

300627

6



UNIVERSIDAD LA SALLE

Escuela de Química  
Incorporada a la U. N. A. M.

**Comparación de dos Métodos: NMP y A-1 Para Coliformes  
Fecales Para Evaluar la Calidad Sanitaria de las Paletas  
Heladas de Agua**

# TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

**Químico Farmacéutico Biólogo**

P r e s e n t a :

**Clara María Santaella Castañares**

México, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2002



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.

A mis padres, por el apoyo  
y la confianza que siempre  
depositaron en mi.

A Mari Carmen, que con su  
ejemplo contribuyó a mi de-  
seo de superación.

A Jaime, por su valio-  
sa ayuda, comprensión  
y amor.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Mi agradecimiento al personal del Departamento de Microbiología del Laboratorio Nacional de Salubridad donde fue realizado este trabajo, a la Q.B.P. Ma. de Lourdes Costa Rica, Directora de este plantel, a la Q.B.P. Cristina Parrilla y a la Q.B.P. Ofelia Girard. Con especial agradecimiento y afecto a la Q.F.B. Yolanda Ortega por su ayuda y el interés depositados en este trabajo.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Con mi más sincera gratitud a la Q.F.B. Ana Ma. Lacy, Asesora Académica de este trabajo, y al Ing. Jorge García A. por su ayuda y cooperación para la realización de este proyecto.

Al Q.F.B. Rodolfo Pastelin  
con gratitud

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Y a todas las personas que de alguna otra forma participaron en este trabajo.

# I N D I C E

	Pág.
I. INTRODUCCION.....	1
II. GENERALIDADES.....	3
1.- Microorganismos relacionados con infecciones gastrointestinales.....	3
2.- Indicadores microbianos del agua y los alimentos.....	8
3.- Ventajas y Desventajas de los <u>mi</u> croorganismos coliformes como <u>in</u> dicadores.....	13
4.- Indicadores microbiológicos de los alimentos.....	14
5.- Fecalismo y Fuentes de <u>contamina</u> ción.....	16
6.- Técnicas bacteriológicas para la evaluación de coliformes fecales en agua y en alimentos.....	21
7.- Microorganismos lesionados.....	24
III. MATERIAL Y METODOS.....	34
IV. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	46
V. CONCLUSIONES.....	65
VI. BIBLIOGRAFIA.....	67
VII. ANEXOS.....	76

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## I. INTRODUCCION.

Las paletas heladas son uno de los muchos alimentos de nuestro país que carece de normas y criterios de aceptación. Para establecerlos deben efectuarse estudios que se relacionen con el riesgo que pueda existir para el consumidor. Estos productos se consumen principalmente por la población infantil; su falta de control y vigilancia puede presentar un riesgo potencial, ya que pueden ser transmisores de enfermedades gastrointestinales.

En este trabajo se realizó un estudio microbiológico con el objeto de evaluar la calidad sanitaria de las paletas heladas de agua de pequeños establecimientos, que utilizan fruta natural, azúcar y agua como materias primas. Se llevaron a cabo los métodos de "Número más Probable" y "A-1" para determinar la cantidad de coliformes fecales presentes en las paletas heladas y se realizó una comparación de ambas técnicas con el objeto de evaluar su eficiencia.

En este tipo de productos la acidez propia de las frutas y la temperatura a la que se conservan, lesionan a los microorganismos siendo incapaces de multiplicarse y por lo tanto ponerse en evidencia. Debido a este tipo de lesiones, se evaluó y se aplicó una técnica de recuperación para los microorganismos dañados por congelación en las muestras, antes de su análisis.

El estudio se llevó a cabo durante ocho meses y se analizaron un total de 120 muestras y 20 establecimientos

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

diferentes de la Ciudad de México. Se escogieron los sabores de limón y tamarindo por ser algunos de los de mayor consumo, y fresa y piña ya que se producen con materias primas (frutas), que pueden presentar una elevada contaminación. Se analizaron 30 muestras de cada sabor con el objeto de evaluar estadísticamente los resultados de las muestras.

Este trabajo constituye una parte importante de una serie de estudios que podrán realizarse para establecer índices de contaminación microbiana en este tipo de productos. Asimismo, establece el inicio de diversas investigaciones que deberán realizarse con el objeto de aplicar técnicas de recuperación a diferentes productos alimenticios, ya que nos muestra la importancia de recuperar microorganismos dañados en alimentos.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## II. GENERALIDADES.

### I. MICROORGANISMOS RELACIONADOS CON INFECCIONES GASTROINTES- TINALES.

Muchos microorganismos y parásitos, se transmiten a través del agua y los alimentos y pueden causar enfermedades en personas que ingieren los productos contaminados. Para algunos microorganismos, los alimentos pueden servir únicamente como vehículo de transmisión, para otros como un medio en el que pueden llegar a multiplicarse, lo que puede provocar una infección o una intoxicación por alimentos (35).

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 (57). La contaminación que se origina por el desarrollo de los microorganismos en el agua potable en almacenamiento o 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 (37).

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

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

enfermedades. Entre ellos se encuentran:

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

En niños, algunas cepas de *Escherichia coli* producen gastroenteritis aguda. Infecciones progresivas que se añaden a las bacterias del colon pueden provocar bacteremia que termina en un shock (16,44).

● *Aerobacter*.- Su presencia en el agua no indica necesariamente contaminación fecal, ya que éste se encuentra en el suelo y las plantas más que en el tracto intestinal humano. Sus propiedades patogénicas son muy semejantes a las de la *Escherichia coli* (44).

● *Klebsiella*.- La presencia del género *Klebsiella* en agua indica contaminación de tipo fecal, ya que 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 3 % de las neumonías bacterianas agudas (10,16).

● *Proteus*.- Los miembros del género *Proteus* se en-

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

cuentran en las heces, agua, aguas de alcantarillado y materias en descomposición. Las especies de este género que más comúnmente se encuentran en medicina clínica son: *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* y *Proteus morgani*. Todas son relativamente no patógenos pero son capaces de causar infecciones en el tracto urinario y son ocasionalmente responsables de ataques agudos de enteritis particularmente en niños (16,44).

• **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 este elemento durante una semana o 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 a ser fatal. La fiebre tifoidea es una infección que se difunde por todo el mundo, pero es menos frecuente donde se siguen buenas prácticas sanitarias.

La fiebre paratifoidea es una enfermedad infecciosa humana causada por bacterias muy afines a la *Salmonella typhosa*. Se asemeja a la fiebre tifoidea pero es menos grave. En el hombre las especies que se encuentran más comúnmente son la *Salmonella paratyphy* y la *Salmonella schottmuelleri*.

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 solo para

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

el hombre sino también para algunos animales de sangre caliente. Comprende varias especies de importancia pero las que se encuentran con más frecuencia son la *Salmonella enteritidis* y la *Salmonella typhimurium*. Las enfermedades que causan estas bacterias son generalmente menos graves que las fiebres tifoideas (44).

● *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 del 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 solo unos pocos días. Esta enfermedad es raramente fatal excepto en niños jóvenes y adultos severamente debilitados (16,44).

● *Vibrio*.- La mayoría de los vibrios son saprofitos 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 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 seve-

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ros donde la enfermedad solo dura unos cuantos días (16).

● Amoeba.- 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 en 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 pequeño 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 o en los pulmones y aun en el cerebro (44).

Debido a la gran variedad de microorganismos que pueden encontrarse en el agua, se hace necesaria la detección de microorganismos patógenos en el agua. Sin embargo, la búsqueda de patógenos aunque es posible no sería práctica para emplearla como rutinaria por las razones siguientes:

- 1.- Los microorganismos patógenos llegan al agua esporádicamente y no sobreviven en ella durante largo tiempo; por lo tanto pueden no encontrarse en la muestra enviada al laboratorio y sin embargo estar presentes (44).
- 2.- Si existen en pequeño número es fácil que no sean detectados por las técnicas de investigación (44).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

3.- Para su identificación se requiere de un período prolongado, así como de técnicas muy específicas. Si existieran microorganismos patógenos en el agua que se analiza, muchas personas que consumen el agua durante el intervalo que transcurre entre la toma de la muestra y la obtención de los resultados, podrían haberse infectado (44,22).

Es por estas razones que se prefiere técnicas de mayor sencillez y sensibilidad, lo cual hace necesario llevar a cabo una estimación bacteriológica del agua (19).

## 2. INDICADORES MICROBIANOS DEL AGUA Y LOS ALIMENTOS.

Un indicador de contaminación en el agua puede ser cualquier agente microbiano, químico o físico que ponga de manifiesto el riesgo potencial al que están expuestos los seres vivos (60). Los indicadores microbianos son grupos de gérmenes de enumeración más fácil, y cuya presencia en cierto número se considera como una indicación de que el agua estuvo expuesta a condiciones que pudieran determinar la llegada a la misma, de microorganismos peligrosos y/o permitir la proliferación de especies patógenas (58).

El principio del indicador es una necesidad y no se ha encontrado un organismo conocido, específico del hombre que pueda utilizarse para indicar todos los riesgos potenciales a la salud. Ya que el agua puede contener una gran variedad de especies de microorganismos que actúan como contaminantes, los objetivos del examen microbiológico del

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

agua, son determinar si ésta se ha expuesto a la contaminación fecal, la cual puede ser la causa de un serio problema en la salud pública (40,57). Al comparar pruebas químicas y biológicas, se llegó a la conclusión de que las evaluaciones bacterianas son de mayor utilidad, ya que mediante ellas, es fácil distinguir la contaminación de origen fecal (40).

Los indicadores de la calidad sanitaria del agua que se utilizan más ampliamente desde 1880 han sido las bacterias coliformes. Coliformes es un término general que se da a las bacterias Gram negativas, facultativas, que no forman esporas, móviles o inmóviles y que fermentan la lactosa con producción de gas en 24 - 48 horas a 35°C. Habitan en tracto intestinal del hombre y los animales de sangre caliente, sin causar generalmente enfermedades gastrointestinales (16).

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 estos coliformes con la contaminación fecal suele no ser adecuada, ya 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. Según Houston lo consideró: " El examen del microorganismo *Escherichia coli* es el más práctico y delicado para detectar contaminación fecal y ser tomado como el indicador más real de un posible daño a la salud, esta prueba jamás se deberá omitir, y no se podrá

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

dar ninguna evidencia de contaminación fecal sin que se hayan evaluado estas bacterias en el agua" (26).

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 (16). 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 éstos 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 (58).

Existen diversas variedades serológicas de la especie *Escherichia coli* identificables, de las que se conoce desde hace algún tiempo, que son la causa de la diarrea infantil (15,58).

Antes de 1948, 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 lo quisieron atribuir a un papel patógeno, pero la individualización precisa de las diversas especies fue imposible en aquella época. Bray y Beaven en 1948, lograron aislar la misma especie de *Escherichia coli* que había sido la causante de una epidemia en 1945. Casi al mis-

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

mo 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 56.6 % y en todas las heces se encontró el microorganismo *Escherichia coli* presente (15). Es de especial importancia señalar que los adultos que se infectan por este microorganismo se vuelven portadores por cortos períodos y por lo tanto son potencialmente peligrosos para cualquier niño con quien se puedan asociar (58).

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 períodos, se consideró que era mejor medir todos los tipos de coliformes fecales que se encuentren 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 cepas, o aplicar las relativamente costosas pruebas del IMViC (58).

Los coliformes fecales son un grupo de microorganismos que se seleccionan mediante la incubación de un inóculo derivado de un medio de enriquecimiento de coliformes, a temperaturas más altas de lo normal (44.5°C). Estas preparaciones generalmente presentan una elevada proporción de microorganismos de la especie *Escherichia coli* y son por lo tanto útiles para indicar contaminación de origen fecal (58). Este grupo está compuesto principalmente por los microorganismos *Escherichia coli* y *Klebsiella* sp., encontrándose en heces humanas en un 96 % sobre la población total

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

de microorganismos y en un 93 % en animales de sangre caliente. A pesar de que el microorganismo *Klebsiella* sp. se aisló en diarreas de niños, se ha puesto en duda su patogenicidad (16). Esto puede deberse a que el sitio más común de infección del género *Klebsiella* es el tracto urinario (53), aunque se han encontrado también infecciones mayores como bacteriemia (53), meningitis (47) y neumonía (39).

Debido a la presencia del microorganismo *Klebsiella* en áreas aparentemente libres de contaminación fecal se considera como un microorganismo coliforme total. Sin embargo, este microorganismo normalmente se encuentra en el tracto intestinal de humanos y de animales de sangre caliente (10, 13).

Para asegurar el significado de la especie *Klebsiella* patógena como un microorganismo coliforme fecal positivo, Bagley y Seidler, realizaron pruebas de filtración de membrana y número más probable al emplear temperaturas de 44.5°C (5). Ellos encontraron que del 100 % de las cepas de *Klebsiella* que se aislaron por la técnica del número más probable, el 83 % formó parte de los microorganismos coliformes fecales.

Existe por lo tanto suficiente evidencia para incluir a las especies de *Klebsiella* como coliformes fecales y además se tiene la certeza de que su presencia es un indicativo de peligro potencial para la salud del hombre y los animales (5).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS MICROORGANISMOS COLIFORMES COMO INDICADORES.

Las ventajas de analizar al grupo coliforme en agua y no al de patógenos específicos son: (34)

- 1.- Los organismos coliformes están constantemente presentes, tanto en los intestinos de humanos sanos como en enfermos en gran número, y miles de millones de estos organismos, son excretados diariamente por una persona. Se estima que por cada bacilo-tifoideo u otro patógeno (por ejemplo *Entamoeba histolytica* o virus de la polio o hepatitis), en suministros de agua contaminada, usualmente hay millones de organismos coliformes especialmente *Escherichia coli*.
- 2.- 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.
- 3.- La presencia de estos microorganismos se puede detectar fácilmente mediante técnicas de rutina.
- 4.- La ausencia de coliformes es una evidencia de la potabilidad del agua desde el punto de vista microbiológico.

- 5.- El aumento en cantidad es aproximadamente proporcional al grado de contaminación.
- 6.- Los miembros del grupo coliforme no son patógenos, excepto algunas cepas.

Las desventajas del grupo coliforme como índice de contaminación son:

- 1.- 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.
- 2.- No es posible determinar con precisión el momento en que principió la contaminación.
- 3.- Algunas de las especies pueden multiplicarse en aguas contaminadas.
- 4.- A veces la flora bacteriana no coliforme impide el crecimiento de los coliformes (prueba falsa negativa), o produce gas sin haber microorganismos coliformes (prueba falsa positiva).
- 5.- Un número pequeño de coliformes fecales, da negativa la prueba de temperatura.

#### 4.- 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 (58). Las pruebas de indicadores en alimentos que más se utilizan son:

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

#### Microorganismos mesofílicos aeróbios.

Se consideran microorganismos mesófilos aquellos que tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 20°C 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 estas, y un elevado riesgo de que se desarrollen microorganismos patógenos (41).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- 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 mesofílicas.
- 3.- Recuentos muy elevados nos indican que el alimento va a deteriorarse muy pronto (58).

En cuanto a los microorganismos coliformes totales, como estos se aislan de diversas fuentes, diferentes al material fecal, su presencia en alimentos no indica necesariamente contaminación fecal; por esto, la ausencia de microorganismos coliformes totales sólo se asume como una indicación de buenas condiciones sanitarias (14).

Por otro lado, la especie *Escherichia coli* es el indicador clásico de la presencia simultánea de bacterias patógenas entéricas 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 puedan 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 (58).

##### 5. FECALISMO Y FUENTES DE CONTAMINACION.

Se llama fecalismo a la diseminación en el medio am-

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

biente de la materia fecal humana y la transmisión de las formas infectantes frescas hasta los nuevos huéspedes. No solo los coliformes fecales se transmiten por el fecalismo, sino también otros parásitos, tales como los virus polio, diversas enterobacterias (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, etc) y varios protozoos (7).

En los países subdesarrollados, entre los que se encuentra México, es de gran importancia tratar el asunto del fecalismo ya 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 parasi

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

tosis 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.

El riego con aguas negras podría desempeñar también un papel importante en la diseminación de ciertas formas infectantes. Un estudio que se llevó a cabo en la población de Fresnillo (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 personal y la manipulación de aguas negras, que la ingestión de frutas y verduras que se riegan con estas aguas.

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 nece

TESIS CON  
TALLA DE ORIGEN

sarias. 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.

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 gran 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

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

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*.

Las ratas que en las ciudades viven en las cañerías e incluso penetran a las casas a través de los tubos de albañal, llevan formas infectantes en su pelo y en sus patas, que diseminan en muy diversos lugares.

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) el aire.

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; 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 estas, 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, en juague y manipulación en los mercados; sin embargo, las con

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

taminaciones 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.

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 el hombre antes de comer o durante la preparación de alimentos; también los platos, vasos y cubiertos, en los cuales a veces es posible ver huellas digitales de las personas que los manejaron 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.

#### 6. TECNICAS BACTERIOLOGICAS PARA LA EVALUACION DE COLIFORMES FECALES EN AGUA Y EN ALIMENTOS.

Los métodos oficiales de análisis bacteriológico para la determinación y la enumeración de microorganismos coliformes fecales se describen en el "Standard methods for the examination of water and wastewater" (1). Estas determinaciones microbiológicas proporcionan un buen índice de contaminación fecal. 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 mínimo de 48 horas y un máximo de 72 horas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

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 (11). 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 presuntiva, aunque también en la confirmatoria y la completa (20).

Evans y et al. (20) realizaron una modificación a la técnica del "Número más Probable" (NMP), que consistía en la técnica estándar del NMP y posteriores manipulaciones que se llevaron a cabo para recuperar coliformes de las pruebas que resultaron negativas. Ellos encontraron que existió una interferencia para la detección de microorganismos coliformes en un 80 % de los casos.

Geldrich et al. (25), especularon que la competencia por la lactosa de bacterias no coliformes y la presencia de bacterias antagónicas a los microorganismos coliformes, pueden producir una interferencia para éstos.

Hutchinson, encontró que al inocular bacterias antagónicas simultáneamente con la especie *Escherichia coli* en tubos de caldo lauril, existió una reducción en los resultados del NMP de un 28 % a un 97 % (30).

Contrario a esto, se realizaron una serie de estudios que se asocian a resultados falsos positivos con la técnica del NMP. Hussong et al. (29), encontraron mediante cierta investigación que realizaron, cepas productoras de gas que no pertenecían a la familia de las Enterobacterias. Además descubrieron números desproporcionados de cepas atípicas y anaerogénicas fermentadoras de la lactosa. Ellos concluyeron que no existe un grupo taxonómico específico para las reacciones falsas positivas en la prueba presuntiva para microorganismos coliformes, ya que en su estudio encontraron más de 10 especies que se aislaron de caldo lauril, causantes de resultados falsos positivos. Estas especies no se encontraron en caldo verde brillante, con lo que se confirma así la complejidad de las interacciones microbianas que conducen a las reacciones positivas falsas (29). Las reacciones positivas falsas se atribuyen a diferentes causas: bacterias productoras de gas aerobias o anaerobias facultativas (29); la presencia de organismos coliformes que no sobreviven a los procedimientos de detección que se emplean (29); antagonismo microbiano (12), y la presencia de bacterias oxidasa positiva capaces de producir gas a partir de la lactosa (36).

Más adelante, al paso de los años, se desarrollaron una gran variedad de medios de cultivo para la enumeración de microorganismos coliformes fecales y la especie Escherichia coli mediante las técnicas de filtro de membrana o de la técnica del número más probable (17).

En 1972, Andrews y Presnell elaboraron un nuevo medio para recuperar las cepas de Escherichia coli de aguas de estuario. El medio que se desarrolló por ellos recibió el

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

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 257 veces (3). Más tarde, el mismo Andrews et al., evaluaron en ostiones este nuevo medio, en los 24 meses subsecuentes 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, y la presencia de reacciones positivas falsas se redujo sustancialmente (2). La utilidad de este nuevo medio, se evaluó posteriormente por otros investigadores en camarón (42), en carne de cangrejo (46) y en aguas donde crecen los ostiones en diversas áreas geográficas exitosamente (4).

## 7. MICROORGANISMOS LESIONADOS.

La mayoría de los productos alimenticios reciben algún procesamiento o contienen agentes naturales o adicionales, 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 (28,48).

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 (28). Se detectan bacterias lesionadas después de la exposición a temperaturas de congelación (43,45), calentamiento (18,24), irradiación (54), sustancias químicas como fenol (31), antisépticos (55,56), y acidificantes (48).

Estos microorganismos ya débiles son generalmente incapaces de crecer en medios selectivos, pero pueden 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 enumeración y detección. Se presume que estos agentes selectivos, como las sales de bilis, el lauril sulfato de sodio, el verde brillante, el rojo neutro y el violeta cristal, interfieren en el proceso reversible de reparación de las células dañadas y previenen su multiplicación subsecuente (49,55). Cuando los microorganismos lesionados se han reparado, vuelven a tomar resistencia a estos compuestos (59).

Esta lesión subletal que sufren los microorganismos que se exponen a tratamientos físicos y químicos, provoca que se lesionen también los microorganismos indicadores. Además 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, estos 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 vialidad de la mayoría de las bacterias. Más del 90%

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

de las bacterias indicadoras pueden lesionarse cuando se exponen a aguas naturales por menos de una semana (9).

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 (38). 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 basado en la cláusula de Postgate, que " bacterias sujetas a tensión se vuelven hipersensibles a tensiones secundarias " (32). En la cuenta de vaciado en placa ciertas proporciones de las muestras se diluyen en amortiguador, se transfieren a cajas de Petri estériles, seguidas de una adición de aproximadamente 20 ml del medio de cultivo con agar a temperatura entre 43 y 45°C, se mezclan ligeramente y se permite la solidificación del agar. Klein y Wu, encontraron que en un período 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 (32).

Ahora bien, se sabe que todos los procesos físicos lesionan a los microorganismos. La congelación es uno de ellos, y en el caso de las paletas heladas, es el único método de conservación que se utiliza. La congelación generalmente produce una reducción considerable en el número de organismos viables en el alimento, pero no esteriliza al alimento. El porcentaje de microorganismos que mueren du-

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

rante la congelación es cuando menos del 50 % al 80 %, si se utilizan un proceso de congelación rápida. Las temperaturas bajo cero, ocasionan lesiones metabólicas a algunas bacterias, por lo que deben aumentarse sus requerimientos nutricionales. El efecto letal depende de diversos factores y de acuerdo a Frazier (21), estos son algunos de ellos:

- 1.- El tipo de microorganismo y su estado.- La resistencia a la temperatura de congelación varía con el tipo de microorganismo, su fase de crecimiento y si se encuentra en estado vegetativo o esporulado. Se cree que una bacteria en su fase logarítmica de crecimiento, muere más fácilmente que en otras fases, y que las esporas son más resistentes que las células vegetativas correspondientes.
- 2.- La temperatura durante la congelación y el almacenamiento.- Haines (21), reportó que las bacterias mueren más rápidamente en un rango de  $-1^{\circ}\text{C}$  a  $-5^{\circ}\text{C}$ . Mientras más rápido sea el proceso de congelación, más rápidamente la temperatura pasará a través de la zona crítica y habrá menor número de muertes. Haines también encontró que el almacenamiento de alimentos congelados a temperaturas dentro del rango crítico, dan como resultado una mayor reducción del número de bacterias, que si se almacenan a temperaturas más bajas. Las temperaturas de congelación muy bajas no parecen ser más letales que las temperaturas moderadamente bajas. Una congelación muy rápida, provoca una pequeña reducción en el número de bacterias.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Una congelación lenta permite cierto crecimiento de los microorganismos antes de que el alimento resulte congelado. A pesar de ésto, muere un porcentaje mayor de microorganismos mediante la congelación lenta que por la congelación rápida.

- 3.- El tiempo de almacenamiento y las condiciones de congelación.- El número de microorganismos viables disminuye de acuerdo a la prolongación del tiempo de almacenamiento. Esta disminución es gradual y algunos microorganismos sobreviven después de muchos años. Supuestamente, la muerte se auna a la falta de alimento.
- 4.- El tipo de alimento.- La composición del alimento influye en la proporción de microorganismos muertos durante la congelación y el almacenamiento. El azúcar, la sal, las proteínas, los coloides, la grasa y otras sustancias pueden ser protectoras, mientras que una humedad elevada y un pH bajo, aceleran la muerte.
- 5.- Congelación y descongelación.- Se reporta que una congelación y descongelación alternadas, aceleran la muerte de los microorganismos, pero aparentemente no resulta así en todos los casos. Si la descongelación es razonablemente rápida y el alimento se consume inmediatamente, habrá sólo un pequeño crecimiento de microorganismos, porque las temperaturas serán demasiado bajas para cualquier crecimiento apreciable. Solamente cuando la descongelación es muy lenta, o cuando

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

el alimento se le deja a temperatura ambiente, hay una oportunidad para cualquier aumento considerable de crecimiento y actividad de los microorganismos.

En realidad no se conoce si diferentes tratamientos causan lesión a los microorganismos en diferentes sitios. Es to es importante porque se podría anticipar que si el sitio de lesión es el mismo, se podrían utilizar las mismas condiciones para la recuperación. Sin embargo, se requerirían diferentes condiciones de reparación, si se tuvieran que reparar diferentes sitios de la célula (28). Algunas de las manifestaciones de los microorganismos lesionados son: deterioro de la permeabilidad, desactivación de ciertas enzimas, degradación de los ribosomas y una elevada sensibilidad a agentes selectivos (52).

Actualmente, se conoce que la congelación o el proceso de congelación-descongelación, provoca que estos organismos pierdan ciertas enzimas, por lo que se vuelven sensibles a ciertos agentes selectivos. Parece ser que la envoltura exterior de los microorganismos Gram negativos puede lesionarse mediante tratamientos relativamente benignos (28). Alur y Greez, pensaron que el mecanismo de lesión del microorganismo *Escherichia coli* debido a la congelación-descongelación, podría atribuirse a la torción de alguna de las cadenas del DNA (28).

En 1972, Ray y Speck realizaron una investigación mediante la congelación y descongelación de una suspensión acuosa de una cepa de *Escherichia coli*. En sus resultados determinaron de acuerdo a la incapacidad de formar colonias

en agar de soya tripticasa con 0.3 % de extracto de levadura, que aproximadamente el 50 % de las células había muerto. Entre los sobrevivientes, más del 90 % de las células se encontraron lesionadas ya que no formaron colonias en agar de soya tripticasa con extracto de levadura que contenía 0.1 % de " deoxycholate ". Encontraron que los daños que se producen a la membrana permeable permiten la salida de componentes celulares como proteínas, péptidos, aminoácidos y ácidos nucleicos, y la entrada de varios iones del medio ambiente a las células. Los cambios que facilitan la salida de varios componentes esenciales para la integridad celular, se cree que son la causa de las lesiones y de la subsecuente muerte de las bacterias Gram negativas que se someten a congelación. A pesar de ésto, la lesión del microorganismo *Escherichia coli* que se indujo por la congelación-descongelación fue reparable, ya que las células dañadas recobraron la habilidad de multiplicarse en un medio que contenía " deoxycholate ". También comprobaron que un porcentaje considerable de células, era capaz de reparar las lesiones bajo condiciones que son insuficientes por sí mismas para sostener el crecimiento, como es la exposición con  $K_2HPO_4$  y con piruvato. No obstante, se observó una mayor cantidad de reparación así como un menor retraso para la subsecuente multiplicación en un medio rico en nutrientes (52).

En ese mismo año, Ray y Speck estudiaron el proceso metabólico durante la reparación de la cepa *Escherichia coli* lesionada por congelación, en  $K_2HPO_4$ . Reportaron que la recuperación en  $K_2HPO_4$  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, por 24 horas. Distintos desactivantes de la síntesis del ATP, redujeron el proceso de reparación en  $K_2HPO_4$ . Los datos indican que las células sintetizan energía en forma de ATP y probablemente la utilizan en el proceso de reparación. La adición de ATP facilitó el restablecimiento de la lesión (51).

Más tarde, estos mismos investigadores realizaron estudios con microorganismos lesionados, expuestos a los medios de lauril sulfato y verde brillante, e indicaron que estos medios impiden la formación de colonias posteriormente en agar de soya tripticasa con extracto de levadura. Comprobaron que los daños que se provocan por congelación se podían reparar rápidamente en un medio de soya tripticasa con extracto de levadura. Las células que se rehabilitaron formaron colonias en agar bilis rojo violeta (RVBA) y no hubo inhibición en los medios de lauril sulfato y verde brillante (50).

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 período 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 tripticasa con extracto de levadura, y que resulta muy conveniente realizarse previo a la determinación del " Número más Proba

ble ", ya que se conoce que la rehabilitación de las bacterias coliformes, no produce efectos adversos en la flora asociada (59).

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 35°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. (27), realizaron un estudio comparativo de la eficiencia del método A-1 modificado con la técnica EC estándar para la recuperación de microorganismos coliformes fecales de ostiones. Encontraron que la recuperación de microorganismos coliformes fecales de ostiones que se contaminan naturalmente fue más alto por el 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 analiza ron. No se encontró estadísticamente diferente significati va entre los dos métodos, en un promedio global para la recuperación de la cepa *Escherichia coli*.

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 pe ligro 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 (28).

Es por lo tanto importante tratar de perfeccionar las técnicas y los medios de cultivo conocidos hasta hoy, para lograr la detección de microorganismos indicadores lesionados y de microorganismos patógenos lesionados.

### III. MATERIAL Y METODOS.

#### A. MATERIAL.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

##### 1.- Equipo

- a) Asas para siembra
- b) Autoclave "IMMSA", control automático
- c) Balanza granataria "Ohaus", capacidad 2 Kg
- d) Baño de agua "Grant", con agitación y control de temperatura
- e) Cajas de Petri de plástico con área de 56 cm<sup>2</sup>
- f) Congelador "Rheem Revco" (-15°C)
- g) Contador de colonias "Darkfield Quebec", modelo 3325
- h) Cuarto incubadora (35°C)
- i) Dispositivos de Durham
- j) Fracos de cristal "Pyrex", con capacidad de 200 ml, con tapones de rosca
- k) Frascos de vidrio de boca ancha
- l) Gradillas metálicas y de plástico
- m) Horno "Freas", con aire caliente circulante
- n) Incubadora "Caisa Alfey", modelo E212 (25°C)
- o) Licuadora
- p) Matraces "Pyrex" de 4000, 2000 y 1000 ml
- q) Mecheros Bunsen para siembra
- r) Pipetas de 10, 5, 2 y 1 ml
- s) Pipeteros de aluminio
- t) Potenciómetro "Corning", modelo 5
- u) Tapones de plástico.
- v) Termómetro con rango de -20°C a 110°C.
- w) Tubos de ensaye "Pyrex" de 175x22 mm y de 150x16mm.

## B.- METODOS.

### 1.- Preparación y esterilización del material de vidrio y los medios de cultivo.

Esterilizar todo el material de vidrio, incluso los frascos de muestreo en un horno con aire caliente circulante a 160°C, durante dos horas. Antes de someter las pipetas a esterilización colocar un tapón de algodón en el extremo contrario a la punta.

Preparar los medios de cultivo A-1 y el medio de soya tripticasa adicionado con extracto de levadura a partir de sus ingredientes básicos, por no existir en forma deshidratada, y preparar los medios de cultivo restantes únicamente hidratándolos de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min, a 15 lb de presión, todos los medios de cultivo que se preparan ya sea en frasco o en tubo, y tener la precaución de sacarlos al momento en que ya no exista presión en el autoclave, para evitar degradación de alguno de los componentes de los medios de cultivo o la evaporación de estos últimos.

Al someter a esterilización todos los frascos de vidrio, tanto los de muestreo como los que contienen algún medio de cultivo, colocar previo a la esterilización, un pedazo de papel aluminio entre el cuello y la tapa del frasco para evitar que se pegue la tapa al frasco por el calor.

El tiempo que transcurre entre la preparación de los medios de cultivo y su utilización nunca debe ser mayor de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

7 días.

## 2.- Método de recuperación para microorganismos dañados.

Inicialmente llevar a cabo una evaluación del medio de recuperación. Preparar en el laboratorio paletas de agua en condiciones estériles e inocularlas con una solución acuosa de diferentes inóculos de una cepa de *Escherichia coli* con producción de gas probada. Al contener el inóculo, sembrar parte de cada una de las paletas de agua que se prepara, por medio de la técnica de vaciado en placa, en medio agar bilis y rojo violeta (RVBA), e incubar a 35°C por 24 horas con el objeto de determinar la cuenta inicial de microorganismos *Escherichia coli* presentes. Someter la otra parte de las paletas con diferentes inóculos a congelación por 24 horas a -15°C. Al transcurrir este tiempo, dejar descongelar y dividir cada muestra en dos partes:

a) De una de estas partes, tomar 10 ml y adicionarlos a 90 ml de caldo de soya tripticosa enriquecido con extracto de levadura (medio de recuperación). Incubar a 25°C por una hora, con el objeto de recuperar únicamente los microorganismos dañados sin que exista multiplicación (59). Después de incubar, la suspensión que se forma utilizarla para realizar las técnicas de "Número más Probable" y "A-1", y para sembrar nuevamente en RVBA con el objeto de determinar el número de microorganismos *Escherichia coli* viables.

b) La parte restante de la muestra, utilizarla para

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

sembrar en RVBA y llevar a cabo las técnicas de " Número más Probable " y "A-1", que incluye para microorganismos lesionados un período de resucitación de tres horas, previo a la incubación a 44.5°C (ver figura 1).

De acuerdo a los resultados que se obtienen por medio de esta técnica (ver sección V, tablas 1, 2 y 3), las paletas heladas que se muestrean, incluyen para la técnica del " Número más Probable " un período de recuperación de 1 hora a 25°C en caldo de soya tripticasa adicionado con 0.3 % de extracto de levadura, mientras que por el método "A-1", únicamente un período de recuperación de tres horas a 35°C previo a la incubación a 44.5°C, ya que por la técnica de "A-1" no existió diferencia al emplear el medio de recuperación (ver fig.2).

### 3.- Recolección y transporte de la muestra.

Tomar las muestras en frascos de vidrio de boca ancha estériles. El procedimiento que se lleva a cabo para la toma de las muestras es el siguiente: Destapar el frasco e inmediatamente introducir las paletas, aproximadamente 80 ml y volver a cerrar el frasco. Después de recolectar las muestras transportarlas al laboratorio y dejarlas derretir antes de llevar a cabo el análisis. El intervalo que transcurre entre la toma de la muestra y su llegada al laboratorio en ningún caso debe exceder de dos horas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.- Diluciones.

Al transcurrir el tiempo de recuperación para los microorganismos que se encuentran dañados en las paletas heladas, en el caldo de soya tripticasa adicionado con extracto de levadura, utilizar este caldo, que se prepara con 90 ml de este medio y 10 ml de la muestra, como la dilución  $10^{-1}$ . Preparar a partir de ésta, las diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , mediante la adición de 10 ml de esta mezcla a 90 ml de solución buffer (ver fig 3).

#### 5.- Técnica del " Número más Probable "

Prueba Presuntiva.- Cuando las diluciones están hechas, pipetear 1 ml de cada dilución decimal a series de tres tubos preparados con 10 ml de caldo lauril sulfato. Incubar a  $35^{\circ}\text{C}$ , por 24 y 48 horas. Después de 24 horas sacar los tubos con producción de gas, que son positivos para coliformes, y volver a incubar los que no contienen gas. La ausencia de gas a las 48 horas indica una prueba negativa, por lo tanto ausencia de coliformes.

Prueba Confirmativa.- Para confirmar que los tubos que se seleccionan son positivos para coliformes fecales, transferir una asada de cada uno a tubos separados que contienen 10 ml de caldo bilis verde brillante al 2 %. Leer los tubos con producción de gas, después de incubar a  $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas en baño maría con circulación forzada. La presencia de gas en los tubos indica la presencia del grupo coliforme fecal y constituye una prueba confirmativa (ver fig 2).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

6.- Técnica del método "A-1"

Para el procedimiento del método "A-1", realizar una determinación de número más probable con series de tres tubos e inocular la muestra homogénea directamente a los tubos que contienen el medio A-1. Adicionar 10 ml de la muestra a cada uno de la primera serie de los tres tubos que contienen 10 ml del medio A-1 a doble concentración, y 1 ml y 0.1 ml de la muestra a las otras dos series de tres tubos que contienen 10 ml del medio A-1 a simple concentración (ver fig 4).

Incubar los tubos del medio A-1 con el inóculo a  $35 \pm 0.2^\circ\text{C}$  por tres horas, antes de someterlos a la incubación a  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  en un baño de temperatura controlada, durante  $21 \pm 2$  horas (ver fig 2). Calcular el número más probable de coliformes fecales, por medio de la combinación de tubos positivos con formación de gas.

7.- Técnica de recuento en placa para microorganismos lesionados.

Realizar recuentos en placa de las paletas heladas para tres diferentes tipos de microorganismos.

- a) Microorganismos coliformes totales.
- b) Microorganismos mesofílicos aerobios.
- c) Unidades formadoras de hongos filamentosos.

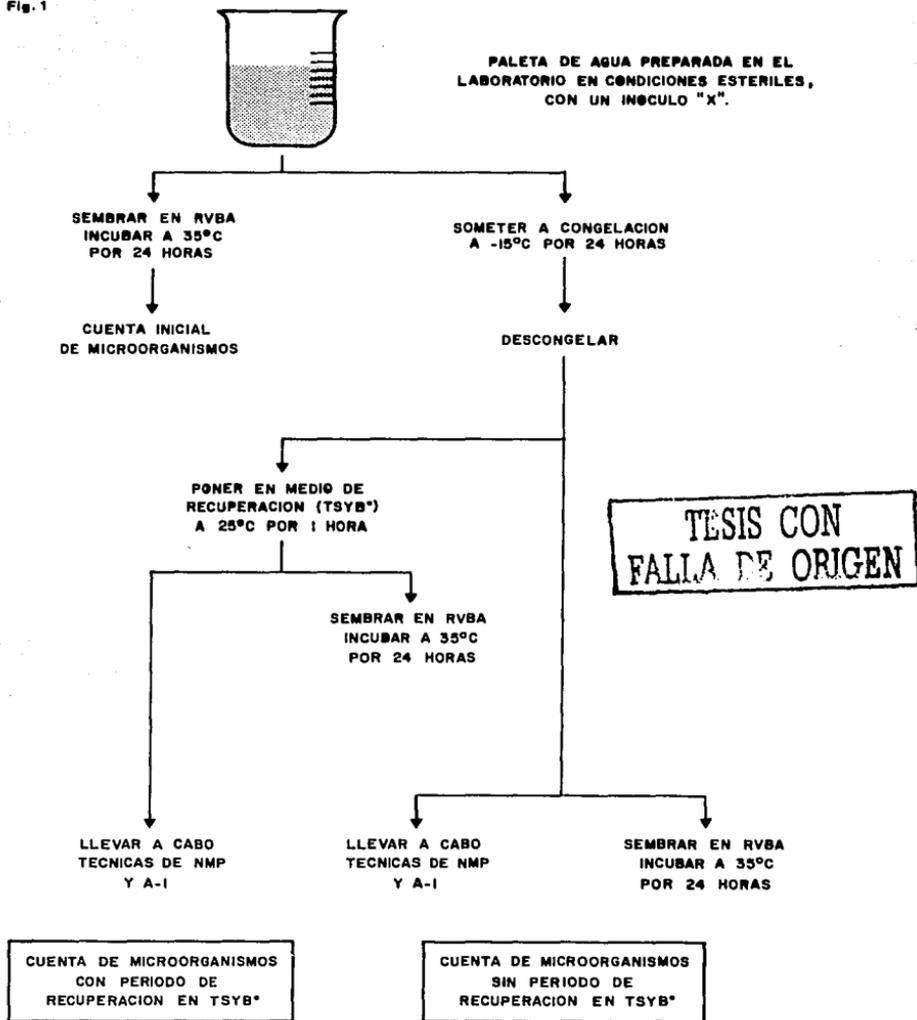
Para llevar a cabo el recuento de los microorganismos en los tres casos se parte de las diluciones hechas a partir de la solución que contiene 90 ml del medio de soya tripticasa adicionado con extracto de levadura y 10 ml de la muestra. Por encontrarse altamente contaminadas algunas muestras, en diversos casos hacer diluciones más allá de la dilución  $10^{-3}$ .

Para realizar este procedimiento, introducir 1 ml del material bacteriano en una placa de Petri. A continuación añadir de 15 a 20 ml del medio nutritivo de agar fundido, correspondiente al tipo de microorganismo que se desea determinar. Mezclar ambos íntimamente por rotación de la placa, para distribuir el material bacteriano en el medio por completo. Al solidificar, los organismos quedan incluidos en el gel. La incubación se hace bajo el supuesto tácito de que cada organismo crece y se reproduce dando origen a una colonia. Por consiguiente, el recuento de colonias que se realiza en la placa, refleja la población viable del material de inoculación.

Para llevar a cabo el recuento de microorganismos coliformes totales, utilizar el medio agar bilis rojo violeta e incubar a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Para microorganismos mesofílicos aerobios, utilizar el medio agar extracto glucosa y tripticaseína, e incubar a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas, mientras que para el recuento de hongos filamentosos, utilizar el medio agar de papa y dextrosa e incubar a  $22^{\circ}\text{C}$  durante 120 horas. Al transcurrir estos tiempos, leer estas cajas mediante un contador de colonias que facilita la lectura, ya que dispone de amplificación y fondo cuadrículado iluminado.

Escoger las cajas de las diluciones que contengan entre 30 y 300 colonias. Dentro de este orden el recuento puede ser exacto, y la posibilidad de interferencia en el crecimiento de un microorganismo por otro es mínima.

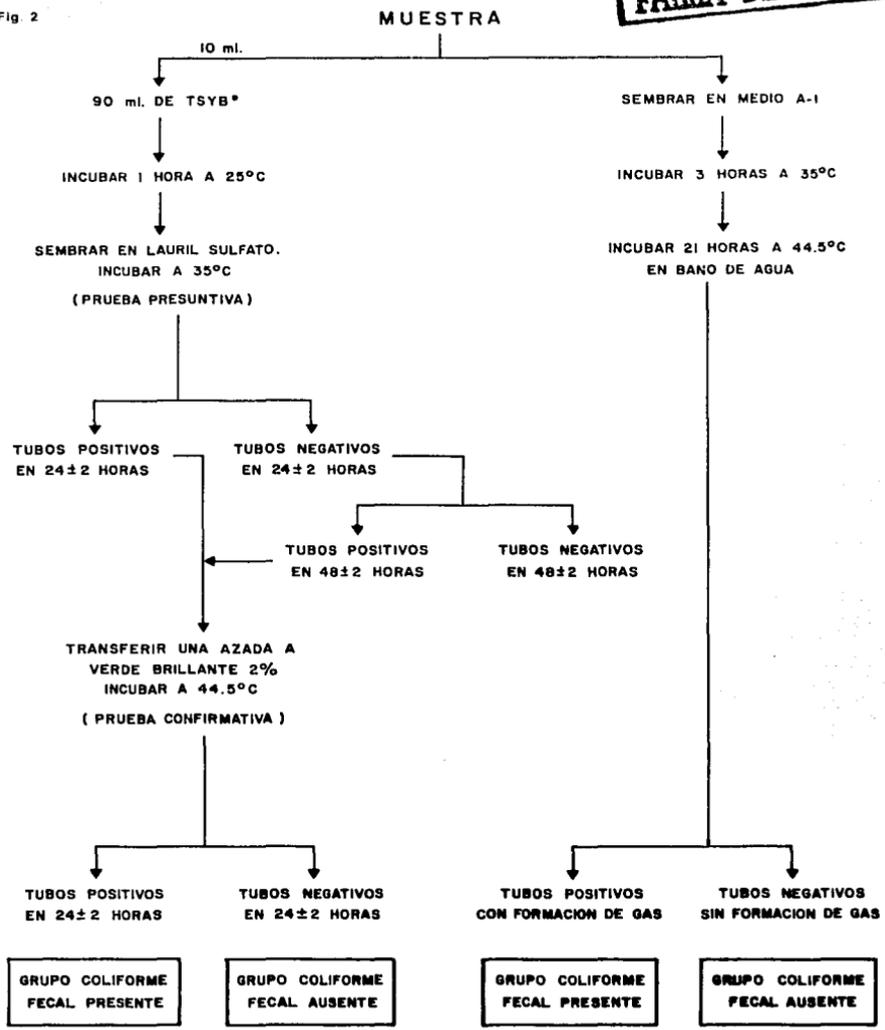
Fig. 1



\*TSYB = MEDIO DE SOYA TRIPTICASA CON EXTRACTO DE LEVADURA.

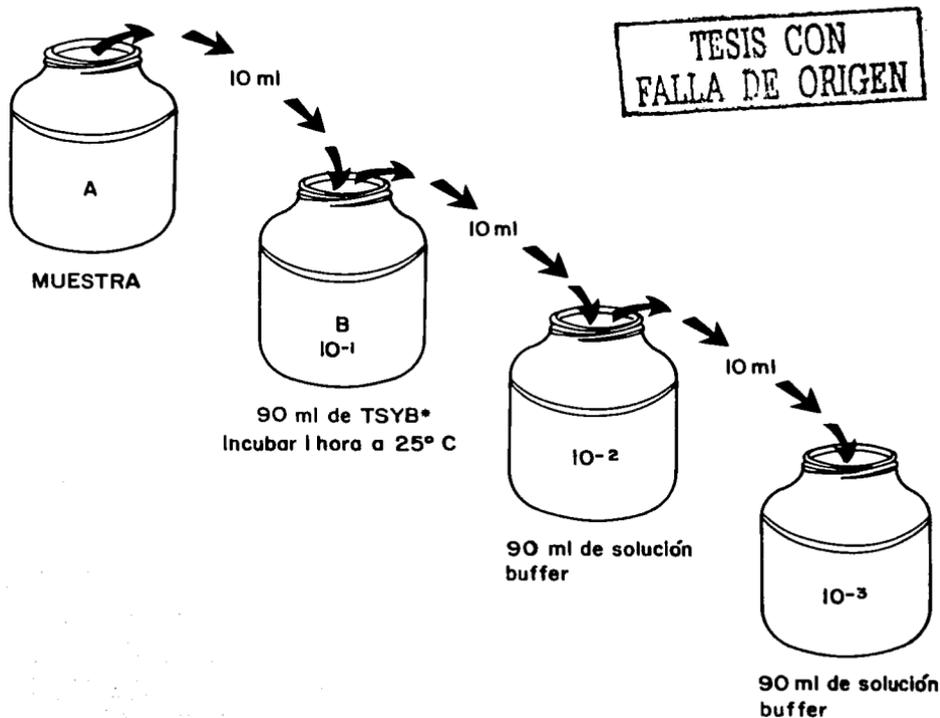
**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

Fig 2



\*TSYB= MEDIO DE SOYA TRIPTICASA CON EXTRACTO DE LEVADURA.

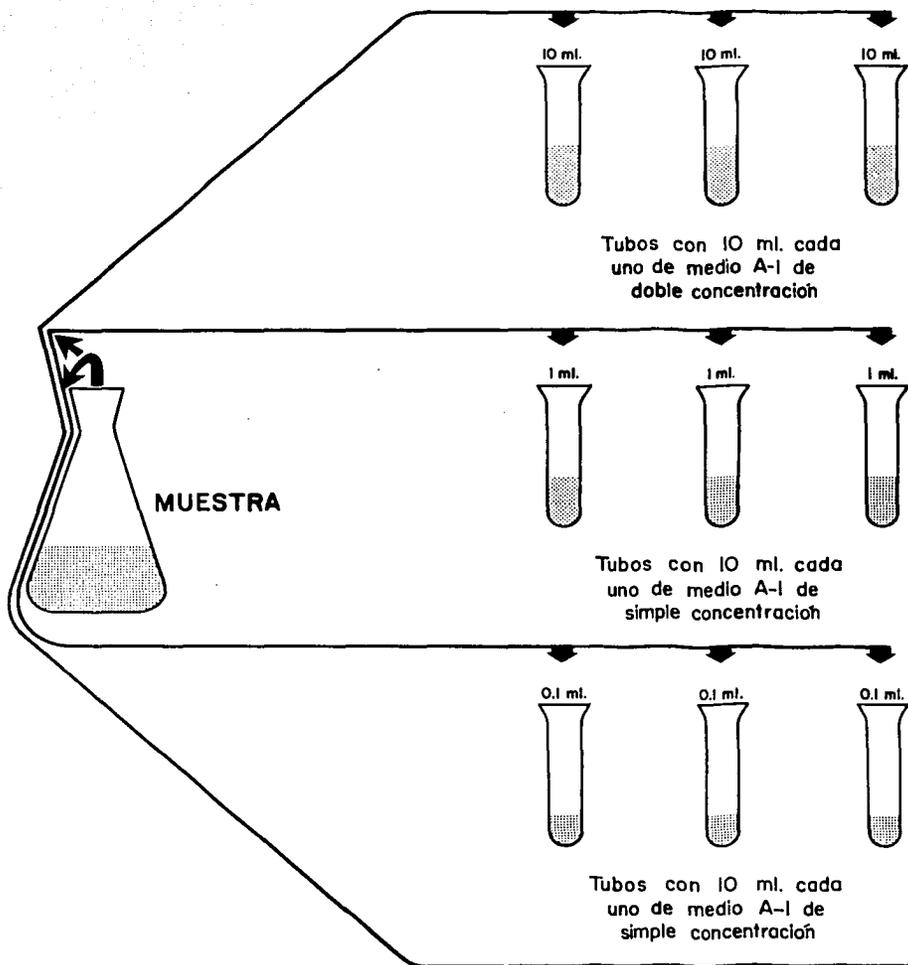
Fig.3



\* TSYB = Medio de soya tripticasa adicionado con extracto de levadura.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 4



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

Para evaluar el medio de recuperación para microorganismos dañados se llevó a cabo una prueba experimental que se describe en la sección IV inciso 2, y que compara resultados de " Número más Probable ", " A-1 " y siembra en RVBA, al utilizar el medio de recuperación y sin utilizarlo. Los resultados se muestran en las tablas 1, 2 y 3.

En la tabla 1 se puede apreciar la diferencia que existe en las cuentas de microorganismos *Escherichia coli* en agar bilis y rojo violeta, al utilizar el método de recuperación y sin utilizarlo. Asimismo nos señala que al utilizar el medio de recuperación pueden recuperarse un promedio de 7.45 % de los microorganismos *Escherichia coli* del total que se inoculó, mientras que sin utilizarlo sólo se recupera un promedio de 0.041 % de microorganismos *Escherichia coli* del total.

En la tabla 2 se observa nuevamente una diferencia clara, al comparar el método de " Número más Probable " cuando se utiliza el medio de recuperación y sin utilizarlo. Esta tabla también muestra el porcentaje de recuperación de microorganismos dañados al utilizar la técnica del " Número más Probable ", mientras que en la tabla 3 puede apreciarse que al utilizar la técnica de " A-1 ", no existe ninguna diferencia si se utiliza o no el medio de recuperación. Esto puede deberse a que la técnica " A-1 " incluye para microorganismos dañados, un período de recuperación de 3 horas, previo a la incubación a 44.5°C.

Cuenta de microorganismos *Escherichia coli* en agar bilis y rojo violeta (RVBA) con recuperación y sin recuperación

Inóculo (ml)	Cuenta en RVBA (col/ml)			% de recuperación		
	t = 0 *	t = 24°		A	B	C
		Con recuperación	Sin recuperación			
20	62,000	2,700	60	4.35	0.096	4.26
15	25,000	1,700	20	6.80	0.080	6.72
12	14,000	1,300	10	9.29	0.071	9.21
9	9,800	780	0	8.00	-	8.00
6	5,700	550	0	9.64	-	9.64
1	1.600	110	0	6.88	-	6.88

\* t = 0 Cuenta inicial de microorganismos después de la inoculación

° t = 24 Después de 24 horas de congelación a -15°C.

A Microorganismos recuperados en total

B Microorganismos que no sufrieron lesión por congelación

C Microorganismos recuperados que sufrieron lesión por congelación

$\bar{X}$  Media de la población

$$\bar{X}_A = 7.49 \%$$

$$\bar{X}_B = 0.041 \%$$

$$\bar{X}_C = 7.45 \%$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TABLA 2

Estimación del " Número más Probable " (NMP) con recuperación y sin recuperación

Inóculo (ml)	NMP (col/ml)		% de recuperación		
	Con recuperación	Sin recuperación	A	B	C
20	$\geq 2,400$	43	3.87	0.069	3.80
15	1,100	15	4.40	0.060	4.34
12	1,100	4	7.85	0.028	7.82
9	460	3	4.69	-	4.69
6	240	3	4.21	-	4.21
1	93	3	5.81	-	5.81

A = Microorganismos recuperados en total.

B = Microorganismos que no sufrieron lesión por congelación

C = Microorganismos recuperados que sufrieron lesión por congelación.

TABLA 3

Estimación del número más probable por el método A-1 con recuperación y sin recuperación

Inóculo (ml)	A-1 (col/ml)	
	Con recuperación	Sin recuperación
20	$\geq 24$	$\geq 24$
15	$\geq 24$	$\geq 24$
12	$\geq 24$	$\geq 24$
9	$\geq 24$	$\geq 24$
6	$\geq 24$	$\geq 24$
1	11	11

$\geq$  mayor o igual a

Cabe hacer notar que de acuerdo a la técnica de recuperación que se emplea, un elevado número de microorganismos muere al someterlos a congelación a una temperatura de  $-15^{\circ}\text{C}$ . Sin embargo, aunque el porcentaje de recuperación parece ser muy bajo, resulta significativo al encontrar productos alimenticios contaminados. Además, es importante mencionar que sin la recuperación, la cantidad de microorganismos que se detecta por las técnicas tradicionales es muy bajo en comparación con los microorganismos que realmente se encuentran presentes en las muestras y pueden significar un peligro potencial para el consumidor.

Los resultados que se obtienen para los microorganismos coliformes fecales en las paletas heladas de agua, por las técnicas de " Número más Probable " y " A-1 ", se observan en la tabla 4.

Para llevar a cabo la comparación de dichas técnicas, se realizó una evaluación estadística por medio de una prueba " t de student " para una curva de distribución de una sola cola (6,23). Se hizo una comparación apareada, ya que el objeto del análisis fue deducir si, sobre el promedio existe una diferencia entre los resultados, para lo cual se compara la diferencia de promedios entre pares, con la variabilidad entre las muestras.

Esta evaluación estadística se llevó a cabo únicamente para los sabores de fresa y piña, ya que como puede observarse en la tabla 4, en los sabores de limón y tamarindo no existió variabilidad entre las muestras. Esto puede explicarse, ya que en el caso del limón por existir una acidez tan alta (pH entre 1 y 3), los microorganismos coliformes

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TABLA 4

Cuenta de microorganismos coliformes fecales

	LIMON		FRESA		PIÑA		TAMARINDO	
	NMP	A-1	NMP	A-1	NMP	A-1	NMP	A-1
1	3	0.03	3	0.03	3	0.03	3	0.03
2	3	0.03	3	0.03	3	2.4	3	0.03
3	3	0.03	3	0.03	3	0.03	3	0.03
4	3	0.03	3	0.03	3	0.03	3	0.03
5	3	0.03	3	0.03	3	0.23	3	0.03
6	3	0.03	3	0.03	4	2.1	3	0.03
7	3	0.03	3	0.03	3	0.93	3	0.03
8	3	0.03	3	0.03	3	0.09	3	0.03
9	3	0.03	23	0.03	3	0.03	3	0.03
10	3	0.03	23	0.03	3	0.03	3	0.03
11	3	0.03	9	0.93	3	1.5	3	0.03
12	3	0.03	210	11	3	0.03	3	0.03
13	3	0.03	2400	24	15	4.6	3	0.03
14	3	0.03	3	0.03	4	4.6	3	0.03
15	3	0.03	3	0.03	3	2.4	3	0.03

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

	LIMON		FRESA		PIÑA		TAMARINDO	
	NMP	A-1	NMP	A-1	NMP	A-1	NMP	A-1
16	3	0.03	210	11	3	4.6	3	0.03
17	3	0.03	3	0.03	3	0.03	3	0.03
18	3	0.03	3	0.03	3	0.03	3	0.03
19	3	0.03	3	0.03	20	24	3	0.03
20	4	0.03	3	0.11	43	11	3	0.03
21	3	0.03	3	0.43	43	24	3	0.03
22	3	0.03	3	0.43	2400	24	75	24
23	3	0.03	3	0.09	4	0.93	3	0.03
24	3	0.03	3	0.03	1100	24	3	0.03
25	3	0.03	3	0.03	4	0.93	3	0.03
26	3	0.03	3	0.07	240	11	3	0.03
27	3	0.03	3	0.11	43	2.4	3	0.03
28	3	0.03	3	0.11	23	24	3	0.03
29	3	0.03	240	24	23	11	3	0.03
30	3	0.03	4	0.28	3	0.09	3	0.03

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

mes fecales no pueden desarrollarse y proliferar. Lo mismo sucede con el tamarindo (pH entre 2 y 3), en el cual además, se requiere que haya un proceso de cocción para poder utilizarse. Esto provoca que los microorganismos que pudieran existir en la fruta, mueran al momento de elevar la temperatura. Sin embargo, en el caso de la fresa y la piña, el pH varía entre 3 y 4, lo cual ofrece mejores condiciones para que los microorganismos coliformes fecales puedan desarrollarse.

Para realizar los cálculos de la comparación de las técnicas en dichas muestras se empleó la siguiente fórmula:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2 \sqrt{n}}{s_d}$$

donde:

t = t de student

$\bar{X}_1$  = Media de la población 1

$\bar{X}_2$  = Media de la población 2

n = Número de diferencias

$s_d$  = Desviación estándar de la diferencia entre muestras.

Los resultados que se obtienen para la " t de student " se muestran en la tabla 5.

TABLA 5

Prueba de " t de student " para la cuenta de microorganismos coliformes fecales

SABORES	(NMP-A-1)	$\chi^2$	*G.L.	°t
Fresa	3111.93	5772555.8	29	1.310
Piña	3832.96	6859023.3	29	1.493

\*G.L.= Grados de libertad.

°t = " t de student "

Como puede apreciarse en la tabla 6, que muestra los valores de significancia para la prueba " t de student " (8), se puede observar que de acuerdo a los resultados que se obtienen para los niveles de 1%, 2.5% y 5%, no existe diferencia significativa para el sabor de fresa, ni para el sabor de piña, entre los métodos microbiológicos utilizados, ya que los valores de 1.31 para fresa, y 1.49 para piña son menores que los que se muestran en la tabla. Sin embargo, puede apreciarse que a un nivel de 10% de significancia, sí existe una diferencia significativa entre ambos métodos.

TABLA 6

Valores de significancia para la prueba "t de student"

G.L.*	Nivel alfa de significancia para distribuciones de una cola			
	0.10	0.05	0.025	0.01
1	1.000	6.314	12.706	31.821
2	0.816	2.920	4.303	6.965
3	0.765	2.353	3.182	4.541
4	0.741	2.132	2.776	3.747
5	0.727	2.015	2.571	3.365
6	0.718	1.943	2.447	3.143
7	0.711	1.895	2.365	2.998
8	0.706	1.860	2.306	2.896
9	0.703	1.833	2.262	2.821
10	0.700	1.812	2.228	2.764
11	0.697	1.796	2.201	2.718
12	0.695	1.782	2.179	2.681
13	0.694	1.771	2.160	2.650
14	0.692	1.761	2.145	2.624
15	0.691	1.753	2.131	2.602
16	0.690	1.746	2.120	2.583
17	0.689	1.740	2.110	2.567
18	0.688	1.734	2.101	2.552
19	0.688	1.729	2.093	2.539
20	0.687	1.725	2.086	2.528
21	0.686	1.721	2.080	2.518
22	0.686	1.717	2.074	2.508
23	0.685	1.714	2.069	2.500
24	0.685	1.711	2.064	2.492
25	0.684	1.708	2.060	2.485
26	0.684	1.706	2.056	2.479
27	0.684	1.703	2.052	2.473
28	0.683	1.701	2.048	2.467
29	0.683	1.699	2.045	2.462
30	0.683	1.697	2.042	2.457

\* G.L. = Grados de libertad.

Esto nos muestra que al utilizar el medio de recuperación para la técnica del "Número más Probable", los valores para los microorganismos coliformes fecales resultan más elevados que por la técnica de "A-1". Esto se debe a que, al haber mayor contaminación, es necesario realizar más diluciones, lo que provoca que al leer los resultados en las tablas de "Número más Probable", se incrementen los resultados por cada dilución más que se realice. Cabe señalar nuevamente que al utilizar el medio de resucitación, pueden recuperarse mayor número de microorganismos coliformes fecales que se encuentran dañados por congelación.

Para conocer la calidad sanitaria de las paletas heladas de agua, se realizó por otro lado a cada muestra, una determinación de microorganismos mesofílicos aerobios, microorganismos coliformes totales y de unidades formadoras de hongos filamentosos. Es de importancia mencionar que las cuentas se realizaron en todos los casos después de haber sometido las muestras al medio de recuperación.

En la tabla 7 se muestra la cuenta de unidades formadoras de hongos filamentosos, mientras que en las tablas 8 y 9 se pueden apreciar las cuentas para los microorganismos mesofílicos aerobios y microorganismos coliformes totales, respectivamente.

Con el objeto de apreciar si existía alguna diferencia significativa en la contaminación de las muestras para cada uno de los sabores, se realizó para cada determinación, un análisis de varianza de dos vías al nivel del 1% de significancia (33). Los resultados pueden observarse en las tablas 10, 11 y 12.

TABLA 7

Cuenta de hongos filamentosos (col/ml)

Muestra	Limón	Fresa	Piña	Tamarindo
1	100	600	2,000	900
2	110	900	2,000	1,100
3	240	2,100	6,500	1,600
4	280	6,500	320,000	2,000
5	290	14,000	400,000	3,200
6	320	16,000	400,000	3,700
7	390	18,000	470,000	5,000
8	460	18,000	670,000	6,000
9	530	30,000	700,000	6,100
10	600	30,000	730,000	6,600
11	810	34,000	760,000	9,000
12	890	36,000	1,000,000	9,200
13	1,000	46,000	1,000,000	9,700
14	1,100	64,000	1,100,000	9,700
15	1,300	88,000	1,200,000	13,000
16	1,400	98,000	1,600,000	13,000
17	1,500	98,000	1,800,000	14,000
18	1,500	110,000	2,000,000	14,000
19	1,500	110,000	2,500,000	15,000
20	1,700	110,000	2,800,000	17,000
21	2,700	120,000	2,900,000	19,000
22	3,100	140,000	3,600,000	19,000
23	3,400	150,000	3,800,000	20,000
24	4,600	370,000	4,300,000	21,000
25	6,500	480,000	4,300,000	23,000
26	8,200	590,000	4,600,000	50,000
27	8,300	720,000	5,000,000	52,000
28	9,300	920,000	14,000,000	110,000
29	23,000	2,900,000	15,000,000	1,800,000
30	40,000	4,800,000	16,000,000	2,100,000

TABLA 8

Cuenta de mesofílicos aerobios (col/ml)

Muestra	Limón	Fresa	Piña	Tamarindo
1	60	200	12,000	240
2	70	300	80,000	380
3	90	2,900	100,000	1,000
4	90	3,000	120,000	3,400
5	100	4,100	190,000	4,500
6	130	8,000	200,000	6,500
7	130	8,500	210,000	11,000
8	180	11,000	250,000	13,000
9	200	20,000	330,000	16,000
10	250	20,000	360,000	33,000
11	250	21,000	390,000	39,000
12	280	30,000	440,000	40,000
13	470	30,000	800,000	41,000
14	520	30,000	990,000	44,000
15	750	30,000	1,200,000	50,000
16	1,100	35,000	1,300,000	50,000
17	1,200	46,000	1,600,000	57,000
18	1,200	64,000	1,600,000	61,000
19	1,600	76,000	2,000,000	65,000
20	1,700	96,000	2,700,000	66,000
21	2,000	110,000	2,800,000	66,000
22	2,500	120,000	3,000,000	72,000
23	3,000	130,000	3,200,000	84,000
24	3,200	130,000	3,800,000	140,000
25	3,400	140,000	4,000,000	200,000
26	4,200	170,000	4,000,000	250,000
27	6,300	410,000	4,300,000	260,000
28	8,000	440,000	7,000,000	280,000
29	12,000	570,000	7,800,000	460,000
30	20,000	1,600,000	15,000,000	500,000

TABLA 9

Cuenta de microorganismos coliformes totales (col/ml)

Muestra	Limón	Fresa	Piña	Tamarindo
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	120	0
4	0	260	600	0
5	0	300	1,600	0
6	0	1,000	1,800	0
7	0	1,700	2,800	0
8	0	2,800	2,900	0
9	0	2,800	2,900	0
10	0	4,200	3,700	0
11	0	5,600	4,800	0
12	0	7,000	6,800	0
13	0	7,600	12,000	0
14	0	8,500	16,000	0
15	0	9,700	39,000	0
16	0	14,000	40,000	0
17	0	14,000	48,000	0
18	0	19,000	49,000	0
19	0	19,000	84,000	0
20	0	24,000	110,000	0
21	0	28,000	160,000	0
22	0	36,000	230,000	0
23	0	43,000	430,000	0
24	0	46,000	450,000	0
25	0	52,000	500,000	0
26	0	66,000	780,000	0
27	0	120,000	1,000,000	0
28	0	130,000	1,000,000	0
29	20	170,000	2,700,000	0
30	910	300,000	3,400,000	670

En las tablas 10 y 11 se observa el análisis de varianza que se realizó para las unidades formadoras de hongos filamentosos y para microorganismos mesofílicos aerobios, respectivamente. En los dos casos se puede apreciar que existe una diferencia significativa entre los sabores al 1 % de significancia. La tabla 12, muestra el análisis de varianza para microorganismos coliformes totales. En este caso el análisis se realizó únicamente para los sabores de fresa y piña, ya que como puede observarse en la tabla 9, no hubo variación para los sabores de limón y tamarindo.

Posteriormente se utilizó como análisis complementario, la " Prueba de Tuckey " (33) para conocer en cual de los sabores existía una diferencia significativa. La "Prueba de Tuckey" arrojó resultados semejantes para las tres de terminaciones. En los tres casos se comprobó que el sabor de piña se encuentra significativamente con más contaminación que los otros tres sabores, tanto para microorganismos coliformes totales y mesofílicos aerobios como para las unidades formadoras de hongos filamentosos.

Estos resultados nos muestran claramente que la manipulación que se le da a la fruta en la elaboración de las paletas heladas de agua, en ningún caso es la adecuada ya que la piña tiene una cáscara demasiado gruesa, lo que descarta la posibilidad de que la contaminación se realizara durante la cosecha, (como podría ser el caso de la fresa), o la manipulación de transporte.

Cabe recordar que por el método de resucitación que se emplea, se recuperan un promedio de 7.45 % de microorganismos que se encuentran antes de someterlos a congelación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TABLA 10

Análisis de varianza para la cuenta de unidades formadoras de hongos filamentosos

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumatoria al cuadrado	Cuadrado significativo	Varianza
Sabores	3	$1.93 \times 10^{14}$	$6.45 \times 10^{13}$	16.19
Muestras	29	$2.28 \times 10^{14}$	$7.87 \times 10^{12}$	1.98
Error	87	$3.46 \times 10^{14}$	$3.98 \times 10^{12}$	-
Total	119	$7.68 \times 10^{14}$	-	-

Varianza de tablas (Ft) = 4.13

Varianza calculada (Fc) = 16.19

$F_c > F_t \therefore$  si hay diferencia significativa al 1 % de significancia

> = mayor que

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TABLA 11

Análisis de varianza para microorganismos mesofílicos aerobios

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumatoria al cuadrado	Cuadrado significativo	Varianza
Sabores	3	$1.14 \times 10^{14}$	$3.79 \times 10^{13}$	16.81
Muestras	29	$9.01 \times 10^{13}$	$3.11 \times 10^{12}$	1.38
Error	87	$1.96 \times 10^{14}$	$3.25 \times 10^{12}$	-
Total	119	$3.99 \times 10^{14}$	-	-

Varianza de tablas (Ft) = 4.13

Varianza calculada (Fc) = 16.81

$F_c > F_t$  ∴ si hay diferencia significativa al 1 % de significancia

> = mayor que

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TABLA 12

Análisis de varianza para microorganismos coliformes totales

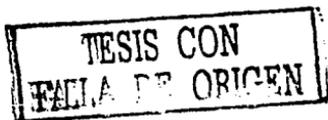
Puente de variación	Grados de libertad	Sumatoria al cuadrado	Cuadrado significativo	Varianza
Sabores	1	$1.65 \times 10^{12}$	$1.65 \times 10^{12}$	6.23
Muestras	29	$1.06 \times 10^{13}$	$3.64 \times 10^{11}$	1.37
Error	29	$7.67 \times 10^{12}$	$2.65 \times 10^{11}$	-
Total	59	$1.98 \times 10^{13}$	-	-

Varianza de tablas (Ft) = 2.60

Varianza calculada (Fc) = 6.23

Fc > Ft ∴ si hay diferencia significativa al 1 % de significancia

> = mayor que



Ahora bien, de acuerdo a los resultados que se obtienen y se muestran en las tablas 7, 8 y 9, puede observarse que el índice de contaminación es muy elevado, por lo que cabe suponer que si sólo se reporta el 7.45 % del total de microorganismos que contenían las paletas heladas antes de la congelación, las prácticas de elaboración de dichos productos alimenticios son extremadamente deficientes en cuanto a la sanidad que se emplea para su fabricación.

Para evaluar la calidad sanitaria de las paletas heladas de agua, se obtuvo la media de los resultados de las tablas 7, 8 y 9, y se comparó contra la norma propuesta en el Anteproyecto de Normas de la Dirección General de Alimentos, Bebidas y Medicamentos y la Dirección General de Laboratorios de Salud Pública. La norma microbiológica para paletas heladas de agua o nieves estipula lo siguiente:

Mesofílicos aerobios	máximo 1,000 col/ml
Organismos coliformes fecales	menos de 2.2 col/100ml

Las medias que se obtienen para las paletas heladas que se muestrearon y analizaron, pueden observarse en la tabla 13. De acuerdo a estos resultados puede notarse claramente que ninguno de ellos satisface la norma que se menciona anteriormente y que los resultados la exceden en demasía.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Media de las cuentas de microorganismos coliformes totales, coliformes fecales, mesofílicos aerobios y de hongos filamentosos.

Sabores	Hongos ( $\bar{X}$ ) (col/ml)	Coliformes totales ( $\bar{X}$ ) (col/ml)	Mesofílicos aerobios ( $\bar{X}$ ) (col/ml)	Coliformes fecales ( $\bar{X}$ ) (col/ml)	
				NMP	A-1
Limón	$4.18 \times 10^3$	31	$2.50 \times 10^3$	3	0.03
Fresa	$4.04 \times 10^5$	$3.77 \times 10^4$	$1.45 \times 10^5$	106.16	2.44
Piña	$3.09 \times 10^6$	$3.69 \times 10^5$	$2.33 \times 10^6$	133.18	6.03
Tamarindo	$1.49 \times 10^5$	$2.23 \times 10^1$	$9.71 \times 10^4$	3	0.03
$\bar{X}$	$9.14 \times 10^5$	$1.02 \times 10^5$	$6.43 \times 10^5$	61.49	2.13

TABLA 13

$\bar{X}$  = Media de la población.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

## V. CONCLUSIONES.

1.- El método de recuperación que se emplea en las paletas heladas, puede restaurar a los microorganismos dañados por la congelación que son incapaces de multiplicarse en medios selectivos.

2.- La cantidad de microorganismos que se detectan en las paletas heladas al utilizar el medio de recuperación, aumenta considerablemente en comparación con los microorganismos que se detectan al utilizar las técnicas tradicionales.

3.- El medio de recuperación ayuda apreciablemente a poner de manifiesto a los microorganismos dañados por la congelación, al utilizarlo antes de llevar a cabo la técnica de " Número más Probable ", para coliformes fecales en las paletas heladas.

4.- El método de " Número más Probable " resulta mejor que el método " A-1 " para coliformes fecales, al nivel del 10 % de significancia, cuando se utiliza el medio de recuperación en las paletas heladas.

5.- Las paletas heladas con una acidez elevada tienen menor carga microbiana total que las paletas heladas con una acidez menor.

6.- Las paletas heladas de pequeños establecimientos se encuentran con un elevado índice de contaminación micro-

biana.

7.- Las paletas heladas con sabor de piña se encuentran significativamente con mayor contaminación microbiana, que los otros tres sabores.

8.- Las prácticas de elaboración de estos productos son extremadamente deficientes en cuanto a la sanidad que se emplea para su fabricación.

9.- Las muestras que se analizaron, sobrepasan excesivamente los límites que establece el Anteproyecto de Normas de 1974 de la Dirección General de Alimentos, Bebidas y Medicamentos y la Dirección General de Laboratorios de Salud Pública.

10- Los análisis microbiológicos para productos congelados en medios selectivos, pueden no detectar a los microorganismos lesionados y afectar la evaluación de la calidad sanitaria de estos productos.

## VI. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- American Public Health Association. APHA. 1981. Standard methods for the examination of water and wastewater. 14a. Ed., Joint Editorial Board.: Washington, D.C.
- 2.- Andrews, W.H., Diggs, C.D. y Wilson, C.R. 1975. Evaluation of a medium for the rapid recovery of *Escherichia coli* from shellfish. Applied Microbiology. 29 (1): 130-131.
- 3.- Andrews, W.H. y Presnell, M.W. 1972. Rapid recovery of *Escherichia coli* from estuarine water. Applied Microbiology. 23 (3): 521-523.
- 4.- Andrews, W.H., Wilson, C.R., Poelma, P.L., Bullock, L.K. McClure, F.D. y 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.
- 5.- Bagley, S.T. y Seidler, R.J. 1977. Significance of fecal coliform positive *Klebsiella*. Applied and Environmental Microbiology. 23 (5): 1141-1148.
- 6.- Bauer, E.L. 1974. Manual de estadística para químicos. 1a. edición española, Editorial Alhambra, España.
- 7.- Biagi, F. 1982. Enfermedades parasitarias. 2a. Ed., La prensa médica mexicana: México, D.F. pp 64-70.

- 8.- Bruning, J.L. y Kintz, B.L. 1977. Computational handbook of statistics. 2a. Ed., Ed. Scott Foresman Co.
- 9.- Bissonette, G.K., Jezeski, J.J., McFeters, A. y Stuart, D.G. 1975. Influence on environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural waters. Applied Microbiology. 29 (2): 186-194.
- 10- Bordner, R.H. y Carroll, B.J. 1972. Proceedings: seminar on the significance of fecal coliforms in industrial wastes. Environmental Protection Agency: Denver, Colorado.
- 11- Brodsky, R.H. y Schiemann, D.A. 1975. Influence of coliform source on evaluation of membrane filters. Applied Microbiology. 30 (5): 727-730.
- 12- Brown, R.K., McMeekin, T.A. y Balis, C. 1977. Effect of some unicellular algae on *Escherichia coli* populations in sea water and oysters. Journal Applied Bacteriology. 43: 129-136.
- 13- Buttiax, R. 1959. The value of the association *Escherichia* group *A streptococci* in the diagnosis of contamination in foods. Journal Applied Bacteriology. 22 153-158.
- 14- Chordash, R.A. e Insalata, N.F. 1978. Incidence and pathological significance of *Escherichia coli* and other sanitary indicator organisms in food and water. Food Technology. 32 (7): 54-63.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- 15- Daguet, G.L. 1977. Técnicas en bacteriología I. 1a.Ed Editorial Jims: Barcelona, España. pp. 265-274.
- 16- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S. y Wood, W.B. 1980. Microbiology. 3a. Ed., Harper and Row publishers Inc.: Washington, D.C. pp. 647-659.
- 17- Dutka, B.J., Kuchman, S. y Kwan, K.K. 1979. Fecal coliform and *Escherichia coli* estimates, tip of the iceberg. Water, Air and Soil Pollution. 11: 349-362.
- 18- Edwards, J.L., Busta, F.F. y Speck, M.L. 1965. Heat injury of *Bacillus subtilis* spores at ultralight temperatures. Applied Microbiology. 13: 858-864.
- 19- Environmental Protection Agency. EPA. 1973. Water quality criteria: Washington, D.C.
- 20- Evans, T.M., Waarvick, C.E., Seidler, R.J. y LeChavallier, M.W. 1981. Failure of the most-probable-number technique to detect coliforms in drinking water and raw water supplies. Applied and Environmental Microbiology. 41 (1): 130-138.
- 21- Frazier, C.W. 1967. Food Microbiology. 2a. Ed. Mcgraw Hill.: Wisconsin, E.E.U.U. pp. 110-120.
- 22- Frobisher, M., Hinsdill, R., Crabtree, K. y Goodheart, C. 1974. Fundamentals of Microbiology. Editorial W.B. Saunders Co.: Filadelfia, Londres, Toronto.

TESIS CON  
FAMILIA DE ORIGEN

- 23- Gilbert, N. 1980. Estadística. Nueva editorial intera  
mericana. México, D.F.
- 24- Greenberg, R.A. y Silliker, J.H. 1961. Evidence of  
heat injury in *enterococci*. Journal Food Scientist.  
26: 622-625.
- 25- Geldrich, E.E., Nash, H.D., Reasoner, D.J. y Taylor, R.  
H. 1972. The necessity of controlling bacterial  
populations in potable waters: community water supply.  
Journal American Water Works Association. 64: 596-602.
- 26- Holden, W. 1970. Water treatment and examination. Edi-  
torial J & A Churchill: Londres.
- 27- Hunt, D.A., Lucas, J.P., McClure, F.D., Spinger, J. y  
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.
- 28- Hurst, A. 1977. Bacteria injury: a review. Canadian  
Journal of Microbiology. 23 (8): 936-944.
- 29- Hussong, D., Damaré, J.M., Weiner, R.M. y Colwell, R.  
R. 1981. Bacteria associated with false-positive  
most-probable-number coliform test results for shell-  
fish and estuaries. Applied and Environmental Micro-  
biology. 41 (1): 35-45.



- 30- Hutchinson, D., Weaver, R.H. y Scherago, M. 1943. The incidence and significance of microorganisms antagonistic to *Escherichia coli*. Journal Bacteriology. 54: 29.
- 31- Jacobs, S.E. y Harris, N.D. 1961. The effect of modification in the counting medium on the viability and growth of bacteria damaged by phenols. Journal Applied Bacteriology. 24: 172-181.
- 32- Klein, D.A. y Wu, S. 1974. Stress: a factor to be considered in heterotrophic microorganism enumeration from aquatic environments. Applied Microbiology. 27 (2): 429-431.
- 33- Larmond, E. 1977. Laboratory methods for sensory evaluation of food. Food Research Institute: Ottawa, Ontario.
- 34- Leal H. Ma. del Pilar, 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.
- 35- Longreé, K. 1980. Quantity Food Sanitation. 3a. Ed., John Wiley and Sons Inc.: Nueva York, E.U.A. pp. x y ss.
- 36- Lupo, L., Strickland, D., Dufor, A. y Cabelli, V. 1977. The effect of oxidase positive bacteria on total coliform density estimates. Health Laboratory Scientists, 14: 117-121.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- 37- Martin, R.S., Gates, W.H., Tobin, R.S., Grantham, D., Sumarah, R., Wolfe, R. y Forestall, P. 1982. Factors affecting coliform bacteria growth in distribution systems. Journal American Water Works Association. 74 (1): 34-37.
- 38- McFeters, G.A., Cameron, S.C. y LeChevallier, M.W. 1982. Influence of diluents, media and membrane filters on detection of injured waterborne coliform bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 43 (1): 97-103.
- 39- Mertz, J.J., Scharer, L. y McClemente, J.H. 1967. A hospital outbreak of *Klebsiella pneumonia* from inhalation therapy with contaminated aerosol solutions. American Rev. Resp. Dis. 95: 454-460.
- 40- Metcalf, T. 1978. Indications for viruses in natural waters. Water Pollution Microbiology. Ed. John Wiley and Sons. Nueva York. 2: 301-324.
- 41- Miskimin, D.K., Berkowitz, K.A., Solberg, M. Riha Jr., W.E. Franke, W.C., Buchanan, R.L. y Leary, V.C. 1976. Relationships between indicator organism and specific pathogens in potentially hazardous food. Journal Food Scientists. 41: 1001-1006.
- 42- Moniz, A.L. 1977. 77<sup>th</sup> Annual meeting of the American Society of microbiology, Abstract No. P. 39, 261.
- 43- Moss, C.W. y Speck, M.L. 1963. Injury and death of *Streptococcus lactis* due to freezing and frozen storage. Applied Microbiology. 11: 326-329.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- 44- Pelczar, M.J. y Reid, R.D. 1979. Microbiología. 1a. Ed. McGraw Hill.: México, D.F.
- 45- Postgate, J.R. y Hunter, J.R. 1963. Metabolic injury in frozen bacteria. Journal Applied Bacteriology. 26: 405-414.
- 46- Powell, J.C., Moore, A.R. y Grow, J.A. 1979. Comparison of EC Broth and medium A-1 for the recovery of *Escherichia coli* from frozen shucked snow crab. Applied and Environmental Microbiology. 37 (4): 836-840.
- 47- Price, D.J. y Sleight, J.D. 1970. Control of infection due to *Klebsiella aerogenes* in a neurosurgical unit by withdrawal of all antibiotics. Lancet. 2: 1213-1215.
- 48- Przybylski, K.S. y Witter, L.D. 1979. Injury and recovery of *Escherichia coli* after sublethal acidification. Applied and Environmental Microbiology. 37 (2) 261-265.
- 49- Ray, B. y Speck, M.L. 1973. Discrepancies in the enumeration of *Escherichia coli*. Applied Microbiology. 25 (4):494-498.
- 50- Ray, B. y Speck, M.L. 1973. Enumeration of *Escherichia coli* in frozen samples after recovery from injury. Applied Microbiology 25 (4):499-503.
- 51- Ray, B. y Speck, M.L. 1972 Metabolic process during the repair of freeze-injury in *Escherichia coli*. Applied Microbiology. 24 (4): 585-590.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- 52- Ray, B. y Speck, M.L. 1972. Repair of injury induced by freezing *Escherichia coli* as influenced by the recovery medium. Applied Microbiology. 24 (2): 258-263.
- 53- Rennie, R.P. y Duncan, I.B. 1974. Combined biochemical and serological typing of clinical isolates of *Klebsiella*. Applied Microbiology. 28 (4): 534-539.
- 54- Roepke, R.R. y Mercer, F.E. 1947. Lethal and sublethal effects of X rays on *Escherichia coli* as related to the yield of biochemical mutants. Journal Bacteriology, 54: 731-743.
- 55- Scheusner, D.L., Busta, F.F. y Speck, M.L. 1971. Inhibition of injured *Escherichia coli* by several selective agents. Applied Microbiology. 21 (1): 46-49.
- 56- Scheusner, D.L., Busta, F.F. y Speck, M.L. 1971. Injury of bacteria by sanitizers. Applied Microbiology. 21 (1) : 41-45.
- 57- Shuval, H.I. 1977. Water renovation and reuse. 1a.Ed. Academic Press Inc.: Nueva York, pp. 3-427.
- 58- Thatcher, F.S. y Clark, D.S. 1968. Microorganisms in Foods. University of Toronto Press: Toronto, Canada. pp. x y ss.
- 59- Warseck, M., Ray, B. y Speck, M.L. 1973. Repair and enumeration of injured coliforms in frozen foods. Applied Microbiology. 26 (6): 919-924.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- 60- Yela, A.I. 1981. Estudio bacteriológico del ostión *Crossostrea virginica*. Centro de distribución de productos pesqueros del D.F. Tesis (Licenciatura) Facultad de Ciencias, U.N.A.M.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VII. ANEXOS.

### a) Agar extracto glucosa y tripticaseina

Peptona de caseina	5.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

pH final  $7 \pm 0.2$

Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 min, a 15 lb. de presión.

### b) Agar de bilis y rojo violeta.

Lactosa	10.0 g
Peptona de gelatina	7.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Sales biliares	1.5 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.002 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

pH final  $7.4 \pm 0.2$

Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 min, a 15 lb. de presión.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

c) Agar nutritivo

Triptona	5.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Glucosa	1.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

pH final  $6.8 \pm 0.2$

Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 min, a 15 lb. de presión.

d) Agar de papa y dextrosa

Infusión de papa blanca	200.0 g
Dextrosa	20.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

pH  $5.6 \pm 0.2$

Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 min, a 15 lb. de presión.

e) Medio A-1

Triptona	20.0 g
Lactosa	2.5 g
Cloruro de sodio	1.0 g
Triton X-100	1.0 ml
Agua destilada	1000.0 ml

pH final  $7 \pm 0.2$

Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 min, a 15 lb. de presión.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

f) Medio de soya tripticasa adicionado con extracto de levadura (medio de recuperación)

Triptosa	10.4 g
Tripticasa o triptona	8.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Dextrosa	1.8 g
Phytone o soytone	1.5 g
Fosfato dipotásico	1.25g
Extracto de levadura	3.0 g
Agua destilada	1000.0 ml
pH final	7.1 a 7.3

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min, a 15 lb. de presión.

g) Medio lauril sulfato

Triptosa o tripticasa	20.0 g
Lactosa	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato monopotásico	2.75g
Lauril sulfato de sodio	0.1 g
Agua destilada	1000.0 ml
pH final	6.8 $\pm$ 0.2

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min, a 15 lb. de presión.

h) Medio de verde brillante al 2 %

Oxgall	20.0 g
Peptona	10.0 g

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Lactosa		10.0 g
Verde brillante		0.0133 g
Agua destilada		1000.0 ml
pH final	7.1 a 7.4	

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min, a 15 lb. de presión.

### 3.- Soluciones.

#### a) Solución estéril de ácido tartárico al 10 %

Acido tartárico	10.0 g
Agua destilada	100.0 ml

#### b) Solución buffer diluyente de fosfatos

Solución stock:

Fosfato monopotásico	34.0 g
Agua destilada	500.0 ml

Disolver el fosfato en agua destilada y ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1 N. Llevar a un litro con agua destilada. Esterilizar durante 20 min. a 121°C. Conservar en refrigeración. Tomar 1.25 ml de la solución stock y llevar a un litro de agua destilada. Esta es la solución de trabajo.

Esterilizar a 121°C, durante 20 min.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**