

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE QUIMICA**

**INCIDENCIA DE COLIFORMES FECALES EN  
VERDURAS DEL D. F.**

297

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A**

**ESPERANZA DEL SOCORRO ROBLES VALDERRAMA**

**1 9 7 4**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

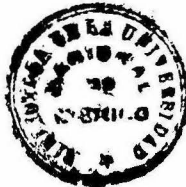
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

... 2850  
A.C. 1-7-74  
FECHA  
PROC. K. E. 275

... 2850 ...



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: NATALIA SALCEDO OLAVARRIETA.

VOCAL: NINPA GUERRERO DE CALLEJAS.

SECRETARIO: ENRIQUE GARCIA GALEANO.

1er. SUPLENTE: ANGELA SOTELO LOPEZ.

2do. SUPLENTE: MA. DEL SOCORRO SALAS TAVARES.

Sitio donde se realizo' el tema: FACULTAD DE QUIMICA.

Sustentante: Esperanza del Socorro Robles Valderrama.

Firma: Esperanza del S. Robles V.

Asesor: Natalia Salcedo Olavarrieta.

Firma: Natalia Salcedo O.



A mis Padres por sus  
sacrificios para dar  
me una carrera y por  
la confianza que ---  
siempre tuvieron en-  
mí.

A mi asesora Q. Natalia  
Salcedo O. con cariño y  
agradecimiento.

A mis Maestros.

A todas aquellas personas, entre familiares y amigos que me supieron alentar en los momentos más difíciles de mi vida.

CONTENIDO.

INTRODUCCION.

CAPITULO 1.

GENERALIDADES.

CAPITULO 2.

CONTAMINACION A PARTIR DEL RIEGO CON AGUAS RESIDUALES Y  
DEL MATERIAL CLOACAL.

CAPITULO 3.

MICROORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINACION FECAL.

CAPITULO 4.

MEDIOS Y TECNICAS MAS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACION DE  
COLEFORMES FECALES.

CAPITULO 5.

DETERMINACION DE COLEFORMES FECALES EN VERDURAS Y RESULTADOS.

CAPITULO 6.

ESTUDIO ESTADISTICO Y CONCLUSIONES.

BIBLIOGRAFIA.

## INTRODUCCION.

Entre los alimentos más consumidos por las gentes se encuentran las verduras.

Las verduras cuando son consumidas crudas, pueden ser causa de enfermedades debido a que se encuentran contaminadas con diversos microorganismos por lo que es conveniente llevar un control de sanidad en estas verduras y para lograr esto es necesario conocer antes el grado de contaminación y el origen de los microorganismos contaminantes.

Aquí se hará un estudio sobre la incidencia de los bacilos coliformes fecales en muestras de lechuga, rábano y cilantro, procedentes de diferentes mercados y de algunas casas.

También se verá las características de los coliformes fecales y las técnicas para poder identificarlos en el laboratorio.

CAPITULO I

GENERALIDADES.

**Clasificación:**

**Orden:** *Subbacteriales.*

**Familia:** *Enterobacteriaceae.*

**Tribus:** *Escherichieae, Erwinieae, Serratieae, Protecae y Salmonelleae.*

**Geñeros de la tribu Escherichieae:** *Escherichia, Aerobacter, Klebsiella, Paracolobactrum y Alginobacter.*

**Especies del Geñero Escherichia:** *E. coli, E. aurescens, E. freundii y E. intermedia. (14).*

**Bacterias coliformes.**—Las bacterias de los geñeros *Escherichia, Aerobacter, Klebsiella* y *Paracolobactrum* se incluyen en el grupo coliforme o coli-aerogenes y en conjunto se les denomina microorganismos coliformes o bacterias coliformes.

Las dos especies más importantes son *Escherichia coli* y *Aerobacter aerogenes* (llamada también *Klebsiella aerogenes* la forma inmóvil y *Enterobacter aerogenes* la móvil).

Para propósitos de laboratorio es conveniente dividir en dos grupos a las enterobacterias según la fermentación:

1° Los que fermentan la lactosa con producción de acidez o acidez y gas rápidamente. A este grupo pertenecen los bacilos coliformes, y las tribus *Erwinieae* y *Serratieae*.

2° Los que no fermentan la lactosa, o la fermentan lenta e irregularmente. A este grupo pertenecen las tribus *Protecae* y *Salmonelleae* y los geñeros *Salmonella, Shigella* etc.

El grupo coliforme comprende todos los bacilos cortos, gram negativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción.

de acidez y gas a 35°C en menos de 48 horas. Los colibacilos son aerobios pero también anaerobios facultativos, sus cultivos se caracterizan por un olor fétido.

Estos bacilos crecen en un medio compuesto de sales inorgánicas, una sal de amonio y glucosa. La colonia típica en gelosa nutritiva es poco elevada, convexa, lisa, incolora y algo opaca.

Debido a que *E. coli* se considera principalmente de origen intestinal, mientras que *A. aerogenes* suele proceder de vegetales (aunque, ocasionalmente, también del intestino), se ha estudiado bastante el modo de diferenciarlas. *E. coli* produce más ácido en caldo glucosado, lo que se aprecia mediante el indicador rojo de metilo; forma indol pero no acetofina (acetilmetilcarbinol), produce dióxido de carbono e hidrógeno en la proporción 1,1 y no puede aprovechar el citrato como fuente única de carbono. *A. aerogenes* produce menos ácido, forma acetilmetilcarbinol pero no indol, la proporción de dióxido de carbono a hidrógeno producidos es de 2,1 y utiliza el citrato como única fuente de carbono. Ambas especies fermentan los azúcares, dando ácido láctico (en más proporción *E. coli*), alcohol etílico, ácido acético, ácido succínico, dióxido de carbono e hidrógeno. Cierta número de bacterias coliformes, por sus caracteres, ocupan posiciones intermedias entre *E. coli* y *A. aerogenes*. Algunas que no fermentan la lactosa o lo hacen con gran lentitud se incluyen en el género *Paracolobactrum*.

En general las bacterias coliformes son perjudiciales para los alimentos, ya que su presencia en alguno de ellos -agua y otros, por ejemplo- se consiguiera como signo de contaminación por desperdicios cloacales y, por lo tanto, posiblemente por bacterias entéricas patógenas; cuyo crecimiento inutiliza los alimentos.

Escherichia coli es de origen indudablemente fecal y su presencia se considerara' indicio seguro de contaminación fecal. Este bacilo es llamado coli fecal y se encuentra muy difundido en la naturaleza y aunque lo más probable es que tenga su origen en las heces, su presencia, particularmente en pequeñas cantidades, no necesariamente significa que la sustancia o material del cual ha sido aislado contenga materia fecal.

Algunas cepas de E. coli son patógenas para el hombre y animales causando supuraciones, infecciones en el tracto urinario y gastroenteritis en bebés.

Escherichia coli se define como un bacilo grueso, corto, de 0.4 a 0.7 micras de grosor y de 1 a 4 micras de longitud, gram negativo, no esporulado, que fermenta la lactosa con producción de ácido y gas a 35°C y a 44°C en menos de 48 horas. (1, 2 y 3).

En unas investigaciones realizadas por Edch Viola, se observó a Escherichia coli en los utensilios de cocina y las manos del personal en un restaurante de autoservicio. Los microorganismos fueron examinados microscópicamente.

Las conclusiones del investigador confirman que E. coli puede ser considerada como indicador de contaminación fecal no sólo en los alimentos, sino también en personas y utensilios. (4).

En otras investigaciones efectuadas, fueron descubiertas pequeñas cantidades de E. coli, haciendo suponer viejas contaminaciones.

Se puede estimar, por medio del método del T T C (cloruro de trifenil tetrazolio) la edad de contaminación fecal dentro de esos casos límites. Por comparación de cantidades de E. coli desarrolladas en T T C con el método de endo agar puede determinarse

una contaminación ya sea joven o vieja. Este método solo puede -  
ser aplicable a aguas con temperaturas abajo de 11°C. (E).



## CAPITULO 2

### CONTAMINACION A PARTIR DEL RIEGO CON AGUAS RESIDUALES Y DEL MATERIAL CLOACAL

Importancia del riego con aguas residuales.

En muchos países la irrigación de los campos con las aguas residuales no sólo es un procedimiento de evacuación, sino que contribuye a mejorar la calidad y la cantidad de hortalizas y de otros productos agrícolas. Las que han sido regadas con aguas de las cloacas están evidentemente contaminadas. El consumo de hortalizas cultivadas en estas condiciones ha producido, en efecto, epidemias de disentería amibiana y de ascariasis, entre otras enfermedades.

Las aguas residuales tratadas que van a parar al suelo, también aportan microorganismos, si bien en menor número y menor cantidad de microorganismos patógenos que las aguas sin tratar.

Bajo estas condiciones la contaminación en verduras viene de la irrigación con aguas residuales, por lo que es necesario que se realice una inspección sanitaria. (3).

Contaminación a partir del material cloacal.

Quando el material cloacal, sin tratamiento previo, se destina a la fertilización de las cosechas, existe el peligro de una contaminación de los vegetales comestibles por bacterias patógenas del hombre, especialmente por las que causan enfermedades gastrointestinales.

El empleo de excretas humanas como fertilizante todavía es práctica común en algunas partes del mundo, siendo raro en los Estados Unidos.

Aparte de los gérmenes patógenos, los alimentos pueden tam-

bien contaminarse a partir de los productos cloacales con bacterias coliformes, anaerobios, enterococos y otras bacterias intestinales. (6).

### CAPITULO 3

#### MICROORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINACION FECAL.

La limpieza de los alimentos se considera esencial para el consumidor. El intervalo de confianza de un alimento está dado por índices que nos aseguran unas condiciones sanitarias apropiadas y que dicho alimento este libre de una contaminación posible.

De los índices sugeridos de calidad sanitaria de alimentos se han considerado tres: *Escherichia coli*, coliformes y enterococos.

La presencia de alguno de ellos en determinados alimentos no necesariamente puede ser interpretada como indicadora de insalubridad.

El peligro mayor que puede presentarse en el agua de consumo o de riego es que haya sido contaminada por excretas humanas, o incluso por materias de origen animal. Si la contaminación ha sido lo suficientemente reciente y a ella han contribuido enfermos o portadores de gérmenes de enfermedades infecciosas como las infecciones intestinales o la disentería, esos organismos patógenos pueden hallarse vivos en el agua y la contaminación de ésta pueda provocar nuevas contaminaciones.

Cuando en las excretas o en las aguas residuales hay gérmenes patógenos, su número es casi siempre muy inferior al de los microorganismos fecales normales, que son más fáciles de reconocer en el agua, de manera que de la carencia de estos últimos en la muestra puede inferirse la de los gérmenes patógenos; por eso, el empleo de las bacterias fecales normales como indicadores de la contaminación fecal aporta un margen de seguridad.

Los microorganismos que se usan más corrientemente como indicadores de la contaminación son *Escherichia coli* y todo el grupo coliformes.

El origen fecal de *Escherichia coli* no ofrece duda, pero, en cambio se ha discutido mucho la significación precisa de la presencia en el agua de los demás miembros del grupo coliforme. Todos los gérmenes coliformes pueden tener origen fecal y por consiguiente a su presencia en el agua se le dará siempre la peor interpretación posible; así pues, desde el punto de vista práctico, se partirá del principio de que todos ellos son de origen fecal, a menos que pueda demostrarse una procedencia distinta.

Aparte del problema de su empleo como indicadores de contaminación fecal, todos los miembros del grupo coliforme son ajenos al agua y se considerará que su presencia en ésta indica, al menos, una contaminación en su sentido más amplio. (3 y 7).

#### CAPITULO 4

### MEDIOS Y TECNICAS MAS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACION DE COLIFORMES FECALES.

Los medios más utilizados en la identificación de coliformes fecales son los siguientes:

1) Caldo Bacto m EC. Usado para la enumeración de coliformes fecales por la técnica de filtro de membrana usando temperaturas elevadas ( $44.5^{\circ}\text{C}$ ). Sobre este medio suplementado con ácido rosólico las colonias de coliformes fecales aparecen azules y de 1 a 3 mm de diámetro, las densas son grises.

2) Caldo Acido bofico. Es un medio líquido para enriquecimiento y la identificación de *Escherichia coli* en agua y alimentos sirve como indicador observando crecimiento y producción de gas a  $42.5^{\circ}\text{C}$ - $43.5^{\circ}\text{C}$ .

3) Medio E.C. Se usa a continuación del caldo lactosado o BDG (desoxicolato glucosa), a temperaturas de  $45.5^{\circ}\text{C}$ . Se considera positiva la prueba con producción de gas en cualquier cantidad a las 24 horas o antes de ese lapso.

4) Bijkman Lactosa. Para la determinación de los coliformes fecales se requiere que la composición del medio sea uniforme y exacta y la temperatura de incubación sea de  $45.5^{\circ}\text{C}$  a  $46^{\circ}\text{C}$ . Se usa a continuación del caldo lactosado. La producción de gas constituye una prueba positiva.

Los siguientes medios son específicos para la identificación de *Escherichia coli*.

1) Gelosa EMB de Levine. (eosina azul de metileno). Después de 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , *Escherichia coli* se identifica por sus colonias con brillo metálico verde y un centro negro. *Aerobacter* --

aerogenes forma colonias grandes con un centro café. Las colonias que no fermentan la lactosa se ven rosas o del mismo color del medio.

2) Gelosa Endo. En éste medio las colonias de E. coli presentan un color rojo brillante metálico.

3) Gelosa tergitol. Es un medio selectivo para E. coli y miembros del grupo coliforme. E. coli producirá colonias amarillas rodeadas por zonas amarillas. Aerobacter producirá colonias grandes mucoides. Las colonias de otros microorganismos aparecen en colores azules.

4) Leche tornasolada. Para E. coli la producción de acidez, gas y coagulación del medio es una prueba positiva.

5) Los medios de la prueba IMVIC. Inocul E. coli da positivo (tipo I) o negativo (tipo II); Rojo de metilo E. coli da positivo; Voges Proskauer E. coli da negativo y citrato E. coli da negativo. (8 y 9).

Las técnicas más empleadas en la identificación de coliformes fecales son las siguientes:

1) Método de los tubos múltiples.

Prueba presuntiva. Consiste en sembrar las muestras en matraces o tubos de ensayo con un medio de cultivo líquido adecuado, a continuación se incuba durante el tiempo necesario y se examina la reacción de los microorganismos coliformes. La prueba se designa como presuntiva porque la reacción observada puede deberse en ocasiones a otros gémenes. Los resultados se ven en la tabla del número más probable (NMP).

En diferentes países se han utilizado diversos medios de cultivo para la prueba presuntiva. En la actualidad se recomien

da el uso del caldo MacConkey con púrpura de bromo cresol como indicador y una concentración normalizada de sales biliares incubando a 35°C.

Prueba parcialmente confirmativa. Se hace un subcultivo de cada tubo positivo de la prueba presuntiva, para esto se usa un tubo de caldo bilis verde brillante, de caldo lactosa ricinoleato o de caldo MacConkey incubando a 44°C.

También puede comprobarse la presencia de E. coli determinando la producción de indol a 44°C. Cuando se necesita una comprobación total, una muestra de los tubos positivos en la prueba presuntiva se siembra en una placa de medio sólido, como gelosa lactosada, gelosa eosina azul de metileno o gelosa MacConkey, y se toman colonias para identificarlas mediante las pruebas de indol y de la utilización de citrato además de la fermentación de lactosa a 44°C. (2 y 3).

## 2) Identificación con caldo lactosado y ácido bórico.

Inocular 1 ml de diluciones apropiadas en tubos de fermentación con caldo lactosado bilis verde brillante o caldo de lauril triptosa. Incubar a 35°C y examinar después de 24 y 48 horas. La presencia de gas en el tubo indica una prueba positiva para los miembros del grupo coliforme.

Tomar una muestra de los tubos positivos y transferirla a tubos de fermentación de caldo lactosado con ácido bórico.

Incubar a  $43^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  en un baño de agua y examinar después de 24 y 48 horas. La prueba será positiva si los tubos muestran producción de gas.

Cuando es necesaria una confirmación se pasa el material de los tubos, a gelosa EMB y después se incuba a 35°C, 18 a 24 h.

Observar las colonias típicas. ]

Para obtener la enumeración de *E. coli*, recordar el número de tubos confirmados en cada una de las tres últimas diluciones positivas. Referirse a la tabla del número más probable. Este número, multiplicado por la dilución de enmedio y dividido entre los gramos de muestra utilizados, es igual al número más probable de *E. coli* por gramo de muestra. (7).

3) Técnica de EMB (eosina azul de metileno).

Transferir 1 ml de las diluciones decimales apropiadas, a cajas de Petri y verter el medio de gelosa bilis rojo violeta o gelosa lactosa desoxicolato. Mezclar el medio y el inóculo completamente y dejar solidificar el agar. Distribuir 4-5 ml adicionales del medio sobre la superficie del agar para inhibir el crecimiento en la superficie extendida.

Ya solidificado el agar invertir las placas e incubar por 18-24 horas a 35°C. La prueba es positiva si hay colonias rojo obscuro de 0.5 mm de diámetro.

Sembrar 10 de las colonias representativas en la superficie seca de gelosa EMB. Incubar por 18-24 horas a 35°C y observar las colonias típicas de *E. coli*. Recordar el número de colonias confirmadas para *E. coli* y expresarlo como por ciento del total de colonias tomadas. Multiplicar el total de número de colonias coliformes por el por ciento para obtener el valor estimativo del número más probable de *E. coli*. (7).

4) Técnica con caldo EC.

Material, tubos de fermentación con caldo lactosado o BDG y tubos con caldo EC.

Transferir 1 ml de las diluciones decimales apropiadas a -



los tubos con caldo lactosado e incubar a 35°C por 24 horas. De los tubos positivos, (los que presenten producción de gas), inocular los tubos con caldo EC. Incubar a 44.5°C durante 24 horas. Se considera positiva la prueba cuando hay producción de gas - en cualquier cantidad a las 24 horas o antes de ese lapso. (2).

#### 5) Técnica.

Adicionar pequeñas cantidades de la muestra a frascos de - 10 a 15 ml de triptona o caldo nutriente similar, que contenga - 0.5% de bilis. Incubar durante 12 h. a 44.5°C y hacer la prueba para el indol. Un resultado positivo es una prueba presuntiva - positiva de E. coli. Colocar los cultivos en gelosa MacConkey - para tener una prueba parcialmente confirmativa. (2).

#### 6) Método de filtro de membrana.

Filtrar un tubo con crecimiento, previamente sembrado en - EDG o caldo lactosado y enjuagar bien con agua estéril. Colocar el filtro sobre un disco absorbente impregnado en el medio M- base para caldo EC. Incubar a 44.5°C colocando las cajas dentro de una bolsa de plástico que pueda cerrarse hermeticamente. -- Leer a las 24 horas. Se examinan las colonias observándolas con ayuda de un microscopio binocular, las colonias de coliformes - fecales son azules de 1 a 3 mm de diámetro.

Ventajas.- La rapidez con que puede obtenerse los resulta - dos, en particular el recuento de E. coli; la economía pues re - quiere menor cantidad de medio de cultivo, personal y material - de cristalería.

Inconvenientes.- La membrana no puede utilizarse para mues - tras muy turbias pues se bloquea antes de filtrar una cantidad suficiente, y cuando la muestra contiene pocos gérmenes colifor

nes y existen muchos no coliformes capaces de proliferar en el medio usado, estos últimos pueden extenderse por toda la membrana e impedir el crecimiento de los gérmenes coliformes. La membrana tampoco es adecuada cuando en el agua predominan gérmenes no productores de gas y fermentadores de lactosa, pues en éstos casos se obtiene una alta proporción de resultados positivos falsos. (3).

7) Técnica de filtro de membrana con incubación previa.

Se filtran cantidades conocidas de las muestras a través de filtros de membranas de 0.45 milimicras y los filtros se colocan en cajas de Petri de plástico las cuales contienen un disco absorbente saturado con 2 ml del medio VFC (medio para revivificación) y se mantienen a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  1, 2 o 3 días. Después del periodo de almacenaje los filtros se quitan del medio VFC y se colocan en cajas de Petri de plástico con un disco absorbente saturado con caldo MFC (medio selectivo de crecimiento para coliformes fecales). Se incuban en baño de agua a  $44.5^{\circ}\text{C} \pm 2$  horas. Después de este periodo de incubación las colonias típicas se cuentan empleando un microscopio binocular.

El medio VFC consta de casitona exenta de vitaminas, benzoato de sodio, sulfanilamida, etanol (95%) y el pH final de este medio es 6.7. (10).

8) Prueba para coliformes fecales en alimentos espaciales.

Primero se clasifican los alimentos en lotes y después se hace un muestreo para obtener la muestra y se hacen las diluciones adecuadas para efectuar el análisis.

Un ml de la muestra se transfiere a 10 tubos con caldo -

lauril sulfato triptosa y se incuban a 35°C por 24 horas. Una gota de caldo de cada tubo positivo se transfiere con pipeta a tubos de fermentación con caldo EC y se incuban a  $45.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  24 horas. La incubación se hace a una temperatura constante. El contenido de los tubos positivos (con producción de gas) se vierte a placas de gelosa eosina azul de metileno Levine y se incuban a 35°C 24 ± 2 horas.

Dos colonias típicas de cada placa de eosina azul de metileno se transfieren a placas con gelosa inclinada y se incuban a 35°C 24 horas. Las colonias que crecieron en gelosa inclinada se confirman para tipos de E. coli a través del establecimiento de los patrones conocidos para el procedimiento IMVIC (patron de ++ --o' +--) donde se consideraron confirmadas E. coli tipo I y II. La confirmación de la presencia de un sólo tipo es causa suficiente para rechazar el lote de alimentos. (11).

Discrepancias en la enumeración de Escherichia coli.

Las células de E. coli en fase estacionaria fueron enumeradas por el método de verter en placa en gelosa soya tripticosa - conteniendo 0.3 % de extracto de levadura (TSYA), gelosa bilis rojo violeta (VRBA) y gelosa lactosa desoxicolato (DLA) y por el método del número más probable en caldo bilis verde brillante (BGB) y caldo lauril sulfato (LSB).

Las máximas cuentas se observan en aquellos en los que se usó TSYA. En general, los números obtenidos fueron más bajos con el medio selectivo sólido VRBA y DLA, y más alto con el medio selectivo líquido BGB y LSB.

Los efectos inhibitorios, especialmente en el medio sólido, varían con el tipo de E. coli. El número más bajo en el medio sólido

lido se debió particularmente a la temperatura del medio fundido usado en el método de las placas fundidas.

La determinación en el medio sólido selectivo mejorado, se llevo a cabo usando 1 % de sólidos de leche no grasos, 1 % de peptona ó 1 % de  $K_2SO_4 \cdot 7H_2O$ . (12).

Enumeración de *Escherichia coli* en muestras congeladas, después de la recuperación de las células dañadas.

Más del 90 % de las células supervivientes de *E. coli* se dañaron después del congelamiento en aguas a  $-78^{\circ}C$ .

Las células dañadas se determinaron por su habilidad para formar colonias en gelosa soya tripticasa con extracto de levadura pero no sobre gelosa bilis rojo violeta y gelosa lactosa-desoxicolato.

El dañado por congelación se pudo contrarrestar rápidamente en medio de caldo soya tripticasa con extracto de levadura (TSYB).

Las células recuperadas formaron colonias en gelosa bilis rojo violeta y gelosa lactosa desoxicolato y no fueron inhibidas por caldo bilis verde brillante y caldo lauril sulfato.

Por lo menos 90 % de las células que se recuperaron en TSYB durante 30 minutos de 20 a  $45^{\circ}C$  empezaron a multiplicarse en 2 horas a  $25^{\circ}C$ .

Cuando las células se congelaron en diferentes alimentos, del 60 a 90 % de las supervivientes resultaron ser dañadas. La recuperación de las células dañadas ocurrió en los alimentos durante 1 hora a  $25^{\circ}C$ , pero generalmente la recuperación fue mayor y más reproducible cuando los alimentos se incubaron en TSYB.

El estudio indicó que la recuperación de bacterias coliformes dañadas por la congelación pudo realizarse antes de que tales células fueran expuestas a un medio selectivo para su enumeración. (13).

## CAPITULO 5

### DETERMINACION DE COLIFORMES FECALES EN VERDURAS Y RESULTADOS.

Las verduras utilizadas fueron: lechuga, rábano y cilantro. En México estas verduras son de gran consumo y a su vez son la causa de enfermedades entéricas ya que se encuentran sumamente contaminadas. Dicha contaminación proviene, como ya dijimos anteriormente, de los riegos con las aguas residuales, las cuales aportan los microorganismos. Luego las verduras son llevadas al mercado donde la gente las compra y consume sin darles un tratamiento adecuado, ya sea por ignorancia o por falta de asepsia y vienen como consecuencia las enfermedades.

La técnica utilizada para el análisis de las verduras fue la siguiente:

Pesar 11 g de la muestra. En el caso de la lechuga tomar para el análisis la primera hoja de las que se consideren como comestibles por el grueso de la población. En el caso de los rabanos pelarlos y analizar sólo el exterior. El cilantro como se come todo se analizó tal como llega.

Colocar en la licuadora 99 ml de agua peptonada al 0.1 % y a continuación los 11 g de la muestra. Licuar durante 1 min o 1 1/2 min.

Dejar transcurrir unos 5 min y tomar del sobrenadante para hacer la dilución. Tomar 1 ml y colocarlo en un tubo con 9 ml de agua peptonada, homogeneizar perfectamente sorbiendo y soplando varias veces para continuar con las diluciones, ese tubo corresponde a la dilución  $10^{-2}$ , tomar de ahí 1 ml y colocar en otro tubo y repetir las operaciones para homogeneizar, continuar hasta tener la dilución  $10^{-6}$ .

Colocar 1 ml de la dilución  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , y  $10^{-6}$  en 5 tubos (es decir 5 tubos con 1 ml de cada dilución, 20 tubos en total).

Incubar 24 o 48 h a  $35^{\circ}\text{C}$ . Leer los tubos positivos de cada dilución y anotar los resultados.

Resembrar de cada serie de tubos positivos en caldo EC. Forme una aseada del tubo seleccionado.

Se deben seleccionar todos los tubos positivos de cada dilución para hacer la prueba confirmatoria.

Incubar a baño maría 24 h a  $45.5^{\circ}\text{C}$ .

Ver si los tubos son positivos.

Leer en las tablas el número más probable de coliformes - que si se confirma que son de origen fecal por aparición de gas en el caldo EC nos dan el número más probable de coliformes fecales por 100 ml de muestra.

Resultados.

Se analizaron 90 muestras de verduras entre lechuga (L), - rábanos (R) y cilantro (C), las cuales fueron obtenidas de diferentes mercados y unas pocas de casas.

Los resultados del análisis están clasificados en cuatro tablas:

La primera tabla consta de 42 muestras (obtenidas de mercados) que resultaron ser de origen fecal.

La segunda tabla consta de 40 muestras (obtenidas de mercados) que resultaron ser de origen no fecal.

La tercera tabla consta de 5 muestras (obtenidas de casas) que resultaron ser de origen fecal.

La cuarta tabla consta de 3 muestras (obtenidas de casas)-

que resultaron ser de origen no fecal.

En cada tabla estén indicados el tipo de muestra (L,R y C), el número de tubos que resultaron positivos en el caldo lactosado por cada dilución, el número de tubos positivos en el caldo EC y el valor obtenido en tablas del número más probable de coliformes (NMP).



TABIA 1

Resultados de las muestras analizadas, obtenidas de mercados, y -  
que por dichos resultados se puede decir que el número más pro-  
bable de microorganismos coliformes encontrados son de origen -  
fecal.<sup>1</sup>

Número	Muestra	Tubos posi- tivos en caldo- lactosado de cada dilución	Tubos posi- tivos en caldo- EC.	N M P X 100 ml de muestra.
1	L	5-3-1-0	5-3-1	11 X 10 <sup>5</sup>
2	C	5-3-2-1	5-3-2-1	17 X 10 <sup>5</sup>
3	L	4-4-3-1	4-4-3-1	33 X 10 <sup>5</sup>
4	L	5-5-1-1	5-5-1-1	46 X 10 <sup>5</sup>
5	R	5-5-4-4	5-5-4-4	350 X 10 <sup>5</sup>
6	C	5-5-4-4	5-5-4-4	350 X 10 <sup>5</sup>
7	C	5-5-5-3	5-5-5-3	920 X 10 <sup>5</sup>
8	C	5-5-5-4	5-5-5-4	1600 X 10 <sup>5</sup>
9	L	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
10	C	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
11	C	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
12	C	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
13	C	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
14	C	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
15	C	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
16	C	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
17	R	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
18	R	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
19	R	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
20	R	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>

Número	Muestra	Tubos positivos en caldo-lactosado de cada dilución	Tubos positivos en caldo-EC.	N M P X 100 ml de muestra.
21	C	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
22	L	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
23	L	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
24	L	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
25	L	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
26	L	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
27	L	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
28	L	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
29	R	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
30	R	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
31	R	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
32	R	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
33	R	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
34	C	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
35	C	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
36	L	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
37	L	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
38	L	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
39	L	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
40	L	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
41	R	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>
42	C	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>5</sup>

N M P = Número más probable de microorganismos (dato obtenido en tablas).

L = Lechuga.

R = Rabano.

C = Cilantro.

1. La producción de gas en tubos de fermentación con caldo EC a  $44.5^{\circ}\text{C}$  por 24 horas en baño maría, constituye una prueba positiva de que los microorganismos coliformes son de origen fecal. La ausencia de gas nos indicará que no son de origen fecal.

TABLA 2

Resultados de las muestras analizadas, obtenidas de mercados, y - que por dichos resultados se puede decir que el número más probable de microorganismos coliformes encontrados son de origen - no fecal.

Número	Muestra	Tubos positivos en caldo-lactosado de cada dilución	Tubos positivos en caldo-EC.	N M P x 100 ml de muestra.
1	L	1-0-0-0-0	0-----	$2 \times 10^5$
2	R	1-0-0-0-0	0-----	$2 \times 10^5$
3	L	5-1-0-0	0-0----	$2 \times 10^5$
4	L	5-2-0-0	0-0----	$4.5 \times 10^5$
5	L	5-5-0-0	0-0----	$23 \times 10^5$
6	C	5-3-3-3	0-0-0-0	$28 \times 10^5$
7	L	5-4-3-2	0-0-0-0	$39 \times 10^5$
8	L	5-4-4-2	0-0-0-0	$47 \times 10^5$
9	L	5-5-3-2	0-0-0-0	$140 \times 10^5$
10	L	5-5-5-3	0-0-0-0	$920 \times 10^5$
11	C	5-5-5-3	0-0-0-0	$920 \times 10^5$
12	C	5-5-5-3	0-0-0-0	$920 \times 10^5$
13	L	5-5-5-4	0-0-0-0	$1600 \times 10^5$
14	R	5-5-5-4	0-0-0-0	$1600 \times 10^5$
15	R	5-5-5-4	0-0-0-0	$1600 \times 10^5$
16	L	5-5-5-4	0-0-0-0	$1600 \times 10^5$
17	C	5-5-5-4	0-0-0-0	$1600 \times 10^5$
18	L	5-5-5-5	0-0-0-0	$2400 \times 10^5$
19	R	5-5-5-5	0-0-0-0	$2400 \times 10^5$
20	R	5-5-5-5	0-0-0-0	$2400 \times 10^5$

Número	Muestra	Tubos positivos en caldo-lactosado de cada dilución	Tubos positivos en caldo-NC.	M.P.P. x 100 ml de muestra.
21	R	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
22	R	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
23	L	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
24	L	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
25	L	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
26	L	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
27	L	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
28	R	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
29	R	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
30	R	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
31	R	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
32	C	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
33	C	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
34	C	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
35	R	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
36	R	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
37	L	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
38	L	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
39	L	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>
40	C	5-5-5-5	0-0-0-0	2400 x 10 <sup>5</sup>

L = Lechuga, R = Rúfano, C = Cilantro y M.P.P. = Número más probable de microorganismos.

TABLA 3

Resultados de las muestras analizadas, obtenidas de casas, y que por dichos resultados se puede decir que el número más probable de microorganismos coliformes encontrados son de origen fecal.

Número	Muestra	Tubos positivos en caldo-lactosado de cada dilución	Tubos positivos en caldo-EC.	NMP X 100 ml de muestra.
1	L	5-5-4-4	5-5-4-4	1600 X 10 <sup>4</sup>
2	L	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>4</sup>
3	L	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>4</sup>
4	L	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>4</sup>
5	R	5-5-5-5	5-5-5-5	2400 X 10 <sup>4</sup>

L = Lechuga, R = Rabano, C = Cilantro y NMP = Número más probable de microorganismos.

TABLA 4

Resultados de las muestras analizadas, obtenidas de casas, y que por dichos resultados se puede decir que el número más probable de microorganismos coliformes encontrados son de origen no fecal.

Número	Muestra	Tubos positivos en caldo-lactosado de cada dilución	Tubos positivos en caldo-EC.	NMP X 100 ml de muestra.
1	L	5-5-0-0	0-0----	$23 \times 10^4$
2	L	5-5-5-5	0-0-0-0	$2400 \times 10^4$
3	R	5-5-5-5	0-0-0-0	$2400 \times 10^4$

L = Lechuga, R = Rabano, C = Cilantro y NMP = Número más probable de microorganismos.

## CAPITULO 6

### ESTUDIO ESTADISTICO Y CONCLUSIONES.

Para poder interpretar los resultados obtenidos se hará un análisis de varianza para dos variables de clasificación de medidas repetidas, es decir que se buscará la diferencia entre dichas variables y entre sus interacciones.

Una variable será debida al origen de los microorganismos-contaminantes o sea entre los de origen fecal y los de origen no fecal. La otra variable será debida a la procedencia de las verduras, es decir si son de mercado o de casa. Las interacciones serán las diferencias que pueda haber entre las combinaciones de ambas variables.

Para efectuar este estudio partiremos de tres hipótesis;

Hipótesis 1. No hay diferencias entre las muestras de mercado y las de casa.

Hipótesis 2. No hay diferencias entre las muestras contaminadas por microorganismos coliformes de origen fecal y las contaminadas por microorganismos coliformes de origen no fecal.

Hipótesis 3. No hay diferencias entre las muestras de mercado, casa, las contaminadas con coliformes fecales y las contaminadas con coliformes no fecales (o sea las interacciones).

Una vez establecidas las hipótesis colocaremos los datos del NMP (número más probable) de microorganismos, obtenidos en el análisis, en una tabla (tabla 5) donde estarán en las filas la variable mercado-casa y en las columnas la variable coliformes fecales-coliformes no fecales.



TABLA 5

Totales de microorganismos coliformes por 100 ml, de las filas y de las columnas.

	Número de microorganismos coliformes de origen fecal.	Número de microorganismos coliformes de origen no fecal.
Número de microorganismos coliformes de las muestras de mercado.	11 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>5</sup>
	17 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>5</sup>
	33 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>5</sup>
	46 x 10 <sup>5</sup>	45 x 10 <sup>4</sup>
	35 x 10 <sup>6</sup>	23 x 10 <sup>5</sup>
	35 x 10 <sup>6</sup>	28 x 10 <sup>5</sup>
	92 x 10 <sup>6</sup>	39 x 10 <sup>5</sup>
	16 x 10 <sup>7</sup>	47 x 10 <sup>5</sup>
	24 x 10 <sup>7</sup>	14 x 10 <sup>6</sup>
	24 x 10 <sup>7</sup>	92 x 10 <sup>6</sup>
	24 x 10 <sup>7</sup>	92 x 10 <sup>6</sup>
	24 x 10 <sup>7</sup>	92 x 10 <sup>6</sup>
	24 x 10 <sup>7</sup>	16 x 10 <sup>7</sup>
	24 x 10 <sup>7</sup>	16 x 10 <sup>7</sup>
	24 x 10 <sup>7</sup>	16 x 10 <sup>7</sup>
	24 x 10 <sup>7</sup>	16 x 10 <sup>7</sup>
	24 x 10 <sup>7</sup>	24 x 10 <sup>7</sup>
	24 x 10 <sup>7</sup>	24 x 10 <sup>7</sup>
	24 x 10 <sup>7</sup>	24 x 10 <sup>7</sup>
	24 x 10 <sup>7</sup>	24 x 10 <sup>7</sup>

Número de microorganismos coliformes de origen fecal.

Número de microorganismos coliformes de origen no fecal.

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^2$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$24 \times 10^7$

$6\ 624\ 354 \times 10^3$

$24 \times 10^7$

$8\ 492\ 700 \times 10^3$

$16 \times 10^6$

$23 \times 10^4$

Número de microorganismos coliformes de las muestras de casa.	Número de microorganismos coliformes de origen fecal.	Número de microorganismos coliformes de origen no fecal.
	$24 \times 10^6$	$24 \times 10^6$
	$24 \times 10^6$	$24 \times 10^6$
	$24 \times 10^6$	<u><math>48\ 230 \times 10^3</math></u>
	<u><math>24 \times 10^6</math></u>	
	$112\ 000 \times 10^3$	

---

TABLA 6

Totales de totales de microorganismos coliformes por 100 ml .

	Número de microorganismos coliformes de origen fecal.	Número de microorganismos coliformes de origen no fecal	Sumas de los totales de las filas.
Número de microorganismos coliformes de las muestras de mercado.	$8\ 492\ 700 \times 10^3$	$6\ 624\ 354 \times 10^3$	$15\ 117\ 054 \times 10^3$
Número de microorganismos coliformes de las muestras de casa.	$112\ 000 \times 10^3$	$48\ 230 \times 10^3$	$160\ 230 \times 10^3$
Sumas de los totales de las columnas.	$8\ 604\ 700 \times 10^3$	$6\ 672\ 584 \times 10^3$	$15\ 277\ 284 \times 10^3$

TABLA 7  
Análisis de la varianza.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio.
Entre 4 medias	224 337 332 014x10 <sup>6</sup>	3	74 779 110 671x10 <sup>6</sup>
Dentro de grupos	1 120 281 249 876x10 <sup>6</sup>	86	13 026 526 161x10 <sup>6</sup>
Total	1 344 618 581 890x10 <sup>6</sup>	89	

TABLE 8  
Análisis de la varianza.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón de F
Media de filas.	196 821 079 410x10 <sup>6</sup>	1	196 821 079 410x10 <sup>6</sup>	15.1
Media de columnas	17 482 574 087x10 <sup>6</sup>	1	17 482 574 087x10 <sup>6</sup>	1.3
Interacción	10 033 678 517x10 <sup>6</sup>	1	10 033 678 517x10 <sup>6</sup>	0.7
Subtotal	224 337 352 014x10 <sup>6</sup>	3		
Dentro de los grupos	1 120 281 249 876x10 <sup>6</sup>	86	13 026 526 161x10 <sup>6</sup>	
Total	1 344 618 581 890x10 <sup>6</sup>	89		

Para interpretar los resultados del análisis de varianza se comparan los valores calculados de la razón de  $F$  con el valor de la razón de  $F$  obtenido en una tabla de distribución  $F$ , para un determinado nivel de significancia.

Cuando la razón de  $F$  calculada es mayor que la obtenida en la tabla, se rechaza la hipótesis.

Cuando la razón de  $F$  calculada es menor que la obtenida en la tabla, se acepta la hipótesis.

El valor de la razón de  $F$  obtenido en tablas, para un nivel de significación de 5 % fue de  $F_{.95}(1.80) = 3.96$ .

Para los efectos de las filas (mercado-casa) obtuvimos que la razón de  $F$  fue de 15.1 y como el valor de  $F_{.95}(1.80) = 3.96$ , el valor de  $F$  es significativo para un nivel de 5 % y por lo tanto rechazamos la hipótesis de no hay diferencias entre las muestras de mercado y las de casa, es decir que sí hay diferencias.

Para los efectos de las columnas (coliformes de origen fecal y coliformes de origen no fecal) la razón de  $F$  fue de 1.3 y como el valor de  $F_{.95}(1.80) = 3.96$ , el valor de  $F$  no es significativo para un nivel de 5 % y por lo tanto se acepta la hipótesis de no hay diferencias entre las muestras contaminadas por microorganismos coliformes de origen fecal y las contaminadas por microorganismos coliformes de origen no fecal.

Para los efectos de las interacciones (mercado-casa-coliformes fecales-coliformes no fecales) el valor de  $F$  fue de 0.7 y como el valor de  $F_{.95}(1.80) = 3.96$ , el valor de  $F$  no es significativo para un nivel de 5 % y por lo tanto se acepta la hipótesis de no hay diferencias entre las muestras de mercado, casa, las contaminadas con coliformes fecales y las contaminadas con coliformes

no fecales (o sea las interacciones).

Comprobación de los resultados obtenidos en el estudio estadístico.

Para comprobar los resultados obtenidos mediante el análisis de varianza para dos variables de clasificación de medias repetidas, se seleccionaron al azar 5 muestras procedentes de mercados, contaminadas con microorganismos coliformes de origen fecal; 5 muestras procedentes de mercado, contaminadas con microorganismos coliformes de origen no fecal; 5 muestras procedentes de casa contaminadas con coliformes fecales y 5 muestras procedentes de casa contaminadas con coliformes no fecales. Esta selección de muestras tiene por objeto realizar nuevamente el mismo análisis de varianza, pero ahora con medidas repetidas iguales y ver si se obtienen los mismos resultados.

Para poder tener las 5 muestras de casa contaminadas con coliformes no fecales, complete las dos muestras faltantes con los resultados de otra compañera.

En esta comprobación partimos de las mismas hipótesis,

Hipótesis 1. No hay diferencias entre las muestras de mercado y las de casa.

Hipótesis 2. No hay diferencias entre las muestras contaminadas por coliformes de origen fecal y las contaminadas por coliformes de origen no fecal.

Hipótesis 3. No hay diferencias entre las muestras de mercado, casa, las contaminadas con coliformes fecales y las contaminadas con coliformes no fecales.

A continuación tendremos las tablas con los resultados obtenidos en cada paso.



TABLA 9

Totales de microorganismos coliformes por 100 ml, de las filas y de las columnas.

	Número de microorganismos coliformes de origen fecal.	Número de microorganismos coliformes de origen no fecal
Número de microorganismos coliformes de las muestras de mercado.	$11 \times 10^6$ $46 \times 10^6$ $92 \times 10^6$ $16 \times 10^7$ $24 \times 10^7$ <hr/> $497\ 700 \times 10^3$	$2 \times 10^5$ $45 \times 10^4$ $92 \times 10^6$ $16 \times 10^7$ $24 \times 10^7$ <hr/> $492\ 452 \times 10^3$
Número de microorganismos coliformes de las muestras de casa.	$16 \times 10^6$ $24 \times 10^6$ $24 \times 10^6$ $24 \times 10^6$ $24 \times 10^6$ <hr/> $112\ 000 \times 10^3$	$23 \times 10^4$ $34 \times 10^4$ $24 \times 10^6$ $24 \times 10^6$ $24 \times 10^6$ <hr/> $72\ 578 \times 10^3$

TABLA 10

Totales de totales de microorganismos coliformes por 100 ml.

	Número de microorganismos coliformes de origen fecal.	Número de microorganismos coliformes de origen no fecal	Sumas de los totales de las filas.
Número de microorganismos coliformes de las muestras de mercado.	$497\ 700 \times 10^3$	$492\ 482 \times 10^3$	$990\ 182 \times 10^3$
Número de microorganismos coliformes de las muestras de casa.	$112\ 000 \times 10^3$	$72\ 570 \times 10^3$	$184\ 570 \times 10^3$
Sumas de los totales de las columnas.	$609\ 700 \times 10^3$	$565\ 022 \times 10^3$	$1\ 174\ 722 \times 10^3$

TABLA 11  
Análisis de la varianza.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio.
Entre 4 medias	$32\ 605\ 536\ 496 \times 10^6$	3	$10\ 868\ 512\ 165 \times 10^6$
Dentro de grupos	$86\ 034\ 615\ 644 \times 10^6$	16	$5\ 377\ 163\ 477 \times 10^6$
Total	$118\ 640\ 152\ 140 \times 10^6$	19	

TABLA 13  
Análisis de la varianza.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón de F
Media de filas.	32 448 117 936.4x10 <sup>6</sup>	1	32 448 117 936.4x10 <sup>6</sup>	6
Media de columnas	99 806 184.4x10 <sup>6</sup>	1	99 806 184.4x10 <sup>6</sup>	0.01
Interacción	57 612 375.2x10 <sup>6</sup>	1	57 612 375.2x10 <sup>6</sup>	0.01
Subtotal	32 605 536 496.0x10 <sup>6</sup>	3		
Dentro de los grupos	86 034 615 644.0x10 <sup>6</sup>	16	5 377 163 477.0x10 <sup>6</sup>	
Total	118 640 152 140.0x10 <sup>6</sup>	19		

El valor de la razón de F obtenido en tablas, para un nivel de significación de 5% es de  $F_{.95}(1,16) = 4.49$ .

Para los efectos de las filas (mercado-casa) se obtuvo que la razón F fue de 6.03 y como el valor de  $F_{.95}(1,16) = 4.49$ , el valor de F es significativo para un nivel del 5% y por lo tanto rechazamos la hipótesis de no hay diferencias entre las muestras de mercado y las de casa, es decir que sí hay diferencias.

Para los efectos de las columnas (coliformes de origen fecal y coliformes de origen no fecal) la razón de F fue de 0.01 y como el valor de  $F_{.95}(1,16) = 4.49$ , el valor de F no es significativo para un nivel de 5% y por lo tanto aceptamos la hipótesis de no hay diferencias entre las muestras contaminadas por microorganismos coliformes de origen fecal y las contaminadas por microorganismos coliformes de origen no fecal.

Para los efectos de interacción (mercado-casa-coliformes fecales-coliformes no fecales) el valor de F fue de 0.01 y como el valor de  $F_{.95}(1,16) = 4.49$ , el valor de F no es significativo para un nivel de 5% y por lo tanto se acepta la hipótesis de no hay diferencias entre las muestras de mercado, casa, las contaminadas con coliformes fecales y las contaminadas con coliformes no fecales.

Como se podrá ver, los resultados obtenidos usando el análisis de varianza con dos variables de clasificación de medidas repetidas iguales, coinciden con los resultados obtenidos utilizando el mismo tipo de análisis pero de medidas repetidas diferentes. Por lo que podemos concluir que el método aplicado en el estudio estadístico fue correcto.

### Conclusiones.

Las muestras analizadas fueron obtenidas la mayor parte de diferentes mercados, aunque la mayoría de los vendedores de las verduras se abastecen principalmente de la Verced y de Jamaica. Las demás muestras se obtuvieron de algunas casas que aunque eran compradas en los mercados, se quería ver si en éstas habían realizado algún tratamiento o no antes de consumirlas.

Una vez realizado el análisis se encontró que no hubo diferencias significativas entre las cantidades de microorganismos coliformes que resultaron ser de origen fecal y los de origen no fecal, es decir que el NMP (número más probable) de coliformes en las muestras fue casi el mismo entre las muestras que tienen coliformes fecales y las que tienen coliformes no fecales.

También se encontró que aproximadamente la mitad de las muestras analizadas estaban contaminadas con coliformes fecales y la otra mitad con coliformes no fecales.

En la comparación entre las muestras procedentes de mercados y las procedentes de algunas casas, se observó que la contaminación fecal es un poco mayor en las muestras procedentes de los mercados que en las muestras procedentes de algunas casas.

De lo anterior podemos pensar que las muestras de algunas casas quizás han recibido un tratamiento, pero muy ligero, puesto que si es cierto que disminuye un poco la contaminación de los microorganismos coliformes, no deja de ser considerable e importante la cantidad de éstos microorganismos que permanecen en las verduras (lechuga, rábano y cilantro, que fueron las analizadas) que son consumidas.

En vista de los resultados obtenidos es conveniente recomendar:

1. que en las casas, las verduras que se consuman crudas se sometan a un tratamiento de desinfección más profundo que el acostumbrado, para que elimine la mayor parte de los microorganismos contaminantes, con el fin de evitar enfermedades posteriores causadas por dichos microorganismos.

2. Aunque no se hizo un análisis del agua de riego, se sabe que esta agua es una de las principales fuentes de la contaminación fecal por lo que se podría recomendar que el agua que se emplea para regar las verduras, un mes antes de cosecharlas, sea lo más pura posible.

BIBLIOGRAFIA.

1. Smith y Conant. Microbiología de Zinsser. 3a edición. - U.T.E.H.A. (1967).
2. Collins, C.H. Microbiological Methods. Second Edition. - London Butterworths. (1967).
3. Organización Mundial de la Salud. Normas Internacionales para el Agua Potable. 3a ed. Ginebra. (1972).
4. Hoch, Viola. (Inst. Ernährungswiss, Budapest, Hung.). E. coli 1. und ihre Bedeutung bei ernährungshygienischen Untersuchungen. Zentralbl Bakteriell Parasitenk infek tionskrankh Hyg Abt 1 Orig 215 (1), 137-141 illus. (1970).
5. Selenka, F. (Hyg. Bakteriell Inst; Univ Erlangen-Nurnberg, Erlangen-Nurnberg, West Ger.). Hygienic Bacteriological. Arch Hyg. Bakteriell 136 (718), 660-666. (1967).
6. Frazier W.C. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia. (1972).
7. Stuart J. M. Recommended Methods for the Microbiological Examination of Foods. Second Edition. American Public Health Association, Inc. (1966).
8. Microbiological and Clinical Laboratory Procedures. Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents. - Ninth edition. Difco Laboratories. Detroit 1, Michigan. (1953).
9. Difco Supplementary Literature. Difco Laboratories. Detroit 1, Michigan U.S.A. (1966).
10. Raymond H. Taylor, Robert M. Gardner, and Pasquale V. Scarpino. Delayed-Incubation Membrane-Filter Test for Fecal Coliforms. Applied Microbiology. 25 No.3:363-366.



(1973).

11. N. D. Meidelbaugh, D. B. Rowley, E. M. Powers, C. T. Boverland, and J. L. McQueen. Microbiological Testing of Skylab Foods. *Applied Microbiology*. 25 (1), 55-61. (1973).
12. B. Ray and P. L. Speck. Discrepancies in the Enumeration of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology*. 25 (4), 494-498. (1973).
13. B. Ray and P. L. Speck. Enumeration of *Escherichia coli* in Frozen Samples After Recovery from Injury. *Applied Microbiology*. 25 (4), 499-503. (1973).
14. Robert S. Breed, D. C. Murray, N. R. Smith. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Seventh edition. Williams and Wilkins Company. (1957).
15. Dixon y Massey. *Introducción al Análisis Estadístico*. 2a edición. McGraw-Hill. (1970).