	>300	150	< 10	<100	120	<100
2	>30,000	212,000	480	900	50	100	< 10	<100	80	100
3	24,800	62,000	-	200	60	300	< 10	<100	50	100
4	10,300	17,000	280	1,300	70	<100	< 10	<100	<10	<100
5	13,200	30,000	380	-	360	800	< 10	<100	20	<100
6	6,700	10,000	500	-	40	220	< 10	<100	40	<100
7	6,000	12,000	460	900	20	<100	< 10	<100	<10	<100
8	12,000	24,000	400	700	30	<100	< 10	<100	50	100
9	2,700	6,000	430	1,300	40	100	< 10	<100	30	<100
10	2,500	10,000	1,540	4,400	100	100	30	100	110	300
11	2,600	6,000	480	300	615	400	>300	1,150	640	400
12	3,000	9,000	1,350	6,700	316	1,000	>300	1,533	330	1,000
13	>30,000	20,000	270	1,700	30	200	35	100	60	100
14	>30,000	24,000	170	900	10	100	>300	200	20	<100
15	1,500	1,000	100	600	80	100	35	100	50	100
16	500	<1,000	260	1,300	10	200	110	<100	30	<100
17	1,200	5,000	2,000	1,400	50	200	60	1,000	80	100
18	5,200	3,000	600	2,700	110	100	>300	<100	200	100
19	700	3,000	100	600	30	100	70	200	30	<100
20	400	7,000	550	3,100	10	<100	>300	<100	<10	100

Total de análisis: 197

Tabla No. 12

HARINA DE SOYA

Resultados expresados en No. de colonias por gramo

No. Anál.	Microo. Aerobios		Esp. Aerobias		<u>Bacillus cereus</u>					
	Mesófilos		Mesófilas		MYP Agar		KG Agar		Agar de Donovan	
	Diluciones		Diluciones		Diluciones		Diluciones		Diluciones	
	-2	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-1	-2
1	1,400	1,000	180	400	<10	<100	< 10	<100	<10	<100
2	700	<1,000	160	100	<10	<100	< 10	<100	10	<100
3	2,000	2,000	1,830	2,900	50	<100	< 10	<100	20	<100
4	800	<1,000	200	300	100	300	< 10	<100	80	100
5	1,100	2,000	250	500	40	<100	< 10	<100	20	<100
6	1,300	<1,000	70	500	50	<100	< 10	<100	<10	<100
7	33,000	41,000	2,430	5,400	10	<100	< 10	<100	<10	<100
8	22,600	58,000	2,330	3,600	<10	<100	< 10	<100	<10	<100
9	6,500	4,000	170	-	<10	<100	< 10	<100	<10	<100
10	1,500	2,000	70	-	<10	<100	< 10	<100	<10	<100
11	> 30,000	36,000	>3,000	8,300	30	<100	20	100	40	<100
12	20,700	38,000	>3,000	7,000	80	<100	20	<100	<10	<100
13	> 30,000	121,000	>3,000	> 30,000	112	200	>300	<100	<10	<100
14	> 30,000	65,000	>3,000	> 30,000	122	<100	>300	266	20	1,020
15	200	3,000	80	400	<10	<100	< 10	<100	<10	<100
16	200	<1,000	300	500	<10	<100	< 10	<100	<10	<100
17	5,500	6,000	>3,000	10,300	60	<100	10	100	30	<100
18	6,500	11,000	>3,000	7,200	10	<100	10	100	10	<100
19	< 100	<1,000	250	100	<10	<100	< 10	<100	<10	<100
20	200	<1,000	180	200	<10	<100	< 10	<100	10	<100

Total de análisis: 198

Cálculo de la media ponderada.

La media ponderada se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Colonias/g de alimento} = \frac{d_1 (c_1 + c_2)}{n_1 + n_2/10}$$

donde:

d_1 es el recíproco de la primera dilución.

c_1 es la suma de la cuenta total de colonias de la primera dilución.

n_1 es el número de muestras correspondientes a la primera dilución.

c_2 es la suma de la cuenta total de colonias de la segunda dilución.

n_2 es el número de muestras correspondientes a la segunda dilución.

Tabla No. 13 : Media ponderada de los análisis efectuados en la
 LECHE MATERNIZADA EN POLVO

Análisis	Media ponderada col/g	% <u>B. cereus</u> en relación a las esporas aer.mesófilas
Microorg. aerobios mesófilos	250.00	
Esporas aerobias mesófilas	79.62	
<u>Bacillus cereus</u> :		
MYP	neg.	neg.
KG	1.81	2.27
D	neg.	neg.

La cuenta de B. cereus fué comparable en los medios de MYP, KG y D
 (neg.) Medios donde no hubo desarrollo de colonia

Tabla No. 14 : Media ponderada de los análisis efectuados en la
 LECHE EN POLVO DESCREMADA

Análisis	Media ponderada col/g	% <u>B. cereus</u> en relación a las esporas aer.mesófilas
Microorg. aerobios mesófilos	1,372.72	
Esporas aerobias mesófilas	343.33	
<u>Bacillus cereus:</u>		
MYP	14.54	4.23
KG	4.09	1.23
D	2.72	0.79

La cuenta más alta de B. cereus se registró en el medio de MYP

Tabla No. 15 : Media ponderada de los análisis efectuados en las
HOJUELAS DE PAPA

Análisis	Media ponderada col/g	% <u>B. cereus</u> en relación a las esporas aer.mesófilas
Microorg. aerobios mesófilos	473.63	
Esporas aerobias mesófilas	261.90	
<u>Bacillus cereus:</u>		
MYP	9.09	3.47
KG	12.09	4.61
D	2.27	0.86

La cuenta de B. cereus fué comparable en los medios de MYP y KG

Tabla No. 16 : Media ponderada de los análisis efectuados en la
HARINA DE ARROZ

Análisis	Media ponderada col/g	% <u>B. cereus</u> en relación a las esporas aer.mesófilas
Microorg. aerobios mesófilos	8,827.70	
Esporas aerobias mesófilas	652.88	
<u>Bacillus cereus</u> :		
MYP	116.57	17.85
KG	45.76	7.00
D	99.54	15.24

La cuenta de B. cereus fué comparable en los medios de MYP y D

Tabla No. 17 : Media ponderada de los análisis efectuados en la
HARINA DE SOYA

Análisis	Media ponderada col/g	% <u>B. cereus</u> en relación a las esporas aer.mesófilas
Microorg. aerobios mesófilos	7,536.84	
Esporas aerobias mesófilas	850.84	
<u>Bacillus cereus</u> :		
MYP	32.45	3.81
KG	5.83	0.68
D	16.00	1.88

La cuenta más alta de B. cereus se registró en el medio de MYP

Tabla No. 18

NORMAS OFICIALES MEXICANAS

Norma No.	Producto	Microorganismos Aerobios Mesófilos por g.
NOM-F-335-S-1979	Harina de arroz	10,000 máx.
DGN-F-26-1971	Leche en polvo descremada	150,000
DGN-F-218-1971	Leche en polvo maternizada	15,000

Nota:

Se omiten las normas correpondientes a la harina de soya y a la de hojuelas de papa, que no aparecen en el Indice General de Normas Oficiales Mexicanas de la Dirección General de Normas.

Tabla No. 19 : Número de colonias de B. cereus por cada 100 colonias desarrolladas en los medios selectivos.

Producto	Medio selectivo	col.de B.cereus	col.de microorg. NO ₃ neg	col.de microorg. V.P.neg	Otras col.
Hojuelas de papa	MYP	42.5	5.00	52.50	---
	KG	31.5	7.89	60.52	---
	D	70.0	20.00	10.00	---
Harina de arroz	MYP	85.89	3.84	2.56	7.70
	KG	84.48	8.62	1.72	5.18
	D	95.23	2.38	2.38	---
Harina de soya	MYP	65.90	25.00	---	9.09
	KG	68.50	22.85	---	8.57
	D	66.66	30.00	---	3.33

Los valores de la leche maternizada en polvo y de la leche en polvo descremada, se omiten debido al bajo número de B.cereus encontrado.

VI.- CONCLUSIONES.

Considerando el objetivo de este estudio, se determinó en base a los resultados obtenidos, que el medio de cultivo más adecuado para el aislamiento e identificación de B. cereus en los alimentos analizados fué el MYP Agar, en comparación con el KG Agar y el Agar de Donovan, por las razones siguientes:

1. Clara diferenciación de la colonia típica de B. cereus de otros microorganismos. A saber: colonia anaranjada redonda, rodeada de un halo de precipitado denso, bien definido.

2. Contraste perfectamente marcado entre colonia y medio de cultivo.

3. Selectividad menor en algunos casos que la del Agar de Donovan, pero los valores obtenidos en el MYP Agar indican un mayor número de colonias de B. cereus (leche en polvo descremada, harina de soya y harina de arroz), o en su defecto similar (leche en polvo maternizada y hojuelas de papa) a los demás medios probados.

La proporción de B. cereus encontrada en los alimentos analizados fué bajo, a excepción de la harina de arroz donde el número de colonias encontradas excede de 100 por gramo de alimento. Este valor es de consideración, ya que representa un riesgo potencial para la salud, sobre todo si se considera que el producto va destinado a la población infantil y se suele dar a personas con trastornos gastro-

intestinales para controlar la diarrea. Aunque los microorganismos no son peligrosos cuando se ingieren en pequeño número, es necesaria una medida de control primaria para la prevención de la germinación de esporas de B. cereus y la subsecuente multiplicación de las células vegetativas en los alimentos preparados.

Bacillus cereus es un microorganismo al que no se le ha dado la importancia que debiera, su presencia en los alimentos es inevitable y cada vez se tiene más conocimiento acerca de su toxicidad, por lo que es urgente tomar medidas que restrinjan su presencia en estos alimentos, - sobretodo en aquellos dirigidos a la población infantil.

Es indispensable el establecimiento de normas que limiten la presencia de B. cereus a cantidades que no sean peligrosas para la salud.

Consideramos de gran interés la ampliación del estudio, utilizando pruebas serológicas para la absoluta identificación de B. cereus: Así como, la realización de -- pruebas biológicas para comprobar la enteropatogenicidad del microorganismo.

VII.- BIBLIOGRAFIA.

BANWART, G.J. Basic Food Microbiology. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut. pp: 325-327; 1979.

BERNHEIMER, A.W; GRUSHOFF, P.J. Cereolysin: Production, Purification and Partial Characterization. Gen. Microbiol., 46: 143-150; 1967.

BONVENTRE, P.F; JOHNSON, C.E. Bacillus cereus Toxin.En Microbial Toxins. Vol.III. T.C.Montie, S. Kadis, S.J.Ajl. - Academic Press, New York. Capt. 10, pp: 415-435; 1970.

BONVENTRE, P.F; JOHNSON, C.E. Lethal Toxin of Bacillus cereus. J. of Bacteriology, 94(2) 306-316; 1967.

BUTTLAUX, R; BEERENS, H; TACQUET, A. Manuel de Technique Bactériologiques. Editions Médicales Flammarion. Capt. 12. pp: 367-374, 1962.

DONOVAN, K.O. A Selective Medium for Bacillus cereus in Milk. J. Appl. Bact., 21(1) 100-103; 1958.

GIBSON, T; GORDON, R.E. Endospore-Forming Rods and Cocci, en: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th.Edition Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland. pp 529-550,1974.

GILBERT, R.J; TAYLOR, A.J. Bacillus cereus.Food Poisoning: A Provisional Serotyping Scheme. J. Med. Microbiol. 3: 543-550; 1975.

Goepfert, H.M; KIM, H.U. Enumeration and Identification of Bacillus cereus in Foods. Applied Microbiology 22(2) 581-587; 1971.

GOEPFERT, J.M; SPIRA, W.M. Bacillus cereus-Induced Fluid Accumulation in Rabbit Ileal Loops. Applied Microbiology. - 24(3) 341-348; 1972.

GOEPFERT, J.M; SPIRA, W.M. Biological Characteristics of an Enterotoxin Produced by Bacillus cereus. Can. J. Microbiol. 21: 1236-1246; 1975.

GOEPFERT, J.M. Bacillus cereus, en: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. APHA. Capt. 33 pp: 417-423; 1976.

GORDON, R. E. The genus Bacillus, en Handbook of Microbiology. Laskin and Lechevalier. Condensed Edth. CRC.Press. pp. 65-82; 1974.

GORINA, L. G; FLUER, F.S.; OLOVNIKOV, A.M. and EZEPCUK, YU. V. Use of the Aggregate-Hemagglutination Technique for Determining Exo-Enterotoxin of Bacillus cereus. Applied Microbiology. 29(2)201-204; 1975.

IVERS, J.T.; POTTER, N.N. Production and Stability of Hemolysin, Phospholipase C, and Lethal Toxin of Bacillus cereus in Foods. Journal of Food Protection. 40(1) 17-22;1977.

MOLNAR, D.M. Separation of the Toxin of Bacillus cereus into Two Components and Non-Identity of the Toxin with Phospholipase. J. Bacteriol. 84: 147-153; 1962.

MORTIMER, P.R. Food-Poisoning Episodes Associated with Bacillus cereus in Fried Rice. The Lancet, 25:1043-1045;1974.

MOSEL, D.A.A.; KOOPMAN, M.J.; JONGERIUS, E. Enumeration of Bacillus cereus in foods. Applied Microbiology, 15(3)650-653; 1967.

NATIONAL CANNER ASSOCIATION. Laboratory Manual for Food Canners and Processors. AVI. 1: 142-160; 1968.

THATCHER, F.S.; CLARK, D.S. Análisis Microbiológico de los Alimentos. pp. 168-172; 3-6; 1972.



Impresiones "ARIES"

COLOMBIA NUM. 2 ALTOS 2

(ESO. CON BRASILI)

MEXICO 1, D. F.

5-26-04-72 5-29-11-19