

47
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES



ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS MEDIOS DE CULTIVO EC Y A-1 PARA LA DETERMINACION DE COLIFORMES FECALES EN VERDURAS FRESCAS

TESIS CON FALSA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA: MA. ELENA URBANO NAVARRETE





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 está 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.

INDICE

	Pag
I INTRODUCCION	1
II OBJETIVOS	1
III GENERALIDADES	
1. INDICADORES MICROBIOLÓGICOS DE LOS ALIMENTOS	3
2. FECALISMO Y FUENTES DE CONTAMINACION	7
3. MICROORGANISMOS RELACIONADOS CON INFECCIONES GASTROINTESTINALES	11
4. TÉCNICAS BACTERIOLÓGICAS PARA LA EVALUACION DE COLIFORMES FECALES EN AGUA Y ALIMENTOS	14
IV JUSTIFICACION	18
V HIPOTESIS	19
VI METODOLOGIA EXPERIMENTAL	20
VII RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO	25
VIII DISCUSION DE RESULTADOS	44
IX CONCLUSIONES	49
X ANEXO	51
XI. BIBLIOGRAFIA	55

I INTRODUCCION

Fue a principios de este siglo cuando la detección y cuantificación de bacterias patógenas en el agua fue motivo de laboriosa tarea y el concepto de utilizar organismos indicadores microbianos para inferir la presencia o ausencia de estos organismos fue adoptado (4)(13)

El empleo de microorganismos indicadores tiene su origen ante la necesidad de llevar a cabo el control de la potabilidad del agua manejándose para tal propósito por primera vez aparentemente en 1893. Algunos miembros del grupo coliforme han sido históricamente utilizados para demostrar la contaminación o producción de condiciones insalubres en la preparación de una variedad de alimentos y bebidas.

Los indicadores microbianos son un grupo de gérmenes de numeración más fácil y cuya presencia en cierto número se considera como una indicación de que el producto estuvo expuesto a condiciones que pudieran determinar la llegada a la misma de microorganismos peligrosos y/o permitir la proliferación de especies patógenas (22)

Los indicadores de la calidad sanitaria del agua que se utilizan más ampliamente desde 1890 han sido las bacterias coliformes. Coliforme es un término general que se da a las bacterias Gram negativas, facultativas, que no forman esporas, móviles e inmóviles y que fermentan la lactosa con producción de gas en 24 a 48 horas a 35 °C. Habitan en el tracto intestinal del hombre y los animales de sangre caliente, sin causar generalmente enfermedades gastrointestinales (12)

Sin embargo, con el paso de los años, muchos estudios mostraron que la utilización de microorganismos coliformes como indicadores de calidad sanitaria del agua, pueden ser indicadores falsos en relación a los daños que pudieran ocasionar a la salud del hombre, ya que la correlación de éstos coliformes con la contaminación fecal, suele no ser adecuado, debido a que no son específicos de materia fecal. Así pues, la especie Escherichia coli, que pertenece al grupo de coliformes se consideró como el indicador de contaminación fecal más delicado y certero. (24)

Segun Houston lo considero como. " El examen del microorganismo Escherichia coli es el más práctico y delicado para detectar contaminación fecal y debe ser tomado como el indicador más real de un posible daño a la salud, esta prueba jamás se deberá omitir, y no se podrá dar ninguna evidencia de contaminación fecal sin que se hayan evaluado esta bacteria. (31)

El microorganismo Escherichia coli es un bacilo del colon, y es el predominante dentro de las especies facultativas que habitan en el intestino grueso. Su presencia en el agua indica contaminación de origen fecal, por lo que las pruebas que determinan su presencia se utilizan ampliamente en los laboratorios de Salud Pública. (12)

En alimentos, la presencia del microorganismo Escherichia coli es generalmente el indicador preferido de contaminación de relativamente reciente origen fecal, o un sustrato en el cual ocurrió la proliferación de Escherichia coli y otros microorganismos patógenos asociados, si estos se encontraban presentes. Para la seguridad de la calidad sanitaria de un alimento, la presencia de la especie Escherichia coli, generalmente garantiza mayor peligro que la presencia de otros coliformes. (29) Antes de 1945, los bacteriólogos habían advertido que a menudo las heces de los niños enfermos de gastroenteritis, contenían un cultivo casi puro del microorganismo Escherichia coli y le quisieron atribuir a un papel patógeno, pero por la individualización precisa de las diversas especies fue imposible en aquella época. Bray y Seaven en 1945, lograron aislar la misma especie de Escherichia coli que había sido la causante de un epidemia en 1945. Casi al mismo tiempo Giles y Sangster, publicaron un notable estudio sobre una epidemia en Aberdeen, Estados Unidos, en niños menores de un año. La mortalidad de estos 92 casos fue del 56% y en todas las heces se encontró el microorganismo Escherichia coli presente. (34)

Es de especial importancia señalar que los adultos que se infectan por este microorganismo se vuelven portadores por cortos periodos y por lo tanto son potencialmente peligrosos para cualquier niño con quien se puedan asociar. (29) Ahora bien, si se toma en cuenta que el microorganismo Escherichia coli no es el único organismo que forma parte de las bacterias coliformes fecales, sino que hay otros tipos que pueden predominar más en algunos periodos, se considera que será mejor medir todos los tipos de coliformes fecales que se encuentran en el tracto intestinal. Este nuevo término de coliformes fecales, surge de los intentos de encontrar métodos rápidos para establecer la presencia de la especie Escherichia coli, o variantes estrechamente relacionadas, sin la necesidad de purificar las heces, o aplicar las relativamente costosas pruebas del IMVIC. (35)

Los coliformas fecales son un grupo de microorganismos que se seleccionan mediante la incubación de un inoculo derivado de un medio de enriquecimiento de coliformas, a temperatura más alta de lo normal (44.5 °C). Estas preparaciones generalmente presentan un elevada proporción de microorganismos de la especie *ESCHERICHIA COLI* y son por lo tanto útiles para indicar contaminación de origen fecal (33).

Este grupo está compuesto principalmente por los microorganismos *ESCHERICHIA COLI* y *KLEBSIELLA* sp, encontrándose en heces humanas en un 93 % sobre la población total de microorganismos y en un 93 % en animales de sangre caliente (20). A pesar de que el microorganismo *KLEBSIELLA* sp, se aisló en diarreas de niños, se ha puesto en duda su patogenicidad (12). Esto puede deberse a que el sitio más común de infección de género *KLEBSIELLA* es el tracto urinario (12), aunque se han encontrado también infecciones mayores como bacteremia meningitis y neumonía (34).

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Comparar el método de cuantificación de coliformes fecales utilizando el medio de cultivo "A-1" y el recomendado por la "AOAC" (utiliza caldo de cultivo "EC")

2. OBJETIVOS PARTICULARES

a). Determinar la calidad sanitaria de los siguientes vegetales: berros, cilantro, col, espinacas, lechuga, papalo, perejil, y rábanos.

b). Evaluar si es confiable utilizar cualquiera de los dos métodos para determinar el número más probable de coliformes fecales en los mencionados vegetales

III GENERALIDADES

I.- INDICADORES MICROBIOLÓGICOS DE LOS ALIMENTOS.

La finalidad del uso de indicadores microbianos en los alimentos, es revelar las prácticas de higiene y poner de manifiesto determinadas condiciones de tratamiento o manipulación de los alimentos que pueden suponer un peligro potencial para la salud del hombre (35). Las pruebas de indicadores en alimentos que más se utilizan son:

- a) Microorganismos mesofílicos aerobios totales.
- b) Microorganismos coliformes totales
- c) Microorganismos coliformes fecales.

Microorganismo mesofílicos aerobios.

Se consideran microorganismos mesófilos aquellos que tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 20 y 40°C.

La mayoría de los alimentos, excepto los alimentos fermentados, se consideran no aptos para el consumo cuando tienen un elevado número de microorganismos, aunque estos no sean patógenos y no alteren las características organolépticas del alimento. Las razones son las siguientes.

1.- Recuentos altos indican frecuentemente materias primas contaminadas, limpieza y desinfección no correctas, condiciones inadecuadas de tiempo y temperatura durante la producción, la conservación o una combinación de éstas, y un elevado riesgo de que se desarrollen microorganismos patógenos (34).

2 - Algunas bacterias comunes no consideradas generalmente patógenas (Streptococcus faecalis, Proteus y Pseudomonas), pueden determinar intoxicaciones alimenticias cuando se encuentran presentes en forma viable, en gran número. Las especies patógenas y las sospechosas de serlo casi todas son mesófilicas (34).

3 - Recuentos muy elevados nos indican que el alimento va a deteriorarse muy pronto (32).

En cuanto a los microorganismos coliformes totales, como estos se aislan de diversas fuentes, diferentes a la materia fecal, su presencia en alimentos no indica necesariamente contaminación fecal. Por esto la ausencia de microorganismos coliformes totales solo se asume como un indicador de buenas condiciones sanitarias.

Por otro lado, la especie Escherichia coli es el indicador clásico de la presencia simultánea de bacterias patógenas entericas en los alimentos, entre ellas Salmonella typhi, Salmonella spp., Vibrios, entamoebas, parásitos y virus entéricos. Asimismo, aunque no estén presentes necesariamente gérmenes patógenos, advierte el riesgo de que pueden existir. Por lo tanto, los coliformes fecales tienen una mayor probabilidad de contener organismos de origen fecal, y por ello son indicadores más seguros que los microorganismos coliformes totales (34).

2 - FECALISMO Y FUENTES DE CONTAMINACION.

Se llama fecalismo a la diseminación en el medio ambiente de la materia fecal humana y la transmisión de las formas infectantes frescas hasta lo nuevos huéspedes. No sólo los coliformes fecales se transmiten por el fecalismo, sino también otros organismos tales como los virus polio, diversas enterobacterias (Salmonella, Shigella, Escherichia, etc) y varios protozoos (33)

En los países subdesarrollados, entre los que se encuentra México, es de gran importancia tratar el asunto del fecalismo debido a que de acuerdo a las condiciones insalubres en que vive un gran porcentaje de la población, este problema se acentúa. La materia fecal se disemina en el medio ambiente en diversas formas, cuya importancia relativa es diferente.

- a) Por defecación al aire libre
- b) Por el uso de letrinas inadecuadas
- c) Por drenajes defectuosos
- d) Por riego con aguas negras, y
- e) Por deficiencia de la higiene personal.

La defecación al aire libre es el mecanismo más corriente de diseminación y en muchos países se practica por casi todas las personas que viven en zonas rurales y muchas de las que viven en las ciudades.

Las letrinas teóricamente podrían ser un medio para evitar la diseminación de las formas infectantes, sin embargo, es un hecho que los índices de frecuencia de las parasitosis no se han modificado por las letrinas en los últimos 40 ó 50 años. Las letrinas que existen muchas veces se usan como almacén o gallinero, y cuando se usan para la defecación, regularmente constituyen criaderos de moscas que funcionan como eficientes transmisores mecánicos por lo que constituyen un foco de diseminación para la materia fecal.

Los drenajes defectuosos tienen un papel secundario en la diseminación, pues los defectos no son muy comunes, sin embargo, se registran epidemias que se deben a contaminación de la red de agua potable por drenajes defectuosos (34)

El riego con aguas negras podría desempeñar también un papel importante en la diseminación de ciertas formas infectantes (21). Un estudio que se lleve a cabo en la población de Freshillo (Zacatecas) señaló que las personas de la población que comían verduras y frutas que se riegan con aguas negras, sufrían amibiasis con una frecuencia promedio de 12%, en cambio, las que cultivan las verduras y frutas y que manipulan las aguas negras para la irrigación, presentaron amibiasis en el 44% de los casos, esto señala que es más peligrosa la falta de higiene de frutas y verduras que riegan con estas aguas (21)

La higiene personal deficiente es seguramente el mecanismo más eficiente en la diseminación de las formas infectantes que salen con la materia fecal humana. La escasez de agua entubada, en los domicilios y sanitarios, propicia el que las personas no se laven las manos después de la defecación y este hábito se fija de tal modo que muchas veces se practica a pesar de disponer de las facilidades necesarias. El no lavarse las manos después de la micción también es de gran importancia pues la piel de los genitales muy frecuentemente se contamina con materias fecales (33)

La transferencia de las formas infectantes que se diseminan con la materia fecal hasta un nuevo huésped, se realiza mediante transmisores mecánicos.

1.- Personas o animales, que en forma activa participan en el transporte pero en los cuales el parásito no se reproduce, y

2.- Fomites, o sea agentes inanimados que mecánicamente participan en dicha transferencia.

Las principales personas y animales que participan en el transporte son: a) el manipulador de alimentos; b) la persona sucia, c) las ratas, d) las moscas y e) las cucarachas.

Sin lugar a dudas, el manipulador de alimentos representa el principal mecanismo de transmisión. En muchos países, entre los que se encuentra México aun se observan con frecuencia vendedores ambulantes de alimentos que manipulan los mismos y por su carácter ambulante, no tienen agua para el lavado de sus manos o implementos.

La persona sucia, no sólo es una fuente de diseminación, sino también un transmisor mecánico. La eficiencia de la persona sucia como transmisor se ilustra en los casos fatales de amibiasis que se ha tenido oportunidad de ver, en lactantes de pocas semanas o meses de edad, que se alimentan exclusivamente del pecho materno, cuya infección con toda probabilidad procedía de las manos o los pezones sucios de la madre portadora de *Entamoeba histolytica*. (34)

Las moscas y las cucarachas, después de caminar sobre la materia fecal en las letrinas o en otros lugares, también caminan sobre los alimentos del hombre o sobre los cubiertos, platos y vasos que usará para comer. Los fomites más importantes que participan en el fecalismo son: a) alimentos y bebidas; b) diversos objetos y c) aire (23)

El agua fácilmente puede tener contaminación con formas infectantes si no es potable. Pero quizás más importante sean los refrescos que se preparan a mano (aguas frescas), muy populares que se preparan principalmente con frutas naturales; el manipulador prácticamente se lava las manos en el propio refresco durante su preparación, las moscas y el aire también contribuyen a la contaminación. Los alimentos con mucha manipulación son los más peligrosos. Los alimentos que no llevan cocción, como las frutas o algún alimento que se prepara con éstas, además de la contaminación que se introduce por el manipulador, pueden tener la que recibe durante el riego con aguas negras o durante el transporte, enjuague y manipulación en los mercados, sin embargo, las contaminaciones previas pueden eliminarse por medio de un buen lavado con agua corriente, en la cocina, en cambio, la contaminación hecha por el cocinero ya no se eliminará, (23)

Los objetos que pueden actuar como fomites son muy diversos, por ejemplo, pasamanos y camiones, escaleras, tiendas, perillas de puertas, apagadores de luz, monedas, muebles sanitarios, ropa sucia, etc., que se manejan por él, también los platos, vasos y cubiertos, en los cuáles a veces es posible ver huellas digitales de las personas que manejarán sin la limpieza y precaución que deben.

El aire puede impulsar partículas de polvo y formas infectantes desde los terrenos baldíos a las casas vecinas, especialmente en las grandes ciudades donde los solares baldíos a veces se emplean para practicar la defecación al Aire Libre. (34).

3.- MICROORGANISMOS RELACIONADOS CON INFECCIONES GASTROINTESTINALES

Muchos microorganismos y parásitos se transmiten a través del agua y los alimentos, por consiguiente pueden causar enfermedades en la población consumidora. Para algunos microorganismos los alimentos pueden servir únicamente como vehículo de transmisión, para otros como un medio en el que pueden multiplicarse, lo que puede provocar una infección o una intoxicación por alimentos. (34)

Los alimentos más riesgosos son los que se consumen crudos entre ellos se encuentran, verduras frescas, ostras y otros mariscos. En los Estados Unidos los microorganismos patógenos de frutas y vegetales son Salmonella, Shigella, Virus gastrointestinal, Entamoeba histolytica y Ascaris spp (23)

El agua sin contaminación solamente contiene minerales y gases que dependen de la geología y terreno en que se origina. Sin embargo, el agua que se consume y utiliza en las ciudades contiene diversos materiales como microorganismos de gran variedad de especies, desechos humanos y desechos industriales. La contaminación que se origina por el desarrollo de los microorganismos en el agua potable en almacenamiento ó en los sistemas de distribución, constituye uno de los grandes problemas que debe afrontarse en el tratamiento de aguas. Mientras que el agua que se produce en la planta de tratamiento puede ser de una elevada calidad bacteriológica, el agua ya tratada puede estar sujeta a condiciones en el sistema de distribución y tener efectos adversos(34)

Existen por lo tanto, diversos microorganismos que se encuentran en el agua y que pueden ser la causa de algunas enfermedades, entre ellos se encuentran.

Escherichia - Su presencia en el agua es indicadora de contaminación fecal debido a que su habitat es el intestino grueso de humanos y animales. Las infecciones que causa más comunmente en el hombre son del tracto urinario. El tracto urinario normalmente está libre de bacterias pero existen algunas bacterias que pueden causar enfermedades cuando la cuenta es mayor de 100,000 col/ml. (12)

En niños, algunas copas de Escherichia coli, producen gastroenteritis aguda. Infecciones progresivas que se suman a las bacterias del colon y que pueden provocar bacteremia que termina en un shock (21,31)

Klebsiella - La presencia del género Klebsiella en agua indica contaminación de tipo fecal, debido a que éste se encuentra en el tracto intestinal de humanos. El género Klebsiella se encuentra también en la nariz y boca de sujetos sanos y frecuentemente está presente como invasor secundario en los pulmones de pacientes con enfermedades pulmonares crónicas. Es causante de aproximadamente el 2% de las neumonías bacterianas agudas (21)

Salmonella - En el género Salmonella se incluyen varias especies patógenas para el hombre y los animales. Las Salmonellas, no se multiplican en el agua pero pueden vivir en éste elemento durante una semana e más.

La fiebre tifoidea es una enfermedad infecciosa aguda causada por la Salmonella typhosa. La enfermedad se caracteriza clínicamente por fiebre persistente e inflamación del intestino, y puede llegar ser fatal. La fiebre tifoidea es una enfermedad que se difunde por todo el mundo pero es menos frecuentes donde se siguen buenas prácticas. Se asemeja a la fiebre tifoidea, pero es menos grave. En el hombre las especies que se encuentran más comúnment son la Salmonella paratyphi y la Salmonella Schottmulleri. (12,21)

Existen también las salmonelosis que designan los casos de gastroenteritis aguda con diarrea, que se producen por organismos de este grupo que son patógenos no sólo para el hombre sino también para algunos animales de sangre caliente. Comprende varias especies de importancia pero los que se encuentran con más frecuencia son la Salmonella enteritidis y la Salmonella typhimurium. Las enfermedades que causan estas bacterias son generalmente menos grave que las fiebres tifoideas (35)

Shigella - El género shigella, al igual que el género Salmonella se transmite a los humanos por medio del agua y los alimentos con contaminación. Todas las especies de género shigella son patógenas para el hombre. Las lesiones que producen en el tracto intestinal se confinan al ileon y al colon. La shigellosis es una forma de disentería bacteriana que se produce por diversas especies de shigella. La que da origen a la forma más grave es la shigella dysenteriae. La disentería del microorganismo shigella se caracteriza por dolores abdominales, diarrea y fiebre. La shigellosis generalmente se limita por sí misma y dura sólo unos pocos días (21)

Vibrio - La mayoría de los Vibrios son saprófitos que se encuentran en el agua solamente el Vibrio cholerae es patógeno para el hombre. Las infecciones se adquieren por la ingestión del Vibrio cholerae que generalmente se encuentra en el agua y alimentos con contaminación fecal. Causan náusea, diarrea, vómito y dolores abdominales. La pérdida de líquido produce una extrema deshidratación con pérdida de electrolitos puede sobrevenir un shock y la muerte ocurre en pocas horas. Existen otros casos menos severos donde la enfermedad sólo dura unos cuantos días (12)

Entamoeba - Existen varios protozoos que causan enfermedades intestinales y que se transmiten de hombre a hombre en los alimentos y el agua con contaminación. El más importante es la Entamoeba histolytica, a causa de la gran incidencia de la enfermedad que produce y de que es mortal en ciertas ocasiones. Las personas que padecen amebiasis pueden presentar pocas manifestaciones clínicas de la infección, o mostrar síntomas que van desde pequeños malestar abdominal con diarrea ligera que alterna con estreñimiento, hasta una grave disentería con sangre y moco en las deposiciones. Pueden formarse abscesos en el hígado ó en los pulmones y aún en el cerebro. (11,33)

Ascariasis.

En las zonas donde se emplean las aguas para riego, las infecciones se contraen al comer verduras crudas. Los huevecillos de ascaris penetran espontáneamente a través del ano, boca o nariz, provocando situaciones que pueden dar lugar a confusión, causan obstrucción intestinal o alcanzan lugares como el apéndice, cavidad peritoneal e hígado, donde pueden originar complicaciones graves (22)

4.- TECNICAS BACTERIOLOGICAS PARA LA EVALUACION DE COLIFORMES FECALES EN AGUA Y ALIMENTOS

Los métodos oficiales de análisis bacteriológico para la determinación y la cuantificación de microorganismos coliformes fecales se describen en el "Standard methods for the examination of "water and wastewater" (2). Estas determinaciones microbiológicas proporcionan un buen índice de contaminación focal sin embargo, tienen las desventajas del tiempo y de los costos, ya que mediante la técnica del "Número más Probable", el análisis bacteriológico requiere de un período de 48 horas y un máximo de 72 horas, mientras que por la técnica de filtro de membrana que solamente requiere 24 horas, los costos son elevados.

Por otro lado, la exactitud de la densidad de coliformes fecales y del microorganismo Escherichia coli en agua y alimentos, se cuestiona frecuentemente. Los resultados de ciertos estudios muestran que existen enormes diferencias significativas entre varios tipos de membrana y su habilidad para recuperar las bacterias (34). Adicionalmente, existen diversos estudios que sugieren que la recuperación de coliformes fecales por medio de la técnica del tubo de fermentación, está sujeta potencialmente a varias clases de interferencia, especialmente en la prueba presuntativa, aunque también en la confirmatoria y la completa (34).

Más adelante, al paso de los años, se desarrollaron una gran variedad de medios de cultivo para la cuantificación de microorganismos coliformes fecales y la especie Escherichia coli mediante las técnicas de filtro de membrana ó de la técnica del número más probable (13).

En 1972, Andrews y Preshell elaboraron un nuevo medio para recuperar las cepas de Escherichia coli de aguas de estuario. El medio que se desarrolló por ellos recibió el nombre del medio A-1, el cual requiere un tiempo para la recuperación de Escherichia coli de 24 horas a una temperatura de 44.5° C. En su experimento encontraron que la cepa de Escherichia coli se recuperaba 261 veces en el medio experimental, mientras que por el método descrito en APHA de 72 horas, era recuperada 237 veces (5). Más tarde, el mismo Andrews et al, evaluaron en ostiones este nuevo medio, en los 24 meses subsiguientes a su primer reporte del medio experimental. Ellos demostraron la especificidad del medio A-1 para el microorganismo Escherichia coli en dos tipos de ostiones. La productividad de este medio fue comparable al método APHA, la presencia de reacciones positivas

La utilidad de este nuevo medic. se avalió posteriormente por otros investigadores en camarón (34), en carne de cangrejo (20) y en aguas donde crecen los ostiones en diversas áreas geográficas exitosamente (5)

7 MICROORGANISMOS LESIONADOS

La mayoría de los productos alimenticios reciben algún procesamiento o contienen agentes naturales o adicionados, que provocan daños en las bacterias presentes en estos productos. Estos daños, pueden no ser lo suficientemente severos para destruir a todas las bacterias presentes, pero pueden en cambio provocar lesiones subletales a cierta proporción de la población. Esto significa que los microorganismos que sobreviven, quedan lesionados o dañados

La expresión lesionados puede tomar diversas formas, pero en esencia es la pérdida de habilidad de las células vivientes para formar colonias visibles bajo ciertas condiciones. Se detectan bacterias lesionadas después de la exposición a temperaturas de congelación, sustancias químicas como fenol, antisépticos, y acidificantes (34)

Estos microorganismos ya débiles son generalmente incapaces de crecer en medios selectivos, pero puedan recuperar esta capacidad a través de un proceso de recuperación bajo condiciones no restrictivas. Esto se debe a que los microorganismos lesionados presentan mayor sensibilidad a gran parte de los agentes selectivos, que incluyen a los que se encuentran presentes en los medios de cultivo que se utilizan para su cuantificación y detección. Se presume que éstos agentes selectivos, como las sales de bilis, el tauril sulfato de sodio, el verde brillante, el rojo neutro y el cristal violeta, interfieren en el proceso reversible de reparación de las células dañadas y previenen su multiplicación subsecuente. Cuando los microorganismos lesionados se han reparado, vuelven a tomar resistencia a estos compuestos (34)

La mayoría de los indicadores sanitarios son bacterias cuyo habitat natural es el intestino del hombre y los animales de sangre caliente. Cuando se descargan en las heces, éstos microorganismos entran a un cuerpo de agua, una vez que las bacterias se depositan en el agua, se encuentran en un medio que no es favorable para el mantenimiento de la vitalidad de la mayoría de las bacterias. Más del 90% de las bacterias indicadoras pueden lesionarse cuando se exponen a aguas naturales

Los microorganismos lesionados representan un factor importante en la estimación de la cantidad de microorganismos indicadores, lo cual puede llevar a juicios erróneos para la salud pública. Es por esto importante que la población dañada se recupere, para poder evaluar correctamente la calidad bacteriológica del agua.

Adicionalmente, las manipulaciones en el laboratorio como son los métodos de vaciado en placa, pueden causar lesiones mayores basadas en la ciencia de Postgate, que "bacterias sujetas a tensión se vuelven hiposensibles a tensiones secundarias". En la cuenta de vaciado en placa ciertas porciones de las muestras se diluyen en amortiguador, se transfieren a cajas de Petri esteriles, seguidas de una adición de aproximadamente 20.0 ml de medio de cultivo con Agar a temperatura entre 43 y 45 °C, se mezclan vigorosamente y se permite la solidificación del agar. Klein y Wu, encontraron que en un periodo tan corto como puede ser un minuto de exposición de los microorganismos del agua, a temperaturas de 50 °C, causa una importante disminución en la recuperación de los microorganismos.

Ray y Speck estudiaron el proceso metabólico durante la reparación de la copa de Escherichia coli lesionada por congelación, en K₂HPO₄. Reportaron que la recuperación en K₂HPO₄ no se afecta con inhibidores de la síntesis de proteínas, de ácidos nucleicos ni de mucopéptidos. Estos inhibidores únicamente impidieron el crecimiento de las células reparadas en un medio no selectivo a 35 °C. Distintos desactivantes de la síntesis del ATP, redujeron el proceso de reparación en K₂HPO₄. Los datos indican que las células sintetizan energía en forma de ATP y probablemente la utilizan en el proceso de reparación. (34)

Sus estudios indican que el restablecimiento de los microorganismos dañados por lo general procede lo suficientemente rápido para que la lesión se repare antes de que exista multiplicación de las células basándose en sus investigaciones, proponen como adecuado un periodo de reparación de 60 minutos a 25°C para evitar complicaciones de multiplicación de los microorganismos no lesionados. Manifiestan que para asegurar el restablecimiento de los microorganismos lesionados de diferentes tipos de alimentos éste debe de hacerse en un medio como caldo de soya tripticosa con extracto de levadura, y que resulta muy conveniente realizarse previo a la determinación del "Número más probable", ya que se conoce que la rehabilitación de las bacterias coliformes, no produce efectos adversos en la flora asociada (34)

Posteriormente, el método A-1 que se introdujo por Andrews y Presnell en 1972, se modificó para incluir un período de recuperación de 3 horas a 25°C antes de la incubación a 44.5°C, para proveer condiciones más favorables para la máxima recuperación de coliformes fecales. Este método se convirtió más tarde en método oficial de la AOAC (2).

Hunt et al realizaron un estudio comparativo de la eficiencia del método A-1 modificado con la técnica EC estándar para la recuperación de microorganismo coliformes fecales de ostiones. Encontraron que la recuperación de microorganismos coliformes fecales de ostiones que se contaminan naturalmente fue más alto por método A-1 modificado, que por el método estándar de la APHA. No obstante, no fue el caso para todos los tipos de ostiones que se analizaron. No se encontró estadísticamente diferencia significativa entre los dos métodos, en un promedio global para recuperación de la cepa Escherichia coli (13).

Ahora bien, los microorganismos lesionados pueden estar presentes y escapar a las detecciones porque no se desarrollan en medios selectivos. Puede argumentarse, sobre todo desde el punto de vista del deterioro de los alimentos, que los microorganismos lesionados están inactivos, por lo que no crecen y deterioran al alimento. Sin embargo, el peligro potencial está presente, porque los microorganismos lesionados que son patógenos son susceptibles de restaurarse y producir toxinas, si es que las producen normalmente. Además, no puede aceptarse que los microorganismos que indican la calidad higiénica del agua y de los alimentos escapen a las detecciones (34).

IV -JUSTIFICACION

Los vegetales constituyen una fuente importante en la alimentación del hombre como complemento nutricional. En nuestro país es común consumir verduras y frutas crudas, por lo que se hace necesario contar con metodología adecuada para su control sanitario (23)

Por naturaleza este tipo de alimentos presentan una contaminación, la cual se inicia desde su cultivo, aunado a esto nos encontramos que en la gran mayoría de los consumidores se practican malos hábitos higiénicos, además de la ausencia de desinfectantes en la limpieza de este tipo de alimentos, así como el uso de agua potable contaminada en la preparación de los mismos (23) La flora natural de la superficie de las plantas varía con el tipo de vegetal, pero comúnmente incluye especies de *Pseudomonas* alcalígenas, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, bacterias de ácido láctico, bacilos fecales, levaduras y mohos. El número de microorganismo dependerá de la planta y su medio ambiente y puede fluctuar; desde unos pocos cientos de miles por metro cuadrado hasta millones. Las principales fuentes de contaminación pueden ser: Las provenientes del suelo (Tierras de cultivo), aguas negras, agua potable contaminada, aire y animales. (21,23)

En este trabajo se comparó el método del número más probable con el método que utiliza caldo de cultivo A-1, se realizó un estudio microbiológico, con diferentes muestras de verdura con la finalidad de evaluar la calidad sanitaria y así poder controlar el riesgo de contraer enfermedades gastrointestinales. Para determinar la cantidad de coliformes fecales se llevarán a cabo el método del número más probable y el del caldo de cultivo "A-1", así como también se realizó una comparación de ambas técnicas con el objeto de evaluar su eficiencia

En este estudio se analizarán un total de 73 muestras obtenidas de diferentes lugares de la Ciudad de México. Se eligieron vegetales como: acelgas, berros, cilantro, col, espinacas, lechuga, pápalo, perejil, rabanitos, etc. Por ser alimentos de gran consumo (6)

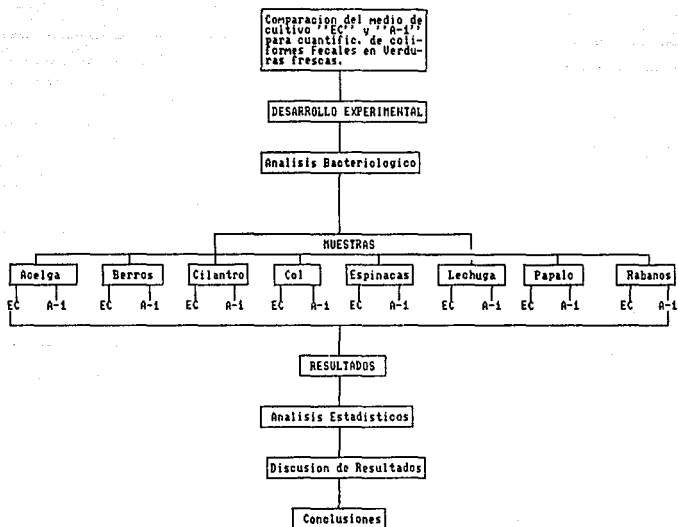
Esta investigación constituye el inicio de una serie de estudios que podrán realizarse para establecer límites de contaminación microbiana así como metodología específica para su evaluación sanitaria

V. HIPOTESIS

1. Si son equivalentes estadísticamente tanto el método que utiliza caldo de cultivo "A-1" como el que utiliza caldo de cultivo "EC", entonces el método que utiliza caldo de cultivo "A-1" podrá ser aplicado como una técnica alternativa para la determinación cuantitativa de organismos coliformes fecales en los vegetales probados.

2. El Método alternativo, sólo podrá ser aplicado en aquellos vegetales en que haya sido comprobado la eficiencia del mismo.

PANORAMA GENERAL DE TRABAJO



EC = Caldo de Cultivo "EC"

A-1 = Caldo de Cultivo "A-1"

VI. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

1. Preparación y esterilización del material de vidrio.

a. Esterilizar el material de vidrio, en un horno con aire caliente circulante a 160°C durante dos horas.

2. Preparación y Esterilización de los caldos de cultivo: Lauril Sulfato Triptosa, "EC" y "A-1"

a. Caldo Lauril Sulfato Triptosa.

Ingredientes.

Triptosa ó Tripticasa	20.0 g
Lactosa	5.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Fosfato Monopotásico	2.75 g
Lauril sulfato Sodio	0.1 g
Agua destilada	1000 ml
PH 6.8 ± 0.2	

En tubos de ensayo de 18 x 150 mm. con tapon de rosca y campana de Durham, colocar 10.0 ml. del caldo. Esterilizar en autoclave a 121° C por 15 minutos a 15 libras de presión

b. Caldo de cultivo "EC"

Ingredientes.

Triptona ó Tripticasa	20.0 g
Lactosa	5.0 g
Salas Biliares	1.5 g
Fosfato monopotásico	1.5 g
Fosfato dipotásico	4.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agua destilada	1000.0 ml
PH 6.9 ± 0.1	

c. Caldo de cultivo "A-1"

Ingredientes.

Triptona	20.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Lactosa	5.0 g
Triton X-100	1.0 ml
Salicina	0.5 g
Agua Destilada	1000.0 ml
PH 6.9 ± 0.2	

En tubos de ensayo de 18 x 150 mm, con tapon de rosca y campana de Durham, colocar 10.0 ml del caldo. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión.

d. El tiempo que transcurre entre la preparación de los medios de cultivo y su utilización no debe ser mayor de 7 días

3. Preparación de las diluciones

a. Pesar 10.0 g de la muestra

b. Transferir la muestra a un vaso de licuadora y adicionarle 90.0 ml de solución buffer estéril, homogeneizar en una licuadora durante un minuto.

c. Tomar ésta preparación como la dilución 10-1

d. A partir de ella preparar las diluciones 10-2 y 10-3. (Ver fig No 1)

4. Método del número más probable para la numeración de coliformes fecales

4.1 Prueba presuntiva.

a. Transferir 1.0 ml de cada una de las diluciones decimales (10-1, 10-2, 10-3) por triplicado a tubos con caldo lauril sulfato triptosa. (Ver fig No 2)

b. Incubar los tubos a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

c. Seleccionar los tubos como positivos, aquellos que muestren producción de gas.

FIGURA No. 1
PREPARACION DE LAS DILUCIONES

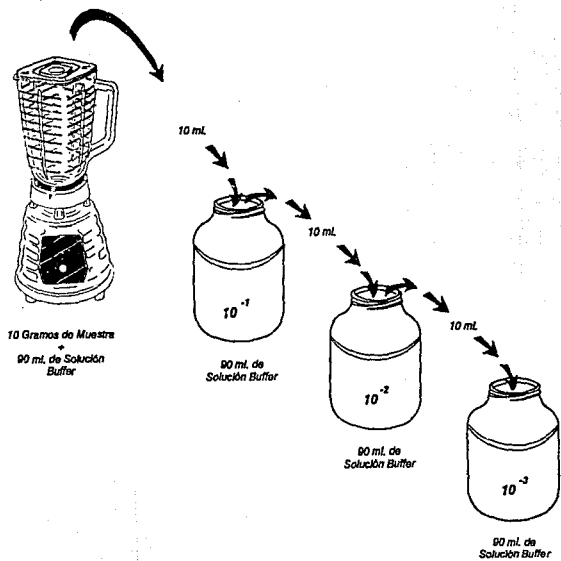
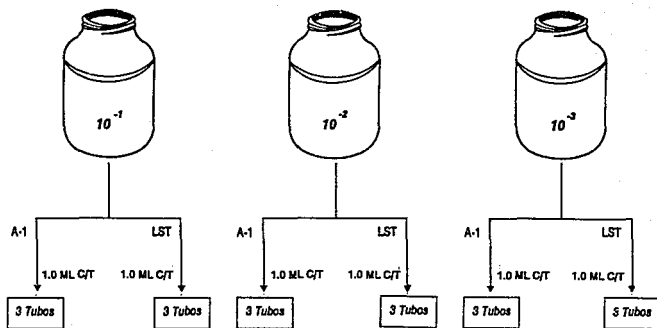


FIGURA No. 2
PRUEBA PRESUNTIVA



C/T= CADA TUBO
A-1= CALDO DE CULTIVO A-1
EC = CALDO DE CULTIVO EC
LST= LAURIL SULFATO TRIPTOSA

4.2 Prueba confirmatoria.

a. Utilizando una asa, inocular tubos con caldo "EC", incubar durante 24 horas a $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Es importante que todos los tubos sean colocados dentro del baño en un lapso de tiempo no mayor de 30 minutos después de la inoculación. Sumergir los tubos dentro del baño de agua cuyo nivel debe estar sobre el nivel del medio de cultivo de los tubos.

b. Llevar controles, usando un cultivo conocido de Escherichia coli para producción de gas a $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ como positivo. Utilizar un cultivo de Enterobacter aerogenes, con ausencia total de gas a $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ como control negativo.

c. Observar la ausencia o presencia de gas a las 24 ± 2 horas.

d. Seleccionar los tubos que hayan tenido producción de gas y referir a la tabla del Número más probable (Tabla No 1. Ver Anexo 3) Reportar los resultados como el Número Más Probable de bacterias coliformes fecales por gramo de muestra.

5. Determinación de coliformes fecales con el caldo "A-1"

a. Transferir 1.0 ml de cada una de las diluciones anteriormente preparadas (0.1, 0.01, 0.001) por triplicado a tubos con caldo de cultivo "A-1".

b. Incubar los tubos durante tres horas a $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$, transcurrido este tiempo transferir los tubos inmediatamente a un baño maría con temperatura de $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ e incubar durante 31 ± 2 horas.

c. Llevar controles. Usando un cultivo conocido de Escherichia Coli para producción de gas a $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ como positivo, utilizar un cultivo de Enterobacter aerogenes con ausencia total de gas a $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ como negativo

d. Observar los tubos donde haya producción de gas, tomar estos como positivos y leerlos en la tabla del número más probable. Reportar los coliformos fecales por gramo de muestra (Tabla No. 1 Ver Anexo 3).

e. Los tubos que resultarán positivos tanto del caldo de cultivo "A-1" como el caldo de cultivo "EC" de la prueba confirmatoria se sembrarán en agar eosina azul de metileno (EMB), se incubarán 24 horas a $35 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

f. Se reportó como E. Coli las colonias que presentarán morfología descrita como típica. color verde con brillo metálico.

g. Las colonias que no presentaron las anteriores características se procedió a realizar las pruebas de IMVIC. (Indo). Rojo de metilo, Vogues Proskauer y Citratos) para su identificación (Ver Anexo 2). Los resultados obtenidos fueron los siguientes (Tabla No 2)

TABLA NO 2

Resultados de pruebas bioquímicas, obtenidos del caldo de cultivo "A-1" De las series de tres tubos por cada dilución (0.1, 0.01, 0.001) se eligieron los tubos que resultaron positivos y cada tubo se sembró en una caja con medio de cultivo (Eosyna Azul de metileno), posteriormente a cada caja se le hicieron pruebas bioquímicas, los resultados son por caja. A continuación se indican.

TIPO DE MUESTRA	PRODUCCION DE GAS	CAJAS EMS CRECIMIENTO	IDENTIFIC. BIOQUIMICA E. COLI POR CAJA
Aceiga	3	3	6
Aceiga	3	3	6
Berros	3	3	9
Berros	3	3	9
Berros	3	2	5
Berros	3	2	5
Berros	3	3	9
Berros	3	2	5
Cilantro	3	3	9
Cilantro	3	3	9
Cilantro	3	3	6
Cilantro	3	3	6
Cilantro	3	1	3
Cilantro	3	-	3
Cilantro	3	1	3
Cilantro	3	3	9
COI	3	3	9
COI	3	1	3
COI	2	-	2
COI	3	1	4
COI	-	-	-
COI	-	-	-
COI	-	-	-
COI	-	-	-
COI	3	3	9
COI	3	3	9
COI	3	3	9

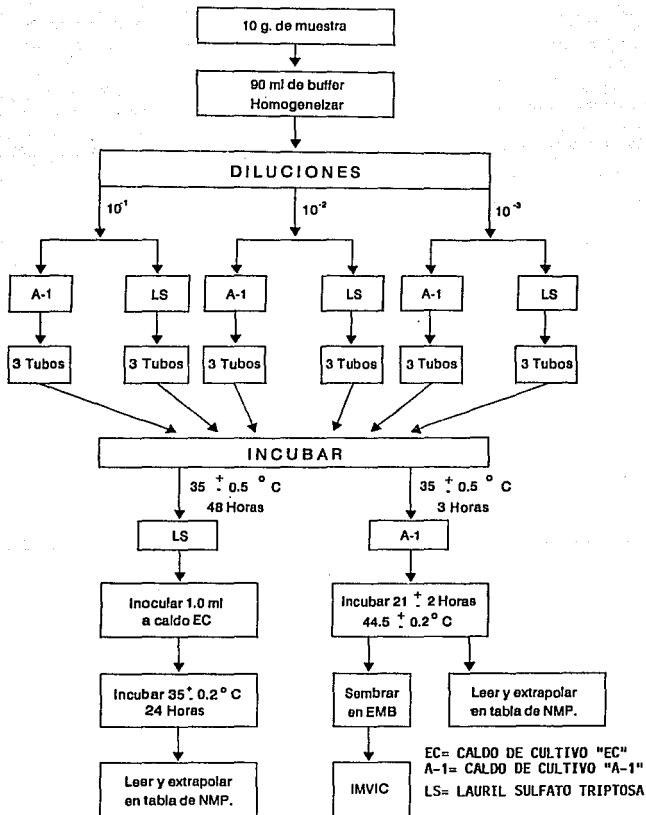
EC = Escherichia Coli SR
 K = Klebsiella SR
 E = Enterobacter SR

TABLA NO. 2

TIPO DE MUESTRA	PRODUCCION DE GAS	CAJAS EMB CREGIMIENTO	IDENTIF. BIOQUIMICA E. COLI POR CAJA
Espinacas	3 3 3	9	3 2,K 3
Espinacas	3 3 2	8	3 3 -
Espinacas	3 3 2	8	3 2,K 1,E
Espinacas	3 1 -	4	3 1 -
Espinacas	3 3 1	7	3 3 1
Espinacas	3 3 3	9	3 3 3
Lechuga	3 3 3	9	3 3 3
Lechuga	3 3 3	9	3 3 3
Lechuga	- - -	-	- - -
Lechuga	- - -	-	- - -
Lechuga	9 2 -	5	2,E 1,E -
Lechuga	3 - -	3	3 - -
Lechuga	2 1 -	3	0,K,K 1 -
Lechuga	3 - -	3	3 - -
Lechuga	3 3 1	7	3 3 1
Lechuga	3 2 1	6	3 2 1
Lechuga	3 3 3	9	3 3 3
Lechuga	3 3 3	9	3 3 3
Pápalo	3 3 3	9	3 3 3
Pápalo	- - -	-	- - -
Perajil	3 3 3	9	3 3 3
Rábanos	3 3 3	9	3 3 3
Rábanos	3 3 3	9	3 3 3
Rábanos	1 - -	1	1 - -

EC → Escherichia coli
 E → Enterobacter sp
 K → Klebsiella sp

DESARROLLO EXPERIMENTAL



VII RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO

En esta tabla se indica el tipo de muestra analizada, así como los resultados obtenidos con el caldo de cultivo "EC" y el caldo de cultivo "A-1". Los resultados están en Número Más Probable por Gramo de muestra (NMP/G):

RESULTADOS TABLA 3

TIPO DE MUESTRA	CALDO "EC" NMP/G	CALDO "A-1" NMP/G
Aceitga	93	240
Aceitga	240	240
Berros	+1100	+1100
Berros	460	+1100
Berros	150	93
Berros	43	93
Berros	93	93
Berros	240	93
Berros	1100	1100
Berros	240	23
Cilantro	+1100	+1100
Cilantro	240	240
Cilantro	+1100	460
Cilantro	1100	1100
Cilantro	150	240
Cilantro	93	460
Cilantro	160	75
Cilantro	9.1	23
Cilantro	460	460
Cilantro	93	23
Cilantro	43	23
Cilantro	240	75
Cilantro	+1100	+1100
Col	240	240
Col	9.1	9.1
Col	43	43
Col	-3.0	-3.0
Col	-3.0	-3.0
Col	-3.0	-3.0
Col	-3.0	-3.0

NMP = Número más probable por gramo

RESULTADOS TABLA NO 3

TIPO DE MUESTRA	CALDO "EC" NMP/G	CALDO A-1 NMP/G
Col	240	+1100
Col	43	1100
Col	1100	+1100
Col	1100	340
Col	+1100	1100
Col	23	15
Espinacas	+1100	+1100
Espinacas	+1100	+1100
Espinacas	1100	1100
Espinacas	43	43
Espinacas	44	460
Espinacas	460	1100
Espinacas	92	39
Jitomate	-3.0	3.0
Lechuga	+1100	1100
Lechuga	+1100	1100
Lechuga	-3.0	3.0
Lechuga	-3.0	3.0
Lechuga	93	93
Lechuga	3.0	23
Lechuga	3.0	15
Lechuga	-3.0	23
Lechuga	43	460
Lechuga	193	150
Lechuga	25	1100
Lechuga	150	1100
Lechuga	+1100	93
Lechuga	150	43
Lechuga	93	3.0
Lechuga	9.1	3.0

NMP = Número Más Probable por gramo

RESULTADOS TABLA NO. 3

TIPO DE MUESTRA	CALDO "EC" NMP/G	CALDO "A-1" NMP/G
Pápalo	+1100	+1100
Pápalo	-3.0	-3.0
Pápalo	+1100	93
Pápalo	460	150
Perejil	+1100	+1100
Perejil	130	93
Perejil	+1100	1100
Perejil	28	23
Rabanos	+1100	+1100
Rabanos	1100	+1100
Rabanos	-3 C	3.6
Rabanos	+1100	14
Rabanos	160	150

De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla No 3), se le aplicó un análisis de prueba del rango con signo de WILCOXON- variable de respuesta ordinal (1) (Ver Anexo 1)

Esta prueba puede aplicarse a datos de una muestra o a datos de dos muestras relacionadas. En la situación de dos muestras, la prueba del rango con signo es sensible a las diferencias en localización entre las dos muestras y por lo general se usa para probar si la diferencia entre los dos resultados de cada muestra proviene de una población que es simétrica respecto a una mediana de cero (Hipótesis nula) ó de una población con una Mediana diferente de cero (Hipótesis alternativa)

Se analizarán los diferentes grupos de verduras por separado, evaluando si eran equivalentes los resultados entre los elementos del grupo (26) Los pasos a seguir son los siguientes.

ANALISIS ESTADISTICO

Se analizaron ocho (8) diferentes grupos de muestras de verduras a continuación se indica el análisis efectuado.

MUESTRA. BERRQ3

	1	2	3	4	5	6	7	8
XI = "EC"	1100	460	160	43	93	240	1100	240
YI = "A1"	1100	1100	93	93	93	93	1100	23
Diferencia XI-YI	0	-640	67	-50	0	147	0	217
Orden sin tomar en cuenta el signo		5	2	1	0	3	0	4
Rango con signo		-5	2	-1	0	3	0	4

1. Plantear Hipótesis nula e Hipótesis alternativa

H_0 = Ambos Métodos son Equivalentes

H_a = Ambos Métodos no son Equivalentes

$$n = 8$$

$$W+ = 9$$

como $W+$ es $>$ que la media entonces.

$$(W+) = 9 - 0.5 = 8.5$$

$$\text{Media} = \frac{5(5+1)}{4} = \frac{30}{4} = 7.5$$

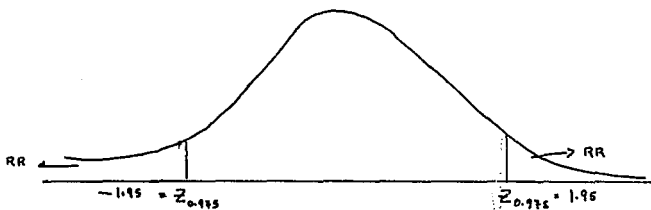
$$\text{Varianza} = \frac{5(6)}{11/24} = 0.1136$$

Desviación Standard = 0.33709

$$Z = \frac{8.5 - 7.5}{0.33709} = 2.9665$$

Z tablas 0.975 = 1.95

De acuerdo al resultado obtenido, y extrapolando el valor de Z experimental en la siguiente gráfica concluimos que se acepta la HIPOTESIS ALTERNATIVA, por lo que los métodos no son equivalentes



MUESTRA DE CILANTRO

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Xi = "EC"	1100	240	1100	1100	150	93	160	9	460	93	43	210	1100
Yi = "A-1"	1100	240	460	1100	240	460	75	23	460	23	23	75	1100
Diferencial	0	0	640	0	-90	-367	85	-13.9	0	70	20	135	0
$X_i - Y_i$													
Orden sin			8		5	7	4	1		3	2	6	
Suma sig			8		-5	-7	4	-1		3	2	6	
Rango con			8		-5	-7	4	-1		3	2	6	
signo													

1. Plantear Hipótesis nula e Hipótesis alternativa

H_0 = Ambos Métodos son Equivalentes

H_A = Ambos Métodos no son Equivalentes

$n = 8$

$W+ = 23$

$(W+) = 23 - 0.5 = 22.5$

Media = $8(8 + 1) = 8$

Varianza = $8(9)/17/24 = 0.1764$

Desviación Estándar = 0.42

$Z = \frac{22.5 - 18}{0.42} = 10.07$

$Z_{tablas} = 1.95$

Comparando el valor de Z calculada contra el valor de Z experimental concluimos que cae dentro de la region de aceptacion de la HIPOTESIS ALTERNATIVA, por lo que los metodos no son equivalentes



MUESTRA DE. COL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
XI = EC	240	9.1	43	3.0	-3.0	-3.0	240	43	1100	1100	1100	23	-3.0
YI = "A-I"	240	9.1	43	-3.0	-3.0	-3.0	1100	1100	1100	240	1100	15	-3.0
Diferen	0	0	0	0	0	0	-860	-	0	860	0	8	0
XI-YI									1057				
Orden no							3	4		2		1	
Tomar sig													
Rango							-2.5	-4		2.5		1	
Icon sig													
N.Result							1*			1*			
Empatado													
No Empat									2				
Valor t													

$$n = 4$$

$$W+ = 3.5$$

$$(W+) = 3.5 - 0.5$$

$$\text{Media} = \frac{4(5)}{4} = 5$$

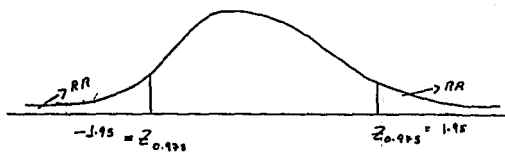
$$\text{Varianza} = \frac{4(5)(9)}{24} - 1/48(2)(1)(3) + 2(1)(0)(2) = 6$$

$$\text{Desviación Estándar} = 2.449$$

$$Z = \frac{4.0 - 5}{2.449} = -0.408$$

$$Z_{\text{tablas}} = 1.95$$

Comparando el valor de Z calculada contra el valor de Z experimental y por los resultados obtenidos podemos observar que se acepta la HIPOTESIS NULA, por lo que los métodos son equivalentes en este tipo de muestra.



MUESTRA ESPINACAS

	1	2	3	4	5	6	7	8
XI = "EC"	1100	1100	1100	43	44	460	93	
YI = "A-1"	1100	1100	1100	43	460	1100	39	
Diferencia XI-YI	0	0	0	0	-416	-640	54	
Orden sin tomar en cuenta la el signo					2	3	1	
Rango con signo					-2	-3	1	

$$n = 3$$

$$W = 1$$

Como W es 1 que la Media entonces.

$$(W+) = 1 + 0.5$$

$$\text{Media} = 3 \left(\frac{4}{4} \right) = 3$$

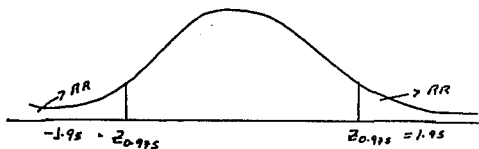
$$\text{Varianza} = 3(4)/7/24 = 0.0714$$

$$\text{Desviación Estándar} = 0.2672$$

$$Z = \frac{1.5 - 3}{0.2672} = -5.61$$

$$Z \text{ Tablas} = 1.95$$

Por los resultados obtenidos y extrapolando el valor de "Z" experimental en la siguiente gráfica podemos concluir que la hipótesis nula se rechaza y se acepta la hipótesis alternativa, por lo que los métodos no son equivalentes



MUESTRA L E C H U O A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
'Xi+EC'	1100	1100	3.0	3.0	93	3.0	3.6	3.0	43	93	36	150	1100	150	93	9.11	0.11
'Vi+AA'	1100	1100	3.0	3.0	93	23	13	23	460	150	1100	1100	93	43	3.0	3.0	3.0
'Diferenc'	0	0	0	0	0	-20	-11	-20	-417	-571	-1064	-930	1007	107	90	6.11	6.11
'Xi - Yi'																	
'Orden sin'						5	3	6	9	6	12	10	11	8	7	2	0
'Signo'																	
'Rango con'						-4.5	-3	-1.5	-9	-6	-12	-10	11	8	7	1.51	1.3
'Signo'																	
'No Resul'																12	12
'Empates'																	
'No Empat'																	
'Valor t'	+						2										2

EMPATES EN LOS RESULTADOS DE DIFERENCIAS

$$n = 12$$

$$W+ = 29$$

Si $W+$ es $<$ Media entonces.

$$W+ = 29 + 0.5$$

$$\text{Media} = n(n+1) / 4 = 12(13)/4 = 39$$

$$\text{Varianza} = n \frac{(n+1)(2n+1)}{24} - \frac{1}{48} \sum t_i(t_i-1)(t_i+1)$$

$$t_i(t_i-1)(t_i+1) = 2(1)(3) + 2(1)(3) + 9(1)(0)(2) + 6 + 6 + 9 + 0 = 12$$

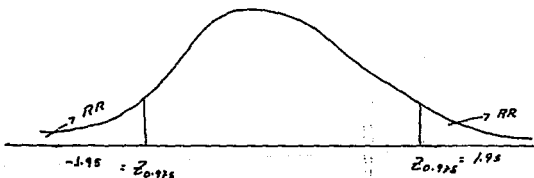
$$\text{Varianza} = \frac{12(13)(24+1)}{24} - \frac{1}{48}(12) = \frac{12(13)(25)}{24} - \frac{12}{48} = 6.250$$

Desviación Estándar = 2.5

$$Z = \frac{29.5 - 30}{2.5} = -3.8$$

Z tablas = 1.95

Por los resultados obtenidos podemos concluir que el valor de "Z" experimental cae dentro de la región de rechazo, por lo que se rechaza la hipótesis nula, lo que implica que los métodos no son equivalentes



MUESTRA DE. PAPALO

	1	2	3	4
Xi = "E C"	1100	3.0	1100	460
Yi = "A - 1"	1100	3.0	93	150
Diferencia Xi - Yi	0	0	1107	310
Orden sin tomar en cuenta el signo			2	1
Rango con signo			2	1

$$n = 2$$

$$W+ = 3$$

Condición. Si $(W+) > \text{Media}$

Entonces. $3 - 0.5 = 2.5$

$$\text{Media} = 2(3) / 4 = \frac{6}{4} = 1.5$$

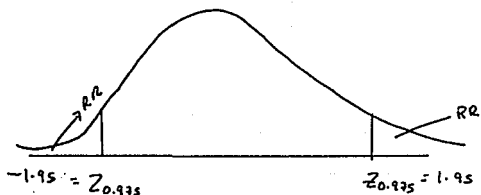
$$\text{Varianza} = 2(3) / 5/24 = 0.05$$

$$\text{Desviación Estándar} = 0.2236$$

$$Z = \frac{2.5 - 1.5}{0.2236} = 4.47$$

$$Z_{\text{tablas}} = 1.95$$

por los resultados obtenidos y extrapolando al valor de Z experimental podemos concluir que el valor de Z experimental es dentro de la región de aceptación de la HIPOTESIS ALTERNATIVA por lo que los microbios no son equivalentes.



MUESTRA PEREJIL

	1	2	3	4
$X_i = "EC"$	1100	150	1100	28
$Y_i = "A-1"$	1100	93	1100	23
Diferencia $X_i - Y_i$	0	57	0	5
Orden sin tomar en cuenta el signo		2		1
Rango con Signo		2		1

$$n = 2$$

$$W = 3$$

Condicion. Si $(W+) > Media$

$$\text{Entonces: } 3 - 0.5 = 2.5$$

$$Media = 2 (3) / 4 = 6/4 = 1.5$$

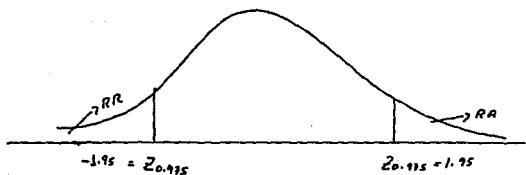
$$Varianza = 2 (3) / 5 / 24 = 0.05$$

$$\text{Desviacion Estándar} = 0.2236$$

$$Z = \frac{2.5 - 1.5}{0.2236} = 4.47$$

$$Z_{tablas} = 1.95$$

Por los resultados obtenidos y extrapolando el valor de Z experimental podemos deducir que el valor de Z experimental cae dentro de la región de aceptación de la HIPOTESIS ALTERNATIVA por lo que los ritmos no son equivalentes.



MUESTRA: RABANOS

	1	2	3	4	5
Xi = "EC"	1100	1100	3.0	1100	460
Yi = "A-1"	1100	1100	3.6	44	150
Diferencia Xi-Yi	0	0	-0.6	1056	310
Orden sin tomar en cuenta el signo			1	3	2
Rango con signo			-1	3	2

$n = 3$

$w = 5$

Condición: $SI (w+) > X$

Entonces $= 5 - 0.5 = 4.5$

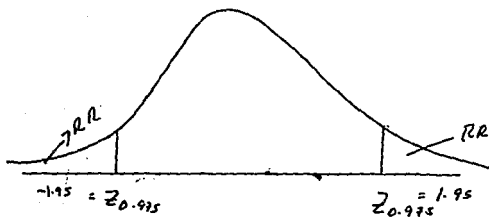
Media $= 3 (4) / 7 = 24 = 0.0714$

Desviación Estandar $= 0.2672$

$Z = \frac{4.5 - 2}{0.2672} = 5.613$

Z tablas $= 1.95$

por los resultados obtenidos y extrapolando al valor de Z experimental en la siguiente gráfica podemos concluir que el valor de " Z " experimental obtenido, cae dentro de la región de aceptación de la HIPOTESIS ALTERNATIVA, por lo que los médicos no son equivalentes.



VIII - DISCUSION DE RESULTADOS

Al analizar los resultados podemos observar que es determinante que el método alternativo (Caldo de cultivo A-1), sea utilizado únicamente en los vegetales en que dicho método haya sido probado. Sin embargo las bases sobre las que están fundamentadas la metodología, presentan sus ventajas y desventajas, las cuales son las siguientes.

2. VENTAJAS DE LA UTILIZACION DE MICROORGANISMOS COLIFORMES COMO INDICADORES

Las ventajas de analizar al grupo coliforme en agua y no al grupo de organismos patógenos específicos son:

a. Los organismos coliformes forman parte de la flora normal del Intestino de humanos en gran cantidad y miles de millones de estos organismos son excretados diariamente por persona. Se estima que por cada bacilo tifoideo u otro organismo patógeno en suministros de agua contaminada usualmente hay millones de organismos coliformes especialmente Escherichia coli.

b. Los microorganismos del grupo coliforme sobreviven más tiempo en un ambiente acuático que la mayoría de los patógenos intestinales por lo tanto es posible localizar una contaminación reciente o no tan reciente.

c. La presencia de estos microorganismos se puede detectar fácilmente mediante técnicas de rutina.

d. La ausencia de coliformes es una evidencia de la potabilidad del agua desde el punto de vista microbiológico.

e. El aumento en cantidad es aproximadamente proporcional al grado de contaminación.

f. Los miembros del grupo coliforme no son patógenos, excepto algunas cepas. (15)

3 DESVENTAJAS DEL GRUPO COLIFORME COMO INDICE DE CONTAMINACION

a. Algunos miembros del grupo coliforme se distribuyen ampliamente en el medio ambiente, en comparación a su presencia en los intestinos de animales de sangre caliente.

b. No es posible determinar con precisión el momento en que principió la contaminación.

c. Algunas de las especies pueden multiplicarse en aguas contaminadas.

d. A veces la flora bacteriana no coliforme impide el crecimiento de los coliformos (prueba falsa negativa) ó produce gas sin haber microorganismos coliformos (prueba falsa positiva)

e. Un número pequeño de coliformos fecales, da negativa la prueba de temperatura (14)

Algo muy importante que hay que considerar es que de un total de 73 muestras que se analizaron con el método a comparar (caldo de cultivo A-1), 48 muestras, lo que equivale al 65.7 % se sembraron en agar "EMB" (Eosyna Azul de Metileno). En esta etapa se identificaron colonias típicas de Escherichia coli. Posteriormente a las colonias que no presentaban el aspecto típico se les realizó pruebas bioquímicas del IMVIC. Los resultados se indican en la tabla No 2, con estos resultados nos damos cuenta que en las 48 muestras se encontraron organismos coliformes fecales (Escherichia coli y Klebsiella), lo que nos lleva a pensar que el método alternativo (caldo de cultivo A-1) disminuye también el riesgo de proporcionar resultados falsos positivos ó falsos negativos.

IX -CONCLUSIONES.

Se analizaron 73 muestras de ocho diferentes tipos de verduras frescas, las cuales normalmente se consumen crudas

De las ocho diferentes grupos de verduras analizadas concluimos lo siguiente.

1. El análisis estadístico indica que, siete grupos resultaron ser no equivalentes es decir que hay diferencia entre el método utilizando caldo de cultivo A-1 y el método recomendado por la AOAC (caldo de cultivo "EC"):

Grupo	Toma de decisión
Berros	Se acepta Ho = no son equivalentes
Cilantro	Se acepta Ho = no son equivalentes
Papalo	Se acepta Ho = no son equivalentes
Perdiz	Se acepta Ho = no son equivalentes
Rábanos	Se acepta Ho = no son equivalentes
Espinacas	Se acepta Ho = no son equivalentes
Lechuga	Se acepta Ho = no son equivalentes

2. Sólo un grupo resultó ser equivalente, es decir que no hay diferencia entre el método utilizando caldo de cultivo A-1 y el método recomendado por la AOAC. Este grupo es el grupo de la col.

Grupo	Toma de decisión
Col	Se acepta Ho = son equivalentes

3.- De un total de 73 muestras que se analizaron por el método alternativo (caldo de cultivo "A-1"), en 48 de ellas se comprobó la presencia de Escherichia coli, a través de las pruebas bioquímicas IMViC, los resultados demuestran que en las 48 muestras se encontraron coliformes fecales. Esto nos hace pensar que el método alternativo disminuye el riesgo de proporcionar resultados falsos positivos & falsos negativos

4. De los resultados obtenidos deducimos que la cuantificación de coliformes fecales utilizando caldo de cultivo A-1 debe aplicarse solamente en el tipo de verduras en que haya sido evaluado. (5)

5. Se hace necesario que se analicen otros diferentes tipos de verduras, con este método alternativo (caldo de cultivo A-1), esto debido a que en nuestro país se consume una extensa gama de verduras frescas crudas.

6.-Es indispensable educar al público consumidor sobre prácticas de higiene adecuadas para la preparación y/o consumo de estos alimentos, tales prácticas de higiene son:

a) - Lavarse las manos antes de preparar alimentos, así como para consumir los mismos.

b) Lavar perfectamente los alimentos sobre todos aquellos que se consumen crudos (ensaladas), utilizando un agente antiséptico y agua potable o hervida.

c.- No consumir este tipo de alimentos (verduras crudas) en puestos ambulatorios, los cuáles siempre están a la intemperie (expuestos al polvo).

d).- No consumir este tipo de alimentos (verduras crudas), en aquellos lugares (establecimientos fijos) en los cuáles la limpieza e higiene tanto del lugar como de las personas sea de calidad dudosa.

7 - Concientizar al público consumidor de la importancia que tiene el consumir alimentos preparados bajo condiciones de limpieza adecuadas, así como indicarles el riesgo que existe de contraer enfermedades gastrointestinales, si no se llevan a cabo estas buenas prácticas higiénicas.

X ANEXOS

ANEXO 1

METODOLOGIA DESGLOSADA DE LA PRUEBA DEL RANGO DE WILCOXON-VARIABLE DE RESPUESTA ORDINAL

1. Plantear Hipótesis Nula, a Hipótesis alternativa
 - Ho = Ambos Métodos son Equivalentes
 - Ha = Ambos Métodos no son Equivalentes
2. Fijar quien es Xi y quien Yi
 - (Xi) = Resultados obtenidos utilizando el caldo de cultivo "EC"
 - (Yi) = Resultados obtenidos utilizando el caldo de cultivo "A-1"
3. Calcular las diferencias entre los pares de valores
4. Si alguna diferencia es cero se elimina ese dato
5. Ordenar los valores absolutos de las diferencias (Xi - Yi) en orden de menor a mayor
6. Asignar el rango a las diferencias obtenidas, empezando por el menor valor
7. Si hay más de una diferencia con el mismo valor obtener la media aritmética de los rangos que le corresponden y se le asigna el valor medio a cada uno.
8. Reasignar los signos de las diferencias obtenidas a el rango que le corresponden
9. Sumar los rangos con signos positivo y llamarlo valor doble U positivo (W+)
10. De acuerdo al número de datos que tengamos en el rango con signo determinar el valor de H

11. Obtener el valor de la media de acuerdo a la siguiente formula.

$$\text{MEDIA} = \frac{n(n+1)}{4}$$

Donde n es igual al tamaño de la muestra

12. Si (W+) es mayor que el valor de la media restarle a (W+) el valor de 0.5

13. Si (W+) es menor que la media entonces sumarle 0.5

14. Calcular la varianza.

a) Si no tenemos repetición en la diferencia alcular la varianza de la siguiente manera.

$$\text{Varianza} = n(n+1)/(2n+1)/24$$

$$\text{Desviación Standard} = n(n+1)/(2n+1)/24$$

b) Si tenemos más de una repetición en las diferencias (Xi-Yi). Calcular la varianza de la siguiente manera.

$$\text{VARIANZA} = \frac{n(n+1)(2n+1)}{24} - 1/48 (t_i(t_i-1)(t_i+1))$$

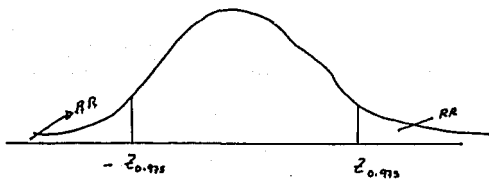
Donde t_i es igual al número de empates

15. Obtener el valor de z de acuerdo a la siguiente formula.

$$Z = \frac{(W+) - \text{MEDIA}}{\text{DESVIACION STANDARD}}$$

17. Obtener el valor de z de tablas con el valor de n que corresponda y $\alpha = 0.025$

18 Comparar los valores de Z , y aceptar ó rechazar la hipótesis de acuerdo a las regiones indicadas en la siguiente figura.



ANEXO 2

IDENTIFICACION DE GERMENES

De los tubos de la prueba de confirmacion que muestran formacion de gas en el tubo de Durham, extender material con el asa de inoculacion sobre agar de eosina azul de metileno, procurando aislar las colonias. Incubar a 35°C mas menos 0.5°C durante 24 horas. Las bacterias coliformes forman colonias con centro pardo a negro sobre el agar de eosina azul de metileno. Las colonias de Escherichia coli muestran sobre este medio de cultivo un color verde con brillo metalico.

Prueba del indol

De las colonias obtenidas en las cajas de agar de eosina azul de metileno, inocular un tubo con 5 ml de agua peptonada, incubar a 35°C durante 24 horas. Al termino de la incubacion recubrir el medio de cultivo con el reactivo del indol de Kovacs, aproximadamente, en un espesor de 5 mm y dejar en reposo dos minutos.

Reaccion positiva. capa reactiva de color rojo caraca.

Reactivo del indol de Kovac

Disolver 10g de paradimetilamina benzaldehido en 150ml de alcohol amilico. Una vez que se ha disuelto, agregar lentamente 50 ml de acido clorhidrico concentrado. Guardar, el reactivo en recipiente ambar con tapon de vidrio a una temperatura de 4°C, en cuyas condiciones permanecera estable por años.

Prueba de rojo metilo

De las colonias obtenidas en la indentificacion de germenos, inocular un tubo conteniendo 10ml de caldo rojo de metilo-voges proskauer e incubar durante 24 horas a 35°C. Agregar 5 gotas de rojo de metilo a 5ml de cultivo resultante.

Reaccion positiva. color rojo

Reaccion positiva. color amarillo

Solución indicadora de rojo de metilo. Disolver 0.1g de rojo de metilo en 300 ml de etanol absoluto y completar hasta 500 ml. con H₂O destilada

Prueba de Voges de Proskauer

Del cultivo obtenido en la identificación de gérmenes, Inocular un tubo conteniendo 5 ml de caldo rojo de metilo- Voges Proskauer, incubar durante 48 horas a 35°C más o menos 0.5°C. A 1.0 ml. del cultivo resultante, agregar 0.6ml de solución de alfa naftol al 3% en alcohol absoluto mezclar, agregar 0.2ml de hidróxido de potasio al 40%, después de 2 a 4 horas se interpreta de la siguiente manera

Reacción positiva color rosa a rojo carmin
Reacción negativa sin coloración rosa

Ensayo de citratos

A partir del cultivo obtenido en la identificación de gérmenes, Inocular mediante un asa de inoculación, conteniendo muy poco material la superficie inclinada y mediante una picadura central a un tubo conteniendo agar citrato de Simmons, incubar durante 48 horas a 35°C más o menos 0.5°C

Reacción positiva. con crecimiento y en la mayor parte de los casos un viraje del color a verde azulado.

Reacción negativa- sin crecimiento

Evaluación.

Microorganismo	Indol	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citratos
<i>Escherichia coli</i>	+/-	+	-	-
Citrobacter	-	+	-	+
Grupo Klebsiella	+/-	-	+	+
Enterobacter	+/-	-	+	+

TABLA No. 1

NUMERO MAS PROBABLE DE ORGANISMOS

ANEXO 3

Tubos Inoculados: 3 con 1 ml dilución 1:10 - 0.1 g muestra
 3 con 1 ml dilución 1:100 - 0.01 g muestra
 3 con 1 ml dilución 1:1,000 - 0.001 g muestra

Tubos Positivos NM/ig				Tubos Positivos NM/ig				Tubos Positivos NM/ig				Tubos Positivos NM/ig			
3	3	3	NM/ig	3	3	3	NM/ig	3	3	3	NM/ig	3	3	3	NM/ig
(0.1)	(0.01)	(0.001)		(0.1)	(0.01)	(0.001)		(0.1)	(0.01)	(0.001)		(0.1)	(0.01)	(0.001)	
0	0	0	3.0	1	0	0	3.5	2	0	0	9.1	3	0	0	23.0
0	0	1	3.0	1	0	1	7.2	2	0	1	14.0	3	0	1	39.0
0	0	2	6.0	1	0	2	11.0	2	0	2	20.0	3	0	2	64.0
0	0	3	9.0	1	0	3	15.0	2	0	3	26.0	3	0	3	95.0
0	1	0	3.0	1	1	0	7.3	2	1	0	15.0	3	1	0	43.0
0	1	1	6.1	1	1	1	11.0	2	1	1	20.0	3	1	1	75.0
0	1	2	9.2	1	1	2	15.0	2	1	2	27.0	3	1	2	120.0
0	1	3	12.0	1	1	3	19.0	2	1	3	34.0	3	1	3	180.0
0	2	0	6.2	1	2	0	11.0	2	2	0	21.0	3	2	0	93.0
0	2	1	9.3	1	2	1	15.0	2	2	1	28.0	3	2	1	150.0
0	2	2	12.0	1	2	2	20.0	2	2	2	35.0	3	2	2	210.0
0	2	3	16.0	1	2	3	24.0	2	2	3	42.0	3	2	3	290.0
0	3	0	9.4	1	3	0	16.0	2	3	0	29.0	3	3	0	240.0
0	3	1	13.0	1	3	1	20.0	2	3	1	38.0	3	3	1	450.0
0	3	2	16.0	1	3	2	24.0	2	3	2	44.0	3	3	2	1,100.0
0	3	3	19.0	1	3	3	29.0	2	3	3	53.0	3	3	3	1,100.0

Referencias: Métodos Microbiológicos del A O A C 19 .

XI - BIBLIOGRAFIA

1. American Public Health Association, APHA. 1976 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 14a. Ed., American Public Health Association Washington, D.C
2. American Public Health Association APHA. 1981 Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. 14a. Ed., Joint Editorial Board. Washington, D.C.
3. Andrews, W.H. and Presnell, M.W. 1972. Rapid recovery of Escherichia coli from Estuarine water Applied Microbiology, 23 (3): 521-523
4. Andrews, W.H. Diggs, C.D. and Wilson, C.R. 1975 Evaluation of a medium for the rapid recovery of escherichia coliform shellfish. Applied Microbiology, 29(1), 130-131
5. Andrews, W.H., Wilson, C.R. Poelma, P.L. Bullock, L.K. McClure, F.D. and Gentile, D.E. 1981 Interlaboratory Evaluation of the AOAC method and the A-1 procedure for recovery of fecal coliforms from food. Association of Official Analytical Chemists, 64(5): 1116-1121
6. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola Nacional, 1985
7. Association of Official Analytical Chemists 1970. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C
8. Bagley, S.T. and Seidler, R.J. 1977 Significance of Fecal Coliform Positive Klebsiella Applied and Environmental Microbiology 23 (3): 1141-1148
9. Suttlix, R. 1961 The Significance of Various organism of fecal Origin in Foods and Drinking Water Journal Applied Bacteriology. 24 : 353-364

10 Chris Leach Fundamentos de Estadística. Enfoque No Paramétrico Para Ciencias Sociales Ed. Limusa México. pp 143-151.

11 Davidsohn, Israel M D , 1973 Diagnostico clinico Por el Laboratorio 6a Ed Salvat editores S.A Barcelona. pp 1049-1063

12 Davis, B, D , Dulbecco, R, Eisen, H N , Ginsberg, H.S and Wood, W.B 1980. Microbiology 3a. Ed , Harper and Row Publisher Inc. . Washington, D F pp 847-859

13 Francis, D.W., Peeler, J.T. and Tweet, R.M. Junio 1974. Rapid Method for Detection and Enumeration of Fecal Coliforms in Fresh Chicken. Applied Microbiology 27 (6). 1127-1130. U.S.A.

14 Eduardo, F E 1976 El Virus y la aplicación de los Estándares Microbianos en el control sanitario de los Alimentos. D.G.I S F

15. Eduardo, F E. 1981 Microbiología Sanitaria, Agua y Alimentos. Universidad de Guadalajara EDUG V-1

16. Frazier, C.W. 1960 Food Microbiology 2a. Ed. McGraw Hill pp. 201-204

17. Holden, W 1970 Water Treatment and Examination. Ed J&A Churchill, Londres

18. Hunt, D A, Lucas, J P , McClure, F.D., Spinger, J. and Newell R. 1980 Comparison of Modified A-1 method With Standard EC Test for Recovery of Fecal Coliform Bacteria From Shellfish. Association of Official Analytical Chemists 64 (3) 607-610.

19 Hurst, A. 1977, Bacteria injury. a review Canadian Journal of Microbiology. 23 (6). 936-944

- 20 James, D.P., Anne, R.M. and John, A.C. Mayo 1979 Comparison of Broth and Medium A-1 for the Recovery Escherichia Coli from frozen ARE Shucked Snow Crab Applied and Environmental Microbiology 37: 836-840
21. Jawetz, E. W., Wainick, Joseph. L., y Aieberg, E Manual de Microbiología Médica 7a. Edición. pp 95
- 22 J,W B , John, E.D., 1984 Parasitología Médica. 3a. Edición Interamericana. pp 11-16
23. Kenneth L.B. ph, B., SC. M.P., Robert P. Williams, A.B.SC. M. Microbiología. 1976 3a Impresión. pp 381
- 24 Ma. del Pilar, L.H., 1980 Comparación del Método Tradicional Para la Determinación de Coliformes Fecales con los Métodos A-1 y EC directo Tesis (Licenciatura) Facultad de Química. U.N.A.M.
25. Larmond, E. 1977. Laboratory Methods for sensory evaluation of food Food Research Institute Ottawa, Ontario.
26. Márquez, Ma José. 1983 Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico-Biológicas 1a Edición. U.N.A.M. E.N.E.P. Zaragoza pp 409-502
27. Microorganismo in Food. parte 1. Their Significance, Methods of Enumeration. 2a Ed. pp 3-11, 53-59
28. Morris Fishbein., Bernard F Surkiewicz, Elijah F. Brown., and Ralph J. Groomas Marzo 1967 Applied Microbiology 15 (2) pp 233-238
- 29 Official Methods of Analysis. (1980) 13TH. Ed., AOAC Arlington, VA
30. P L Gainey and Thomas, H.L. Junio 1957. Microbiology of Water and Sewage. Third Printing. Ed Prentice-Hall J INC.

31 Pelczar, M J, y Reid, R.D 1979 MICROBIOLOGIA. 1a. Ed. Mc Graw Hill. México D F

32 Raj, H., and J Liston 1961 Detection and Enumeration of Fecal Indicator Organism in Frozen Foods ESCHERICHIA COLI
APPLIED MICROBIOLOGY 9:171-174

33. Sanchez Cristina F. , 1978 AMBIENTE. Tesis (técnico Laboratorista) D.G.E.T.I., C.S.C.Y.T. No 148

34. Santaelilia, C., C.Ma 1985 Comparación de dos Métodos. NMP y A-1 para Coliformes Focales para evaluar la calidad sanitaria de las Palatas Heladas de Agua Tesis (Licenciatura): Universidad LA Salle Escuela de Químicos

35. Thatcher, F S and Clark, D S 1962 Microorganism in Foods University of Toronto Press. Toronto, Canada pp x 25.

36 Warbeck, M , RAY, B and Speck, M.L 1973 Repair and enumeration of injured coliforms in frozen foods. APPLIED MICROBIOLOGY 26 (3) . 919-924

37 Wayne, Daniel 1982 BIOMETRICALS Ed Limusa pp 175-180

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA