

CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE MESÓFILOS AEROBIOS Y COLIFORMES EN ARROZ COCIDO¹

Martha de Von Chong²; Rito Herrera³; Gloria Jaime⁴; Katia Navas⁴

RESUMEN

Bacillus cereus es una bacteria esporoformadora que se encuentra comúnmente en cantidades pequeñas en algunos alimentos como el arroz. Sin embargo, después del cocimiento, en ciertas condiciones inadecuadas de enfriamiento y refrigeración, las esporas sobrevivientes pueden reproducirse rápidamente y producir enterotoxinas, convirtiendo al alimento en potencial causa de intoxicación alimenticia. En el presente estudio se utilizaron muestras de arroz cocido, las cuales fueron recolectadas en cuatro fondas (venta de comida) distintas: dos en el distrito de Penonomé y dos en el distrito de Aguadulce, provincia de Coclé, durante cinco semanas, determinando la presencia de *Bacillus cereus* en este alimento. Para la confirmación de las colonias sospechosas, se realizaron distintas pruebas bioquímicas de confirmación, tales como: API 50 CH y API 20 E), siembra de las colonias sospechosas en agar sangre y pruebas de catalasa y oxidasa; obteniendo resultados positivos en cada una de ellas. Además de evaluar el crecimiento en agar selectivo MYP para este patógeno, se contemplaron microorganismos indicadores como Mesófilos aerobios, *E. coli* y Coliformes, obteniendo resultados para *Bacillus cereus* por encima de los parámetros establecidos en la norma peruana R/M N°615 (2003)-SA/DM, pero por debajo de los niveles que pueden causar intoxicación alimentaria. Para Mesófilos aerobios el recuento obtenido resultó por debajo de los límites máximos de aceptación que establece la norma NTS No. 071 MINSA/DGSA-V.01 (2008), para el caso de *E. coli*/Coliformes no se observó crecimiento en ninguna de las muestras.

Palabras claves: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, patógeno, enterotoxina, pruebas bioquímicas.

¹Recepción: 25 de julio de 2022. Aceptación: 10 de septiembre de 2022. Financiamiento Universidad de Panamá-Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP).

²Universidad de Panamá, Centro Regional Universitario de Coclé. M.Sc. Microbiología.

e-mail: martha.chaves@up.ac.pa <https://orcid.org/0000-0002-1087-4196>

³IDIAP. Centro de Innovación Agropecuaria en Recursos Genéticos. Ph.D. Microbiología.

e-mail: rito.herrera@up.ac.pa <https://orcid.org/0000-0003-2509-0391>

⁴Universidad de Panamá, Centro Regional Universitario de Coclé. Lic. Tec. Alimentos. Universidad de Panamá Gloria Jaime <https://orcid.org/0000-0003-2537-3551>; Kathia Navas <https://orcid.org/0000-0002-3744-6343>



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF AEROBIC MESOPHILES AND COLIFORMS IN COOKED RICE

ABSTRACT

Bacillus cereus is a sporiform bacteria commonly found in small amounts in some foods such as rice. However, after cooking, under certain inadequate cooling and refrigeration conditions, the surviving spores can rapidly reproduce and produce enterotoxins, making the food a potential cause of food poisoning. In the present study, samples of cooked rice were collected in four different food sale kiosk: two in the district of Penonome and two in the district of Aguadulce, Coclé province, for five weeks, determining the presence of *Bacillus cereus* in this food. For the confirmation of the suspicious colonies, different biochemical confirmatory tests were carried out such as API 50 CH and API 20 E, sowing of the suspicious colonies on blood agar and the catalase and oxidase tests; obtaining positive results in each one of them. In addition to evaluating the growth of this pathogen in MYP selective agar for it, indicator microorganisms such as aerobic Mesophiles, *E. coli* and Coliforms were considered, obtaining results for *Bacillus cereus* above the parameters established in the Peruvian Standard R/M N°615 (2003)-SA/DM, but below levels that can cause food poisoning. For aerobic Mesophiles, the count obtained was below the maximum acceptance limits established by the NTS No. 071 MINSA/DGSA-V.01 (2008), for the case of *E. coli*/Coliforms, growth was not amplified in any of the samples.

Key words: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, pathogen, enterotoxin, biochemical tests.

INTRODUCCIÓN

Existe, a nivel internacional, una gran demanda de consumo de alimentos; incluyendo platos preparados en restaurantes, fondas y lugares de comida rápida, lo que significa un cambio importante en la conducta alimentaria de la población. Esto conlleva a las autoridades sanitarias a una mayor vigilancia epidemiológica de los mismos para garantizar su inocuidad.

Según el Decreto Ejecutivo No. 157, publicado el 1 de junio de 2004, en Gaceta Oficial 25062, Que establece los requisitos para el control sanitario de la manipulación, preparación y expendio de alimento en las fondas, kioscos y ventas ambulantes, y dicta otras disposiciones, en su capítulo I, De las Disposiciones Preliminares, se define el concepto de fonda como establecimiento de alimentos, transitorio o permanente, donde se manipulan, preparan y expenden comidas y bebidas, que cuenten con todas las facilidades sanitarias y de seguridad necesarias para esta actividad.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Según el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA], 2006; el arroz es el cereal más cultivado en el mundo y el segundo de mayor consumo después del trigo. El gran consumo de este grano a nivel mundial es uno de los factores que favorece su implicación en brotes de origen alimentario.

La Encuesta de Niveles de Vida realizada por el Instituto Nacional de Estadística y Censo (INEC) de la Contraloría General de la República, en el 2008 reporta que, en Panamá, el arroz es el producto más consumido dentro de la canasta básica, y el consumo per cápita se calcula en 158 g promedio.

Dentro de los grupos de microorganismos indicadores de la alteración y de la calidad higiénica del arroz podemos mencionar a las bacterias: mesófilos aerobios, Coliformes totales, *Escherichia coli* y uno de los patógenos más importantes encontrados en este alimento es el *Bacillus cereus*.

El *Bacillus cereus* es una bacteria Gram positiva, esporulada, que se encuentra principalmente en el suelo. Esta bacteria puede causar dos tipos de enfermedades gastrointestinales, conocidos como síndromes diarreicos y eméticos, los cuales resultan de la producción de toxinas. El síndrome diarreico se asocia a menudo con alimentos que contienen carne, hortalizas, salsas y productos lácteos y el síndrome emético es el comúnmente asociado con el consumo de arroz y alimentos farináceos (Sánchez et al., 2016).

Se sabe que *B. cereus* es un agente patógeno causante de intoxicaciones alimentarias y que su patogenia se basa en la lisis de las células del tubo digestivo y en la posterior liberación de la toxina que ocasiona la diarrea, lo cual agudiza el cuadro clínico y representa un riesgo para la salud. Los alimentos crudos de origen vegetal son la mayor fuente de *B. cereus*, organismo que se ha encontrado en vegetales, cereales y derivados (especialmente arroz), especias, leche cruda y pasteurizada, derivados lácteos, carnes crudas y sus derivados, entre otros (Forero et al., 2018).

De acuerdo con estudios realizados en arroz cocido por Finlay et al. (2002), las cepas responsables del síndrome emético tienen una temperatura mínima de 15° C en alimentos; considerando un rango para la producción de esta toxina entre 15° C y 40° C



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

debido a que las cepas productoras de la misma no germinan a temperaturas inferiores de 15° C. En cuanto a las cepas diarreicas se reportan que la mayoría (72%) tienen como temperatura mínima de crecimiento 7° C (Pielaat et al., 2005).

Algunos países que han realizado estudios sobre este patógeno han encontrado que el mismo es un agente etiológico frecuente en intoxicaciones alimentarias (Granum, 2002), principalmente en arroz consumido en restaurantes, fondas, locales de comida rápida, tiendas ambulantes de comida, entre otros.

En esta investigación se caracterizó microbiológicamente mesófilos aerobios, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Bacillus cereus* en diferentes muestras de arroz cocido, recolectadas en la prov. de Coclé, con el principal objetivo de determinar la prevalencia del *Bacillus cereus* en arroz cocido mantenido a 30° C, considerando el hecho de que las esporas de este resisten a las temperaturas cocción; en cuanto a la cuantificación de mesófilos aerobios, coliformes y *Escherichia coli*, esta se realizó debido a que son microorganismos indicadores de la calidad microbiológica del alimento.

Es importante mencionar que la calidad bacteriológica del arroz cocido depende de muchos factores: la forma de prepararlo, la calidad de los ingredientes, la manipulación y su conservación posterior. Si no se aplican las buenas prácticas de manufactura durante su elaboración, una adecuada conservación y almacenamiento, es probable que se presente la proliferación de microorganismos, que pueden causar distintas enfermedades gastrointestinales o intoxicaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

Este estudio se realizó en las instalaciones del laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencia Naturales, Exactas y Tecnología del Centro Regional de Coclé (CRU de Coclé), Universidad de Panamá, durante los meses de junio a agosto del 2019, en lo que corresponde a la parte experimental.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Muestreo

Para el análisis se seleccionaron al azar cuatro establecimientos de expendio de comida, específicamente “fondas”, dos en el distrito de Penonomé y dos en el distrito de Aguadulce. Estos establecimientos se encontraban en calles de la avenida central, eran semi-abiertos y dos de ellas no contaban con baño maría, específicamente, la fonda No. 2 del distrito de Penonomé y la fonda No. 1 de Aguadulce. Para cada distrito se le asignó un día de muestreo, siendo lunes para Penonomé y miércoles para Aguadulce, durante cinco semanas.

En cada fonda se compraron muestras de arroz cocido recién preparado (30 minutos después de su cocción aproximadamente), en horario de 10:30 a.m. – 11:00 a.m.; a las cuales se les denominó F1 y F2; para ser debidamente transportadas en envases, al Laboratorio de Microbiología del CRU de Coclé, en donde se atemperaron a 50° C en baño María, para brindarle las condiciones óptimas de desarrollo del *Bacillus cereus* y de los otros microorganismos en estudio. Se seleccionaron tres porciones de cada muestra, para ser analizadas en tres etapas, al llegar al laboratorio: 0 horas y posteriormente a las 4 y a las 8 horas de la compra. En el caso de Mesófilos aerobios y *E. coli*, Coliformes, el diseño muestral solo fue realizado a las 0 horas, se incubaron a temperatura de 37° C; con la excepción, en el caso de *B. cereus* que se recomienda a 30° C y monitoreadas a las 0, 4 y 8 horas (Pérez Portuondo et al., 2011).

Análisis Microbiológico

Mesófilos aerobios, *E. coli* y Coliformes

Para el análisis de Mesófilos aerobios, *E. coli* y Coliformes se utilizó la técnica de inoculación en placas petrifilm, (Guía de interpretación 3M Petrifilm®, 2012).

Bacillus cereus

En el análisis de *Bacillus cereus* se empleó el método de siembra por esparcido en placas con agar MYP un medio de cultivo selectivo (International Standard ISO 7932, 2004).

Preparación del homogenizado y Diluciones

Análisis de Mesófilos aerobios, *E. coli* y Coliformes

Se tomó una muestra por establecimiento, una de la fonda 1 (F1) y otra de la fonda 2 (F2) (dos muestras en total para cada distrito respectivamente). Se pesaron 25 g de cada



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

muestra (arroz cocido) y se homogenizaron en un MASON con 225 ml de peptona al 0,1%, por 15 minutos, para una dilución 1:10.

Preparación del agua peptonada: para preparar el agua peptonada al 0,1% se pesó 1 g de la peptona y se agregó en 1000 ml de agua destilada. Se realizaron diluciones a partir de 1:10 10^{-1} y 1:100 10^{-2} . Se sembraron por triplicado 1 ml de las diluciones correspondientes de 10^1 y 10^2 en placas 3M Petrifilm® RAC para Mesófilos aerobios y 3M Petrifilm® EC para *E. coli* y Coliformes. Se incubaron a 37° C por 24 horas y 48 horas para su crecimiento. Pasadas las 24 horas de incubación se procedió a contar en placas petrifilm para Mesófilos aerobios, con un contador de colonias estándar; todas las colonias que presentaban coloración rojo y azul (Guía de interpretación 3M Petrifilm® RAC y EC, 2012).

De igual manera, se cuantificó las Coliformes a las 24 horas de incubadas, aquellas colonias rojas y azules con gas se consideraban positivas. Las *E. coli*. se cuantificaron a las 48 horas; las colonias positivas para *E. coli*. debían ser azules con gas (Guía de interpretación 3M Petrifilm® RAC y EC, 2012).

Análisis de *Bacillus cereus*

Para preparar el agua peptonada al 0,1% se pesó 1 g de la peptona y se agregó en 1000 ml de agua destilada. Preparación del agar MYP (Agar Polimixina-yema de huevo-Manitol). Se preparó siguiendo las recomendaciones de etiquetado de este, de la siguiente manera: se pesaron 23 g del agar base MYP y se suspendieron en 450 ml de agua destilada. Luego se calentó con frecuente agitación durante 3 minutos aproximadamente, hasta disolver todo el medio. Posteriormente, se esterilizó en autoclave a 121° C por 15 minutos, para luego ser enfriado a 50° C en baño maría. Finalmente, se suplementó asépticamente con 25 ml de emulsión yema de huevo y 5 ml de Polimixina B de 50 000 UI (Unidades internacionales). Se tomó una muestra por establecimiento, una de la fonda 1 (F1) y otra de la fonda 2 (F2) dos muestras en total para cada distrito, respectivamente. Se pesaron 25 g de cada muestra (arroz cocido) y se homogenizaron en un MASON con 225 ml de peptona al 0,1%, por 15 minutos, para una dilución 1:10. De la muestra madre 10^{-1} , se prepararon diluciones de 1:100 10^{-2} y 1:1000 10^{-3} y se sembraron por triplicado 0,1 ml de cada una, en platos con agar selectivo MYP, utilizando la técnica de esparcido por superficie con espátulas de Divansky. Luego se incubaron a 30° C por 48 horas.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Pasadas las 48 horas de incubación se realizó el recuento en platos que tuvieran menos de 150 colonias típicas: grandes, de color rosa, con halo de precipitación (International Standard ISO 7932, 2004).

Identificación de *Bacillus cereus*

Una vez establecidos los crecimientos de colonias de *Bacillus cereus* en agar MYP se procedió a realizar pruebas de oxidasa y catalasa, prueba de hemólisis y confirmación con API 50 CH y API 20E (BioMérieux® SA, 2005). La temperatura fue medida en cada muestra inmediatamente después de haberla comprado.

Análisis estadístico

Todos los análisis se llevaron a cabo mediante los programas JMP 13.0. y Excel 2016. Se realizaron los cálculos básicos de determinación de valores de tendencia central, y de dispersión, análisis de frecuencia, varianza, tablas de resumen de resultados y graficas de tipo barra, dispersión y control. Se aplicó a los resultados y sus variables la prueba de Wilcoxon, prueba de Wilcoxon y Kruskal-Wallis, prueba de Chi cuadrado y regresión logística.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis microbiológico

Recuento de Mesófilos aerobios para fonda 1- Penonomé.

El crecimiento microbiano para la fonda 1 de Penonomé en la primera semana presentaron un elevado crecimiento (Figura 1), por lo cual se consideraron MNPC (Muy numeroso para contar); para la semana dos el recuento promedio fue de 4200 ufc/g (unidades formadoras de colonias por gramo), siendo el máximo 10000 ufc/g y los mínimos 1800 ufc/g y 900 ufc/g. La semana tres, presento un crecimiento promedio de 6700 ufc/g, siendo el valor máximo 10 000 ufc/g y el valor mínimo de 900 ufc/g. Para la semana cuatro, el crecimiento microbiano desciende a un valor promedio de 200 ufc/g, siendo el valor máximo 400 ufc/g, y el mínimo 100 ufc/g. Para la última semana, el promedio de colonias fue de 400 ufc/g, teniendo como los valores máximos y mínimos 700 ufc/g, y 100 ufc/g, respectivamente. En general, el valor promedio en que se mantuvieron las colonias fue de 3700 ufc/g durante las cinco semanas.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

La mayoría de los resultados obtenidos durante las cinco semanas cumplen con la norma NTS No, 071 MINSA/DIGESA-V.01 (2008), para alimentos listos para el consumo, debido a que todos los datos se encuentran por debajo del límite máximo permisible, el cual es de 100 000 ufc/g.

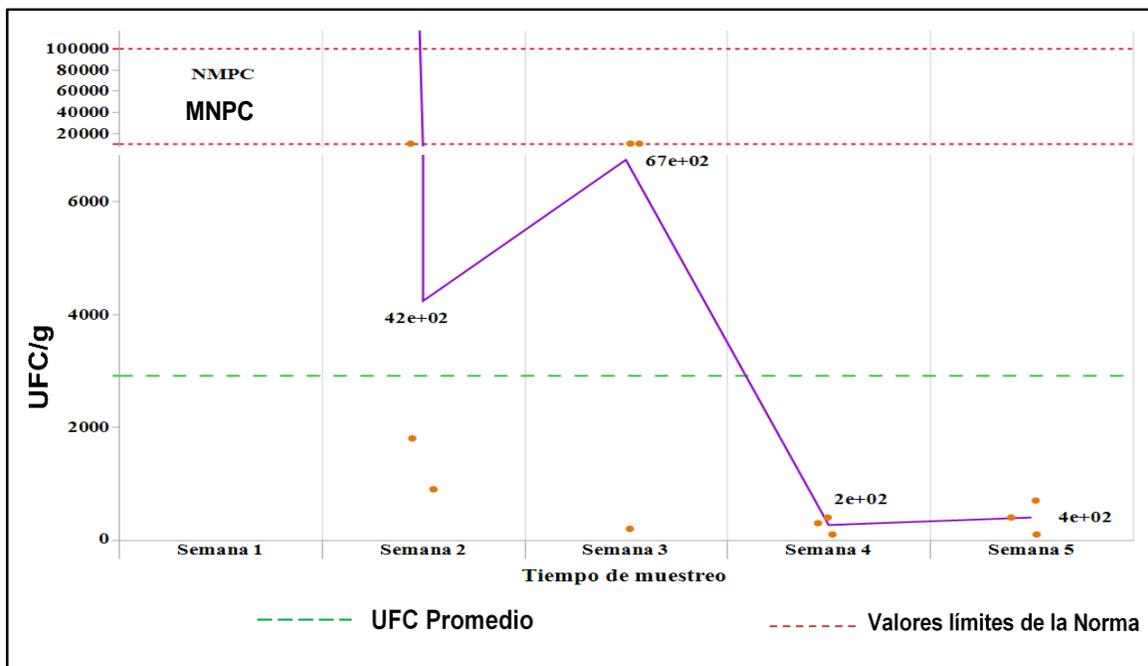


Figura 1. Recuento de Mesófilos aerobios de la Fonda 1-Penonomé durante las cinco semanas de muestreo.

Recuento de Mesófilos aerobios para fonda 2-Penonomé.

La primera semana, al igual que la fonda anterior, presentó un elevado crecimiento de Mesófilos aerobios (MNPC), para la segunda semana el crecimiento promedio fue 13600 ufc/g, siendo los valores máximos 18000 ufc/g el mínimo 9000 ufc/g (Figura 2). Para la semana tres hubo un descenso de crecimiento bacteriano, con un promedio de 500 ufc/g. En la semana cuatro se mantuvieron los crecimientos en este rango, teniendo como valor promedio 300 ufc/g; mientras que para la última semana el crecimiento aumento a un promedio de 6700 ufc/g. Aunque existe una variabilidad de los recuentos obtenidos, durante las cinco semanas, la mayoría de los recuentos indican estar por debajo del límite máximo de la norma NTS No. 071 MINSA/DIGESA-V.01 (2008).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

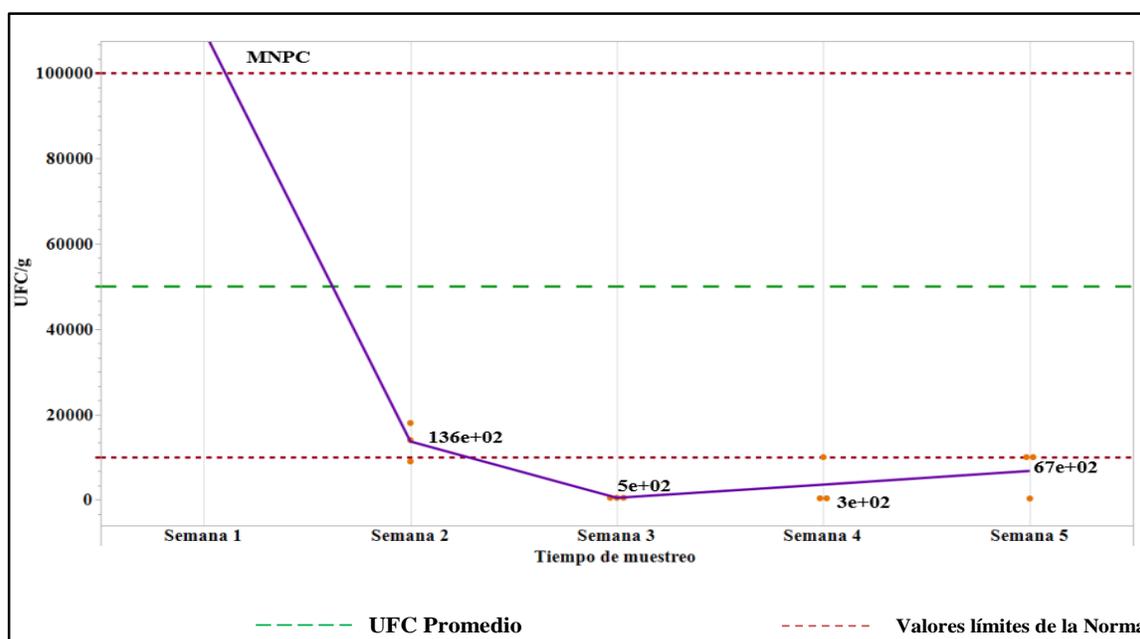


Figura 2. Recuento de *Mesófilos aerobios* de la Fonda 2-Penonomé durante las cinco semanas de muestreo.

Recuento de *Mesófilos aerobios* para fonda 1-Aguadulce.

Para la fonda 1 de Aguadulce, la semana uno presentó un valor promedio de 4600 ufc/g, manteniendo cercanos el valor mínimo de 4300 ufc/g y máximo de 5000 ufc/g (Figura 3). Para la semana dos hubo un descenso de la población siendo 2100 ufc/g el valor promedio de colonias crecidas, con un valor máximo de 3000 ufc y un valor mínimo de 1500 ufc/g. En la semana tres aumentó el crecimiento a un valor promedio de 6700 ufc/g, con un valor máximo para esta semana de 10000 ufc/g y mínimo de 1500 ufc/g. Para la semana cuatro se mantuvo el crecimiento poblacional en 6700 ufc/g promedio. Para la semana cinco la fonda 1 de Aguadulce presentó un crecimiento de 10000 ufc/g aumentando en relación con las primeras semanas.

El valor promedio, en general, para las cinco semanas fue de 6000 ufc/g. Aunque hay aumentos de población durante las semanas, todos los resultados se encuentran dentro de la norma NTS No. 071 MINSA/DIGESA-V.01 (2008), debido a que todos los datos se encontraron por debajo del límite máximo permisible, el cual es de 100 000 ufc/g.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

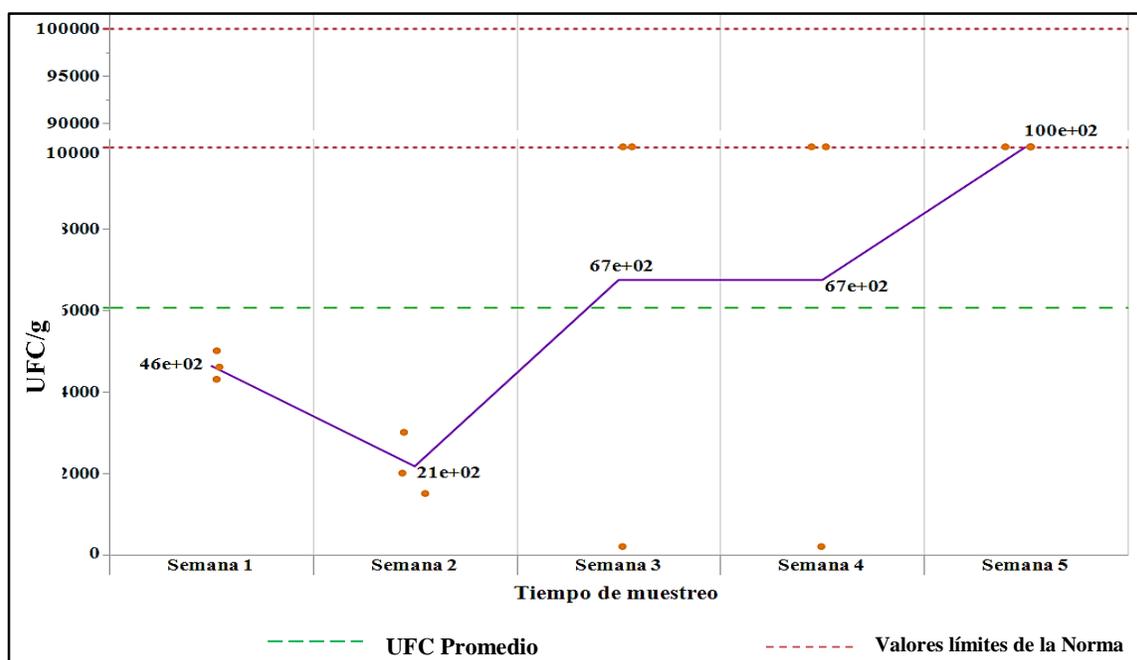


Figura 3. Recuento de *Mesófilos aerobios* de la Fonda 1-Aguadulce durante las cinco semanas de muestreo.

Recuento de *Mesófilos aerobios* para fonda 2-Aguadulce.

La fonda 2 de Aguadulce en la semana uno presentó un crecimiento bajo siendo 800 ufc/g el valor promedio, manteniendo cercanos sus valores máximos y mínimos de 900 ufc/g y 600 ufc/g, respectivamente (Figura 4). Para la semana dos, los crecimientos se mantuvieron bajos con un promedio de 300 ufc/g, con un valor máximo de 300 ufc/g y un valor mínimo de 200 ufc/g. Para la semana tres el valor promedio fue de 200 ufc/g, siendo 300 ufc/g el mayor recuento y 100 ufc/g el menor. Para la semana cuatro, se observa un aumento alto de crecimiento de mesófilos, teniendo un valor promedio de 6700 ufc/g, teniendo sus valores máximos en el límite mínimo de la norma 10000 ufc/g. En la semana cinco, este crecimiento se mantuvo en 10000 ufc/g.

Aunque el crecimiento de mesófilos aerobios fue variable en cada semana de muestreo, todos resultados se encuentran por debajo del límite máximo permisible, el cual es de 100 000 ufc/g de la norma NTS No. 071 MINSA/DIGESA-V.01 (2008).

Los mesófilos aerobios están presentes en todos lados; el ambiente, las personas, utensilios, entre otros. Por lo tanto, evitar la contaminación del alimento con estos



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

microorganismos es casi imposible. Aun considerando el hecho de que el arroz ha sido tratado térmicamente, el tiempo de exposición de este, la higiene de los utensilios y de los manipuladores, los envases de almacenamiento son algunas vías de contaminación de este alimento después de cocción; además son factores que pudieron variar durante las cinco semanas en que se analizaron las muestras.

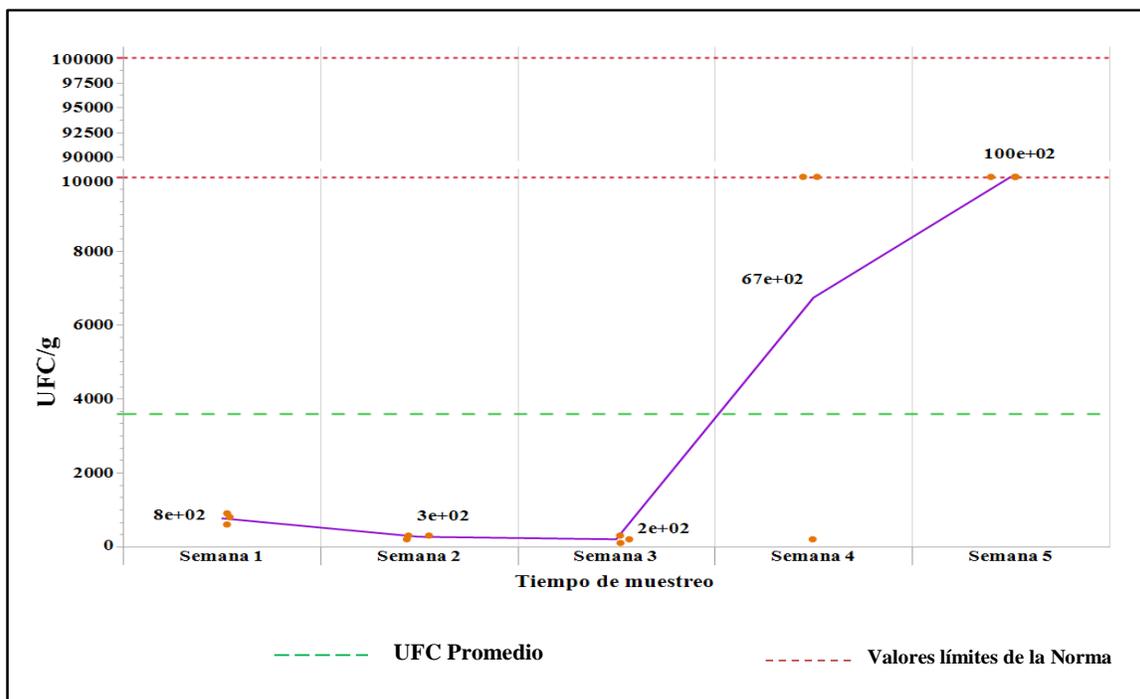


Figura 4. Recuento de *Mesófilos aerobios* de la Fonda 2-Aguadulce durante las cinco semanas de muestreo.

Comparación de recuento de Mesófilos aerobios de las cuatro fondas muestreadas durante las cinco semanas.

En las cuatro fondas durante las cinco semanas de muestreo, se observó que la mayoría de los recuentos se mantuvieron por debajo del valor mínimo permitido por la norma NTS No. 071 MINS/DIGESA-V.01 (2008) (Figura 5). La fonda 1 y 2 de Penonomé presentaron algunos valores por encima del valor mínimo (10000 ufc/g) pero, por debajo del valor máximo (100000 ufc/g), por lo tanto, aun cumplen con la norma. De manera general, comparando las cuatro fondas, la fonda 2 de Penonomé fue la que mayor crecimiento presento, seguida de la fonda 1 de Aguadulce, la fonda 1 de Penonomé y, por último, la fonda 2 de Aguadulce.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

El recuento de Mesófilos aerobios refleja la calidad sanitaria de los alimentos analizados, indicando las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración, la posibilidad de que existan patógenos y la inmediata alteración del producto. A nivel mundial se han realizado varios estudios para estimar la carga bacteriana de Mesófilos aerobios inicial, en arroz blanco cocido. Algunos resultados, en Reino Unido, reportan valores que oscilan entre $<10^3$ y $\geq 10^7$ ufc/g; en Filipinas un promedio de 10^5 ufc/g y en la ciudad de Benin (Nigeria), se encontraron valores promedio de 10^5 ufc/g. Para nuestro caso, la utilizada es la norma peruana NTS No. 071 MINSA/DIGESA-V.01 (2008) y establece como límite máximo permisible 10^5 ufc/g.

Debido a que ninguna de las muestras de arroz cocido sobrepasó el límite máximo permisible, se pueden considerar apto para el consumo. Sin embargo, un recuento bajo de aerobios Mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas.

Análisis estadístico

Para el caso de la fonda 1 de Penonomé el resultado indica que no existen diferencias entre los valores de la carga microbiana de Mesófilos aerobios en la F1-Penonomé en las cinco semanas. Para la fonda 2 de Penonomé y fonda 1 de Aguadulce, tampoco hay diferencias entre los valores de crecimiento de Mesófilos aerobios. Para la fonda 2 de Aguadulce el resultado indica que no existen diferencias significativas entre los recuentos de Mesófilos aerobios durante las cinco semanas de muestreo (Cuadro 1).

Para hacer una comparación entre las fondas muestreadas, durante las cinco semanas de muestreo, se realizó la prueba de Wilcoxon, que no existen diferencias significativas entre ambas fondas de Penonomé, mientras que entre las fondas muestreadas de Aguadulce si existen diferencias significativas en el crecimiento de mesófilos aerobios (Cuadro 2).

En la comparación realizada para las cuatro fondas muestreadas según la prueba de Wilcoxon y Kruskal-Wallis, se observa que existen diferencias entre los crecimientos de Mesófilos aerobios (Cuadro 3).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

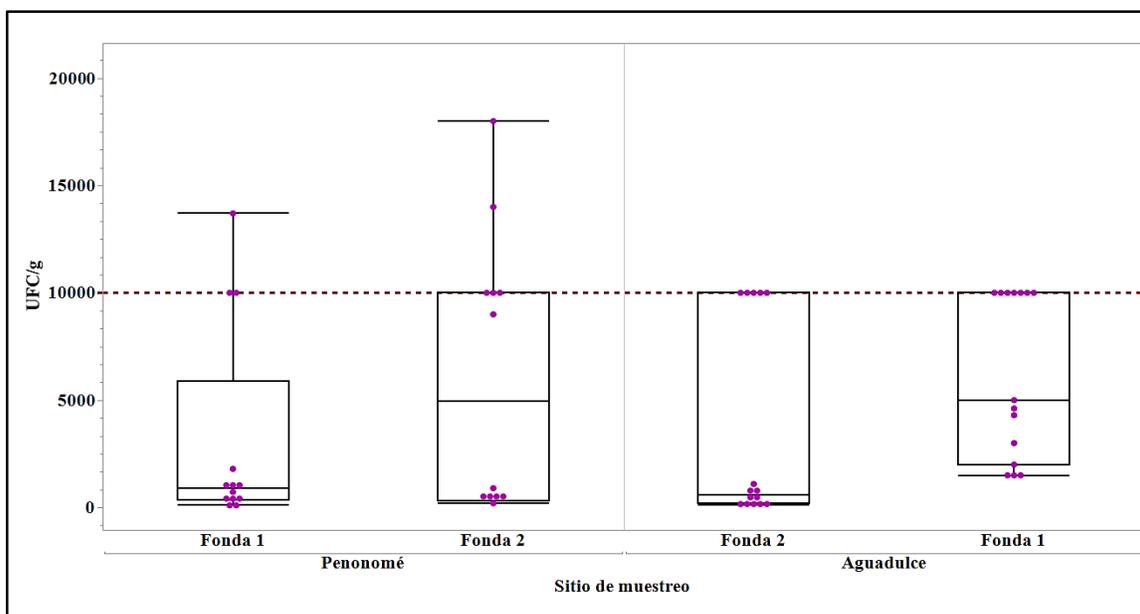


Figura 5. Comparación del crecimiento microbiano de las cuatro fondas durante las cinco semanas de muestreo.

Cuadro 1. Análisis estadístico de varianza para las fondas muestreadas durante cinco semanas.

	Chi cuadrada	gl	Prob > Chi cuadrado
Fonda1-Penonomé	5,369	3	0,1467
Fonda 2-Penonomé	4,247	3	0,1379
Fonda 1-Aguadulce	5,5944	4	0,2316
Fonda 2-Aguadulce	9,4035	4	0,0518

Cuadro 2. Prueba de Wilcoxon para fondas de Penonomé y de Aguadulce.

Prueba de Wilcoxon: Penonomé		
S	Z	Prob > Z
167,5	0,60286	0,5466
Prueba de Wilcoxon: Aguadulce		
S	Z	Prob > Z
171,5	-2,52321	0,0116



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Cuadro 3. Prueba de Wilcoxon y Kruskal-Wallis para las cuatro fondas muestreadas.

Prueba de Wilcoxon y Kruskal-Wallis (de rangos y signos)		
Chi cuadrada	gl	Prob > Chi cuadrado
7,8528	3	0,0492

Las fondas que presentaron diferencias fueron: la fonda 2 (Aguadulce) en relación con la fonda 1 (Aguadulce) presenta una diferencia significativa, debido a que su valor p es de 0,0193 y la fonda 1 (Penonomé) en comparación con la fonda 1 (Aguadulce) con un valor p de 0,0086 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación para cada par por el método de Wilcoxon.

Comparación para cada par por el método de Wilcoxon			
Nivel	- Nivel	Z	Valor p
Fonda 2 (Penonomé)	Fonda 2 (Aguadulce)	1,24206	0,2142
Fonda 2 (Penonomé)	Fonda 1 (Penonomé)	0,60286	0,5466
Fonda 2 (Aguadulce)	Fonda 1 (Penonomé)	-0,51229	0,6085
Fonda 2 (Penonomé)	Fonda 1 (Aguadulce)	-0,85233	0,394
Fonda 2 (Aguadulce)	Fonda 1 (Aguadulce)	-2,33887	0,0193*
Fonda 1 (Penonomé)	Fonda 1 (Aguadulce)	-2,62569	0,0086*

***E. coli*/Coliformes**

Recuento de *E. coli*/Coliformes de las cuatro fondas muestreadas durante las cinco semanas.

Todas las fondas presentaron un recuento de <10 ufc, considerada 0 ufc en la gráfica, durante las cinco semanas de siembra, lo cual indica que el producto es apto para el consumo (Figura 6). Considerando que las Coliformes son microorganismos indicadores de contaminación fecal, y que se analizó un alimento listo para consumo humano, como lo es el arroz, el recuento es lo esperado, pues el mismo no debe tener crecimiento de estas bacterias, debido a que ha pasado por un tratamiento de cocción, en el cual se elimina toda la flora microbiana presente a excepción de las esporas.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

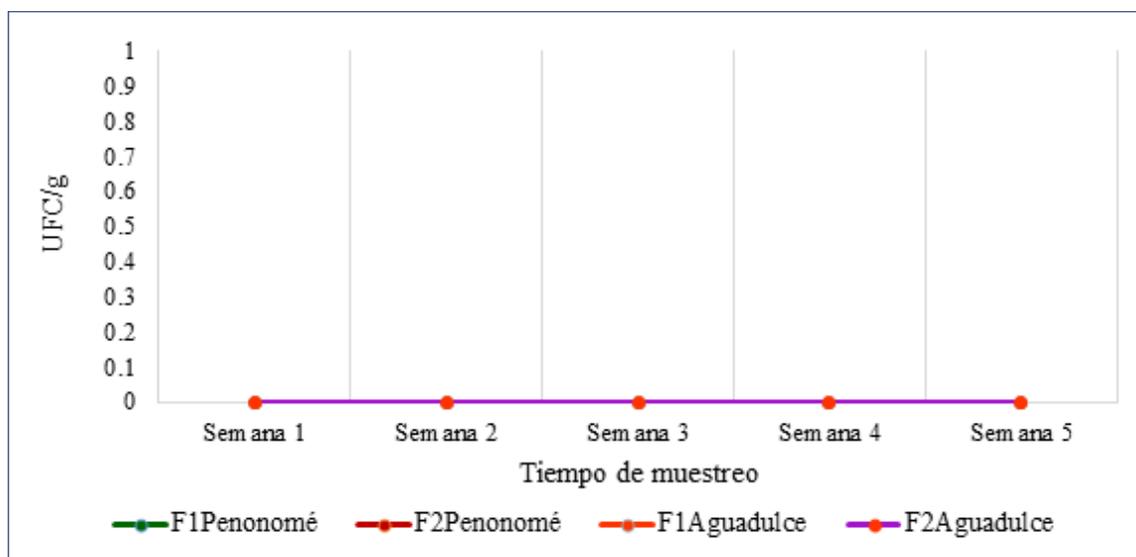


Figura 6. Recuento de *E. coli*/Coliformes de las cuatro fondas muestreadas durante las cinco semanas.

Bacillus cereus

Análisis microbiológico

A manera general se observó que el mayor crecimiento de *Bacillus cereus* se obtuvo a las 8 horas de siembra; esto puede deberse a la ventaja ecológica que tienen estas bacterias respecto a otras debido a la diversidad de enzimas hidrolíticas extracelulares que presentan, entre las que se encuentran las amilasas, las cuales son importantes en este tipo de sustrato rico en almidón (Pérez Portuondo et al., 2011). En cuanto a las fondas las que presentaron crecimiento en los tres muestreos fueron la fonda 1 de Penonomé en la tercera semana, la fonda dos de Penonomé en la primera y tercera semana de muestreo, la fonda 1 de Aguadulce en la segunda y cuarta semana de muestreo y la fonda 2 de Aguadulce en la primera, segunda y cuarta semana de muestreo. Lo que indica, que el mayor crecimiento del *Bacillus cereus* se mantuvo durante la segunda, tercera y cuarta fonda de cada una de las muestras analizadas (Figura 7).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

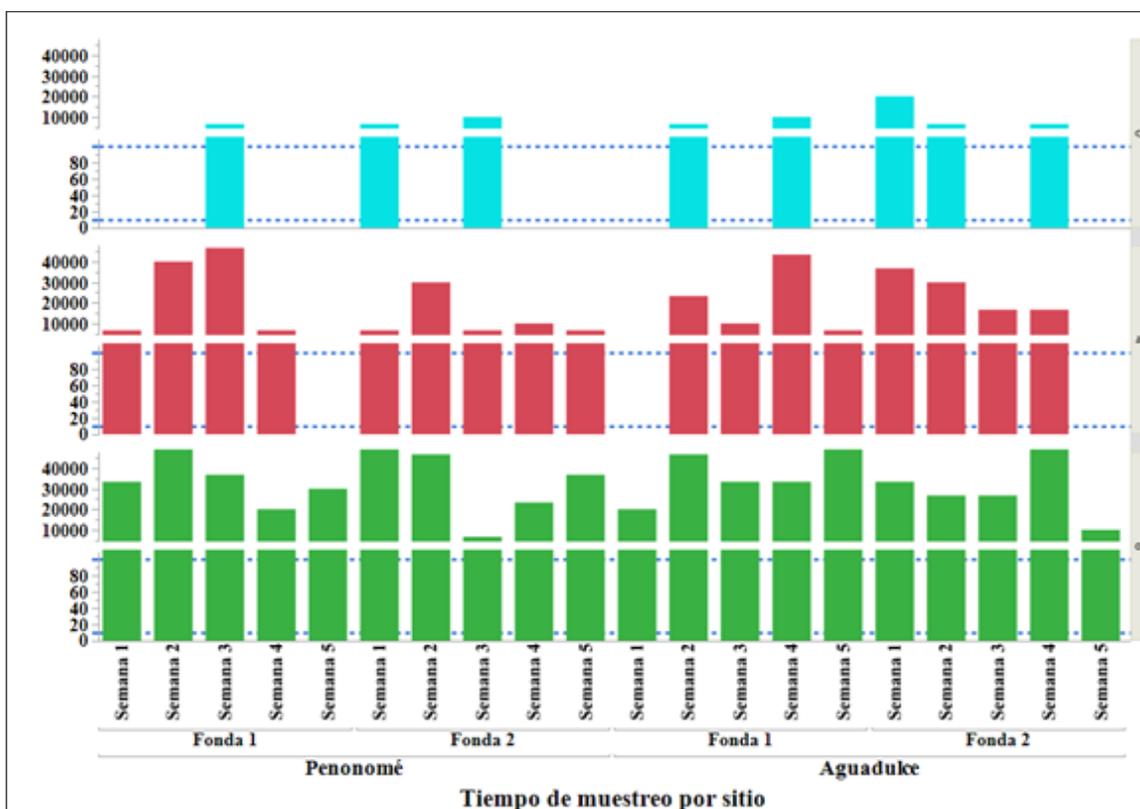


Figura 7. Recuento de *Bacillus cereus* en las muestras de arroz cocido a las 0, 4 y 8 horas de siembra durante cinco semanas de muestreo.

El arroz blanco cocido se encuentra dentro del grupo denominado alimentos listos para el consumo, ya que no requieren tratamientos térmicos adicionales antes de ser ingeridos por el consumidor. La calidad bacteriológica de este alimento depende de muchos factores incluyendo la forma de prepararlo, la clase de arroz, la forma de servirlo y la manipulación de este.

Es muy común que el arroz crudo tenga *Bacillus cereus* en forma de esporas, pues su habitat natural es el suelo, en dónde pueden encontrarse concentraciones entre 10^{-3} y 10^{-5} esporas/gramo, por lo cual se considera inevitable la presencia de *Bacillus cereus* en la materia prima; sin embargo, al momento de su cocción las células de *Bacillus cereus* suelen destruirse junto al resto de las bacterias presentes en el alimento, pero las esporas son mucho más resistentes a las temperaturas de cocción y pueden permanecer en el alimento; siendo entonces capaces de proliferar sin el menor de los problemas.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Aunque en nuestro país, hasta la fecha no se han realizado estudios acerca de la presencia de *Bacillus cereus* en arroz cocido, Pielaat et al., 2005, reportan que la mayoría de las intoxicaciones provocadas por este patógeno, se asocian al consumo de arroz cocido en restaurantes chinos, locales de comida rápida y cafeterías; en donde se resalta que la presencia de este patógeno; el cual tiene un tiempo de replicación de 40 minutos; es decir, si después de cocido el arroz se deja enfriar lentamente y se mantiene a temperatura ambiente se va a producir una proliferación bacteriana con la concomitante producción de toxina, lo cual puede deberse a que las condiciones de conservación del alimento es inadecuada. Además, es importante mencionar que dos de las fondas muestreadas no tenían baño maría, aumentando aún más, el potencial riesgo de que las esporas del *B. cereus* proliferen.

A la hora de realizar la compra de cada una de las muestras de arroz se midió temperatura *in situ*, tomando en cuenta que la temperatura más peligrosa para almacenar el arroz cocido es entre 15° C y 50° C, es decir, a temperatura ambiente (Pérez Portuondo et al., 2011); en nuestro caso muestras que fueron compradas a lo largo de nuestro muestreo se encontraban dentro de este rango de temperatura. Por ello al momento de llevar las muestras al laboratorio se mantuvieron a 30° C y, posteriormente, se realizaron las siembras a las 0, 4 y 8 horas.

Como parámetro microbiológico para el recuento de este patógeno, se utilizó la norma siguiente: para comidas y platos preparados listos para consumo o que requieren calentamiento (Se incluyen platos servidos directamente al público) presente en la norma sanitaria sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, R/M No. 615 (2003)-SA/DM (Perú).

Los recuentos obtenidos trascurridas las 48, para las 0, 4 y 8 horas de siembra en cada una de las fondas muestreadas, sobrepasaron el límite máximo permitido desde la primera semana; sin embargo; es importante aclarar que, aunque éstos sobrepasan la norma; se encuentran por debajo de las concentraciones 10^{-5} a 10^{-8} , las cuales afectan de manera negativa la salud por la producción de toxinas en el alimento (Coto et al., 2012).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Análisis estadístico

En relación con los crecimientos de *B. cereus* a las 0 horas, 4 y 8 horas de siembra en los cuatro sitios, no se observaron diferencias significativas.

Los recuentos totales obtenidos durante las cinco semanas de análisis, sin contemplar sitio de muestreo, no mostraron diferencias significativas en los recuentos totales a las 0 horas, sin embargo, al aumentar el tiempo a cuatro horas si se observa diferencias que se sugiere pueden deberse a una disminución de la temperatura o el manejo de cada una de las muestras. Finalmente, a las ocho horas no se observaron diferencias significativas durante las cinco semanas de análisis, lo que puede sugerir que las primeras cuatro son claves para la dinámica poblacional de la bacteria *B. cereus* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Prueba de Wilcoxon Kruskal-Wallis para las cinco semanas muestreadas.

Prueba de Wilcoxon Kruskal-Wallis para las cinco semanas muestreadas			
	Chi cuadrado	gl	Prob > Chi cuadrado
Siembra 0h	2,9753	4	0,562
Siembra 4 h	14,1107	4	0,007 *
Siembra 8 h	4,1822	4	0,3819

La comparación de cada par de semanas muestreada por el método de Wilcoxon, observándose en términos generales que la semana 5 fue la que presentó mayor recuento microbiano en general, sin contemplar hora ni sitio de muestreo, es decir se presentan los correspondientes incrementos poblacionales en función del tiempo transcurrido (Cuadro 6).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Cuadro 6. Comparación para cada par por el método de Wilcoxon.

Cada par por Wilcoxon			
Nivel	- Nivel	Z	Valor p
Semana 2	Semana 1	2,28351	0,0224 *
Semana 3	Semana 1	1,15772	0,247
Semana 4	Semana 1	0,34709	0,7285
Semana 4	Semana 3	-0,20234	0,8397
Semana 4	Semana 2	-1,24293	0,2139
Semana 3	Semana 2	-1,3013	0,1932
Semana 5	Semana 1	-1,59431	0,1109
Semana 5	Semana 4	-1,82621	0,0678
Semana 5	Semana 3	-2,58272	0,0098 *
Semana 5	Semana 2	-3,3856	0,0007 *

Prueba confirmativa de *Bacillus cereus* con API 50CH y API 20E

El sistema API 50 CHB/E Medium está destinado a la identificación de los *Bacillus* y microorganismos próximos, así como los bacilos Gram negativos pertenecientes a las *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*. Este medio permite realizar el estudio de fermentación de los 49 azúcares de la galería API 50 CH. Durante la incubación, el catabolismo de los glúcidos produce ácidos orgánicos que hacen cambiar el color del indicador del pH. Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico de la cepa y permiten la identificación de esta con la ayuda del software informático de identificación. La galería API 20 E se utiliza como complemento de la galería API 50 CH. El api 20E nos permite identificar bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos, mediante 23 pruebas bioquímicas estandarizadas (bioMérieux®, 2005). Esta prueba arrojó un resultado negativo para la presencia de bacilos Gram negativos. Por tal motivo, el perfil bioquímico obtenido en el API 50 CHB/E se identificó a partir de la base de datos (V4.0), con la ayuda del api web TM, confirmando la presencia de *Bacillus cereus* var *mycoides* en un 97,3 %. Lo cual resulta exitoso debido a que esta investigación deseaba identificar *Bacillus cereus* independientemente de la variedad (Figura 8).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Contraloría General de la República. (2008). *Encuesta de niveles de vida (ENV)*.
<http://www.contraloria.gob.pa/inec/Aplicaciones/ENV2008/intro.html>

Coto, R., Chaves, C., Gamboa, M., y Arias, M. (2012). Calidad bacteriológica y detección de *Bacillus cereus* toxigénicos en arroz blanco cocido expendido en el área metropolitana de la provincia de San José, Costa Rica. *ALAN*, 62(3), 283-289.
https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222012000300011

Finlay, W., Logan, N., y Sutherland, A. (2002). *Bacillus cereus* emetic toxin production in cooked rice. *Food Microbiology*, 19(5), 431-439.
<https://doi.org/10.1006/fmic.2002.0505>

Forero, A., Galindo, M., y Morales., G. (2018). Aislamiento de *Bacillus cereus* en restaurantes escolares de Colombia. *Biomédica*, 38, 338-44.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3802>

Gaceta Oficial 25062. (2004). *Decreto Ejecutivo N° 157 que establece los requisitos para el control sanitario de la manipulación, preparación y expendio de alimento en las fondas, kioscos y ventas ambulantes, y dicta otras disposiciones*.
http://gacetas.procuraduria-admon.gob.pa/25062_2004.pdf

Granum, P. (2002). *Bacillus cereus and food poisoning. Applications and systematics of Bacillus and Relatives*, 141-159. <https://doi.org/10.1002/9780470696743.ch4>

Guías de interpretación. (2012). 3M Petrifilm® RAC y EC.

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2006). Informe anual. B0381e.pdf (iica.int).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

International Standard ISO 7932. (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*. Colony - count technique at 30°C. Third edition, 2004-06-15. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:7932:ed-3:v1:en>

Norma NTS No. 071 MINSA/DIGESA-V.01. (2008). Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Perú. RM591MINSANORMA.pdf (saludarequipa.gob.pe)

Norma R/M N°615. (2003)-SA/DM. "Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano". Perú. RM591MINSANORMA.pdf (saludarequipa.gob.pe)

Pérez Portuondo, I., Orberá Ratón, T., y Tamayo Núñez, J. (2011). Aislamiento e identificación de *Bacillus cereus* a partir de dos variantes de arroz comercial (*Oryza sativa* L.). *CENIC Ciencias Biológicas*, 42(3), 139-144. <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321005.pdf>

Pielaat, A., Fricker, M., Nauta, M., y Van Leusden, F. (2005) Biodiversity in *Bacillus cereus*. RIVM report 250912004/2005. National Institute for Public Health and the Environment, The Netherlands. <https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/Bacillus%20cereus.pdf>

Sánchez, J., Correa, M., y Castañeda Sandoval, L. M. (2016). *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 34(2), 230-242. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/fnsp/article/view/20973>
<https://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v34n2/v34n2a12.pdf>
[doi:10.17533/udea.rfnsp.v34n2a12](https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v34n2a12)



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).