

DCNE
\$8,000=
D DCNE

V. B.
Maria Orestes Balido S.

DONATIVO DE

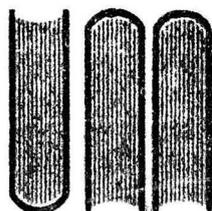
DCNE

Fecha:

11 JUL. 1988

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

DIVISION DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS



UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

Clasific
040.664
V473a
1988
C.1

Título

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Shigella* sp.
EN FRESAS Y EVALUACION DE CUATRO
DESINFECTANTES DE USO DOMESTICO

REPORTE DEL PROGRAMA DE EVALUACION FINAL

QUE EN OPCION AL TITULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS

autor PRESENTA
MARIA ISABEL VERA CANTISANI

folio
901007

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1988

BIBLIOTECA UNIVERSIDAD DE MONTERREY

A Dios Nuestro Señor

Por darme la vida y
permitirme llegar hasta
este momento llena de
bendiciones.

” En verdad el Todopoderoso
hizo grandes cosas por mí
reconozcan que Santo es su nombre,
que sus favores alcanzan
a todos los que le temen
y prosiguen en sus hijos ”

Con todo mi amor, agradecimiento y admiración

A mis padres

Ing. Alfonso Vera Canales

Sra. María Isabel Cantisani de Vera

que con su cariño, ejemplo y apoyo incondicional me
alentaron hasta llegar al término de mis estudios
profesionales.

A mis hermanos

Alfonso,

Laura y

Alberto.

A quienes quiero mucho.

A mis abuelitas

Sra. Encarnación Canales Uda. de Vera

Sra. María Teresa Vallone Uda. de Cantisani

que me han brindado siempre su cariño.

A mi buena amiga y compañera
Betty Garibay por su apoyo y
consejos durante toda la carrera.

A mis compañeras y amigas con
quienes compartí cuatro años
llenos de experiencias.

Agradezco muy especialmente a mi asesora
L.Q.A.C. María Oralia Bolado de De la Fuente
por la gran ayuda y consejos que me
brindó para el buen desarrollo de esta
investigación.

A la Q.F.B. Ma. de Lourdes Martínez Macouzet, a la
Q.F.B. Laura García Tovar y al Lic. Roberto Hernández
Ramírez por su cooperación durante la realización de
este estudio.

A la Ing. Deyanira Trujillo Creado por sus
atinadas sugerencias y ayuda brindada durante
la carrera.

Con todo mi amor

A tí, GERARDO, por estar siempre
conmigo brindándome tu ayuda y apoyo,
por tu paciencia y dedicación, por
darme continuamente ánimo para seguir
adelante y sobre todo, por tu amor.

INDICE

	PAGINA
INTRODUCCION.....	1
MATERIALES Y METODOS.....	12
RESULTADOS.....	30
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	35
RESUMEN.....	41
BIBLIOGRAFIA.....	43

INTRODUCCION

Las frutas constituyen una parte importante y deliciosa de la alimentación diaria del hombre. Es recomendable ingerir fruta fresca y madura todos los días para mantener el buen funcionamiento del aparato digestivo y conservar la piel y la dentadura en buen estado (20).

La composición de las frutas no sólo varía de acuerdo a las variedades botánicas existentes, a las prácticas de cultivo y a las condiciones atmosféricas, sino que cambia con el grado de madurez antes y después

de la cosecha, el cual es influenciado por las condiciones de almacenamiento. No obstante, se pueden hacer algunas generalizaciones: las frutas contienen un promedio de 85% de agua, 3.5% de proteínas y 0.5% de grasas; son fuente importante de carbohidratos digeribles y no digeribles; los primeros están presentes bajo la forma de azúcares y féculas, en tanto que las sustancias no digeribles se encuentran en forma celulósica necesaria para una digestión normal. Las frutas también poseen minerales y vitaminas, especialmente A y C (16).

Actualmente una de las frutas cuyo consumo se ha incrementado, tanto en su forma natural como procesada, es la fresa. Debe tenerse un gran cuidado en el cultivo, la recolección, la transportación y el procesamiento, para que este producto llegue al consumidor en las mejores condiciones.

Fresa es el nombre trivial del género Fragaria, es la baya que más se cultiva en el mundo; sin embargo, no es una verdadera baya, ya que las semillas crecen en el exterior del receptáculo de la flor. Es ampliamente utilizada como fruta fresca así como procesada, ya sea congelada, en conserva, en helados y en productos horneados. Se considera como una de las frutas más atractivas y aromáticas, a estas características se unen virtudes higiénicas y hasta medicinales, son

alcalinizantes y por su riqueza en calcio y potasio facilitan la excreción del ácido úrico. También contienen yodo y una discreta cantidad de azúcar; son ricas en sales minerales y vitaminas, especialmente en vitamina C. Contienen 8.3% de carbohidratos, 0.8% de proteínas, 0.5% de grasa, 0.5% de cenizas y 89.9% de agua (1, 4, 16).

Es una fruta que se introdujo en América del Norte a principios del siglo XVII, probablemente por los colonizadores anglosajones que llegaron a los Estados Unidos. La mayoría de las variedades cultivadas, proceden de dos especies silvestres que se cruzaron dando como resultado dos híbridos de los que se derivan todas las variedades conocidas. (19, 20).

Las variedades cambian lenta pero constantemente. Entre 1900 y 1950 había nueve variedades de fresa que se cultivaban en Estados Unidos, estas correspondían a Marshall, Klondike, Missionary, Dunlap, Premier, Aberdeen, Blackmore, Fairfax y Aroma. En 1966, la Blackmore era la única que se cultivaba en más del 3% de la superficie aprovechable en ese país (4).

Hasta hace poco tiempo los agricultores mexicanos seleccionaban las variedades que se ajustaban mejor a las condiciones ecológicas de la zona y que, por las

características físicas de la fruta, tenían mayor aceptación para fines de procesamiento. En México, las principales áreas productoras de fresa se localizan en los Estados de Guanajuato (Irapuato) y de Michoacán (Zamora). Tanto en Irapuato como en Zamora se explotaban preferentemente las variedades Florida 90 y Klondike, que han sido sustituidas casi totalmente por otras variedades de mayores rendimientos, como son la Fresno, Solana y Tioga que, además, producen un alto porcentaje de fruta para ser vendida en estado fresco. Es importante mencionar que México ocupa el tercer lugar en el mundo, después de los Estados Unidos de Norteamérica y Japón, como productor de fresa, consumiéndose nacionalmente solo el 12 % y exportándose el resto (11, 19).

Para que al agricultor le resulte productivo el procesamiento de alguna variedad de fresa, debe de considerar ciertos factores como por ejemplo: productividad, el color rojo brillante, el equilibrio de dulzura-acidez, el carácter aromático de su sabor y conservar la textura que proporcione una sensación placentera en la boca cuando se deguste (4).

Las fresas sufren alteraciones principalmente por hongos; entre los microorganismos causantes de éstas tenemos a las especies del género Botrytis que originan la podredumbre gris; a Phytophthora cactorum, a las

especies de Rhizoctonia y Rhizopus, que también causan podredumbre (7).

La fresa, por sus características particulares, puede contaminarse fácilmente por una gran cantidad de microorganismos provenientes del suelo, del agua, de los implementos y equipos de cultivo y por la manipulación de la fruta durante su recolección, transportación y procesamiento.

Se contamina fundamentalmente a partir de los microorganismos del suelo, los cuales se acumulan en las pequeñas cavidades de la fresa. El suelo arable superficial constituye el mayor depósito microbiano; un gramo contiene hasta cinco mil millones de organismos y son muy pocas las especies que no pueden encontrarse en el suelo; además de las formas vegetativas bacterianas se han encontrado micelios y esporas. La mayoría de la población microbiana es saprófita y los patógenos para el hombre son escasos (13).

Una de las fuentes más importantes de microorganismos es el agua que se utiliza en grandes cantidades para regar, lavar, refrescar o transportar el fruto en alguna operación determinada del proceso. Esa agua es frecuentemente reciclada por lo que puede ocurrir un gran desarrollo de microorganismos, a menos que se

utilice un tratamiento biocida. Esta puede no sólo contaminar la superficie de los frutos, sino también llevar los microorganismos al interior, donde pueden permanecer protegidos de tratamientos ulteriores. Por otro lado, en muchas ocasiones se utilizan aguas negras para el riego, éstas no sólo contienen la flora bacteriana propia, sino también microorganismos del suelo y de la flora intestinal humana. Esta última contribuye con grandes cantidades de bacilos coliformes, de Clostridium perfringens, de estreptococos fecales alfa-hemolíticos, de enterococos (Enterococcus faecalis), de patógenos que pueden estar presentes, tales como Salmonella, Shigella, Vibrio cholerae, algunos parásitos como Entamoeba histolytica y Ascaris lumbricoides, y los virus intestinales como el de la poliomielitis, Coxsackie y los del grupo ECHO (3, 8, 12).

La contaminación a partir de material y equipo puede eliminarse con una limpieza y desinfección adecuada.

Dentro de las infecciones gastrointestinales, tiene gran importancia la causada por la ingestión de alimentos contaminados por Shigella. Los alimentos preparados con alto contenido de humedad, la leche y los productos lácteos, los vegetales como la lechuga y las fresas, están implicados en su transmisión debido a que

se ha constatado que se pueden contaminar con excretas humanas (14).

El género Shigella pertenece a la familia Enterobacteriaceae y comprende cuatro especies conocidas como bacilos disentéricos, que son: Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella boydii y Shigella sonnei. Las shigelas son bacterias bacilares, gram negativas, no esporuladas, inmóviles, miden de 2-3 x 0.5-0.7 micrómetros. Estos microorganismos son anaerobios facultativos y su temperatura óptima de desarrollo es de 37°C. Sus requerimientos nutricionales no son muy complejos ya que crecen bien en la mayoría de los medios de laboratorio. No producen la descarboxilasa de la lisina ni hidrolizan la urea, solo un serotipo, Shigella flexneri 6, produce gas de la glucosa; no producen ácido sulfhídrico a partir de proteínas ni utilizan al citrato como fuente de carbono; el resultado de la prueba de Voges-Proskauer es negativo, reducen los nitritos y nitratos a amoníaco. La lactosa no es fermentada, excepto por Shigella sonnei, sin embargo la fermentación es lenta y puede retrasarse de una semana a diez días. El hábitat natural de las shigelas está limitado al intestino del hombre y de otros primates (3, 5, 9, 12, 14).

Las shigelas se encuentran entre las bacterias

entéricas patógenas más difíciles de aislar, ya que únicamente pueden sobrevivir pocas horas una vez que son excretadas, por lo que no puede pasar mucho tiempo desde la recolección hasta el análisis de las muestras. Son aún más difíciles de aislar a partir de alimentos que de muestras clínicas ya que su supervivencia se ve influenciada por la temperatura, el pH y el tipo de alimento, siendo mayor cuando la temperatura de mantenimiento es de 25°C. Con respecto a la resistencia frente al calor, comienzan a morir lentamente a temperaturas próximas a 46.6°C (116°F). Son destruidas por el calor a 55°C durante una hora y por el fenol al 1% en 30 minutos (5, 9).

Las shigelas son invasoras y penetran la mucosa intestinal, algunas cepas producen toxinas poderosas. El número de bacterias preciso para iniciar la disentería puede ser muy pequeño, de 10 solamente. Los síntomas característicos de la enfermedad son: dolor abdominal, tenesmo, fiebre y postración; las heces diarreicas están constituídas, muy poco después de iniciado el proceso, principalmente por sangre y moco (9, 15, 17).

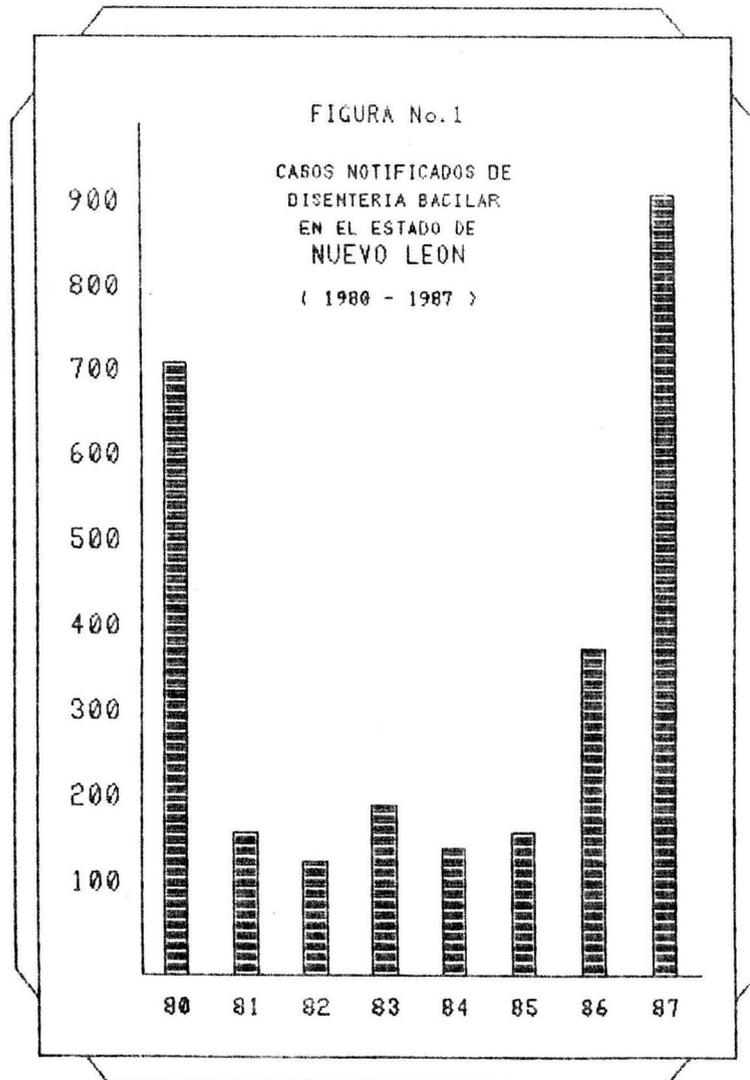
El contagio se produce generalmente por la vía fecal-oral, de persona a persona por las manos o los objetos contaminados. A veces, el vehículo de difusión de la enfermedad son los alimentos y el agua. Los brotes

que siguen son en estos casos de naturaleza explosiva y afectan a un gran número de personas, de modo semejante a la salmonelosis. En general, la enfermedad es común y ocurre en individuos de todas las edades, siendo más frecuente en niños menores de dos años y en personas con una nutrición deficiente. En casos raros, los pacientes que han sufrido una infección de esta clase terminan siendo portadores permanentes (9, 14, 21).

En algunas partes del mundo, juega un papel importante en la prevalencia de la shigelosis la contaminación de los alimentos por las moscas, las cuales pueden actuar como distribuidoras del microorganismo y otros agentes patógenos entéricos; en las regiones donde no se cuenta con sistemas de alcantarillado, las moscas se contaminan a partir de las heces infectadas en letrinas descubiertas u otros sitios similares a los que tienen acceso, luego se posan y depositan el bacilo en los alimentos, donde puede proliferar con facilidad sin alterar su aspecto ni su sabor, por lo que los alimentos, pueden ser el origen de casos aislados y en ocasiones de epidemias (9).

En la Figura No. 1 se presentan los casos notificados de disentería bacilar en el estado de Nuevo León durante el período comprendido de 1980 a 1987. Como se puede observar, en 1987 se presentó un considerable

incremento en el número de casos, en comparación con los seis años anteriores.



El lavado de la fruta puede eliminar parte de la contaminación de la superficie; a veces es necesario, además del lavado, añadir un desinfectante para facilitar la eliminación de los microorganismos y de esta manera reducir el contenido bacteriano.

Las frutas adquiridas en el mercado y que se consumen crudas contienen un número muy elevado de microorganismos. Tomando en cuenta que la ingestión de frutas contaminadas con patógenos que pueden producir enfermedades representa un grave riesgo para la salud pública en México, y que esta situación se ve favorecida por la falta de educación e higiene de la población en general, hemos querido enfocar el presente estudio hacia el aislamiento e identificación de Shigella en la fresa, ya que es una fruta de gran consumo en el país, con una calidad de cultivo que permite su exportación y que puede contaminarse fácilmente. Además, se determinará el grado de contaminación bacteriana de dichas frutas y se probará el efecto de cuatro desinfectantes que se pueden adquirir con facilidad en el mercado.

MATERIALES Y METODOS

Para la realización de esta investigación se seleccionaron al azar un total de 330 muestras de fresas, en el período comprendido entre los meses de Febrero y Abril de 1988; las muestras se obtuvieron tanto de puestos ambulantes como de supermercados localizados en la ciudad de Monterrey y en el municipio de Garza García, en el estado de Nuevo León.

Las muestras fueron recolectadas en su empaque original y transportadas al laboratorio de Microbiología de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la

Universidad de Monterrey, donde fueron analizadas.

De las 330 muestras seleccionadas, 220 se utilizaron para probar el efecto de los desinfectantes y 110 para el aislamiento de Shigella.

Los tratamientos desinfectantes a probar fueron los siguientes:

- T₀ = Testigo (solo enjuagar).
- T₁ = Desinfectante 1*, 5 gotas por 3 minutos (sin enjuagar).
- T₂ = Desinfectante 1, 5 gotas por 30 minutos (sin enjuagar).
- T₃ = Desinfectante 2*, 10 gotas por 15 minutos (sin enjuagar).
- T₄ = Desinfectante 2, 10 gotas por 15 minutos (enjuagando).
- T₅ = Desinfectante 1, 10 gotas por 15 minutos (enjuagando).
- T₆ = Desinfectante 2, 20 gotas por 20 minutos (enjuagando).
- T₇ = Desinfectante 1, 20 gotas por 20 minutos (enjuagando).
- T₈ = Desinfectante 3**, 20 gotas por 20 minutos (enjuagando).
- T₉ = Desinfectante 3, 30 gotas por 20 minutos (enjuagando).

- T₁₀ = Desinfectante 3, 30 gotas por 30 minutos
(enjuagando).
- T₁₁ = Desinfectante 3, 30 gotas por 40 minutos
(enjuagando).
- T₁₂ = Desinfectante 2, 20 gotas por 20 minutos
(solución nueva) (enjuagando).
- T₁₃ = Desinfectante 4***, por 30 minutos
(enjuagando y agitando).
- T₁₄ = Desinfectante 4, por 40 minutos
(enjuagando y agitando).
- T₁₅ = Desinfectante 4, por 50 minutos
(enjuagando y agitando).
- T₁₆ = Desinfectante 2, 60 gotas por 60 minutos
(enjuagando).
- T₁₇ = Desinfectante 1, 60 gotas por 60 minutos
(enjuagando).

* Desinfectante comercial

** Yodo

*** Detergente

El experimento se diseñó de la siguiente manera:

El análisis general constó de 17 experimentos específicos, realizándose en cada uno de ellos la cuenta total de bacterias y la cuenta de coliformes. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el diseño de muestras independientes, es decir, se determinó si había diferencia significativa entre cada uno de los 17 tratamientos diferentes al testigo y éste, mediante la prueba de t-Student a un nivel de significancia de 0.05%.

En seguida se detalla la secuencia, los tratamientos y las repeticiones de los experimentos específicos que están comprendidos dentro del experimento general:

Experimento específico 1:

T_0 vs. T_1 10 repeticiones

Experimento específico 2:

T_0 vs. T_2 10 repeticiones

Experimento específico 3:

T_0 vs. T_3 10 repeticiones

Experimento específico 4:
 T_0 vs. T_4 5 repeticiones

Experimento específico 5:
 T_0 vs. T_5 5 repeticiones

Experimento específico 6:
 T_0 vs. T_6 5 repeticiones

Experimento específico 7:
 T_0 vs. T_7 5 repeticiones

Experimento específico 8:
 T_0 vs. T_8 5 repeticiones

Experimento específico 9:
 T_0 vs. T_9 5 repeticiones

Experimento específico 10:
 T_0 vs. T_{10} 5 repeticiones

Experimento específico 11:
 T_0 vs. T_{11} 5 repeticiones

Experimento específico 12:
 T_0 vs. T_{12} 15 repeticiones

Experimento específico 13:

T_0 vs. T_{13} 5 repeticiones

Experimento específico 14:

T_0 vs. T_{14} 5 repeticiones

Experimento específico 15:

T_0 vs. T_{15} 5 repeticiones

Experimento específico 16:

T_0 vs. T_{16} 5 repeticiones

Experimento específico 17:

T_0 vs. T_{17} 5 repeticiones

T E C N I C A

I) CUENTA TOTAL DE BACTERIAS

Se pesan asépticamente 10 g de la muestra. Se introduce en un matraz conteniendo 90 ml de solución Ringer (R-1); se agita el matraz y se deja reposar media hora. Esta suspensión representa una dilución 1:10.

De la dilución 1:10 se toma 1 ml con pipeta estéril y se transfiere a un tubo conteniendo 9 ml de solución Ringer y se agita, se toma 1 ml de éste pasándolo a otro tubo conteniendo 9 ml de solución Ringer, completando así las tres diluciones: 1:10, 1:100 y 1:1000. Se toma 1 ml de cada una de las diluciones y se transfiere a cajas Petri, agregando agar para métodos estándares (AME) a 45°C y se mezcla por rotación; se deja solidificar y se incuba a 37°C por 24 horas. Para la obtención de los resultados, se seleccionan las placas que contengan entre 30 y 300 colonias y se multiplica por el inverso de la dilución para obtener el número de bacterias mesófilas aerobias por gramo de muestra. (Fig.2)

II) CUENTA DE COLIFORMES

Se toma 1 ml de cada una de las diluciones utilizadas para la cuenta total de bacterias y se transfiere a cajas Petri, agregando agar bilis rojo violeta a 45°C, se mezcla por rotación y se deja solidificar. Se incuba a 37°C por 24 horas. Para la obtención de los resultados, se cuentan las colonias fermentadoras de lactosa, las cuales son de color rosa a rojo, en aquellas placas en que hayan crecido entre 30 y 300 colonias y se multiplica por el inverso de la dilución, para obtener el número de bacterias coliformes por gramo de muestra. (Fig. 3)

III) AISLAMIENTO DE SHIGELLA

a) ENRIQUECIMIENTO:

Se pesan asépticamente 10 g de la muestra. Se cortan con un bisturí y se introducen en un matraz conteniendo 90 ml de caldo para Gram negativos; se agita por rotación y se incuba a 37°C por 24 horas.

b) AISLAMIENTO PRIMARIO

Del caldo para Gram-negativos se siembra por estrías en placas de agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) y de agar MacConkey. Se incuban las placas en posición invertida a 37°C durante 24 horas.

c) SELECCION DE COLONIAS SOSPECHOSAS

Del agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) se seleccionan las colonias de color rojo a rosa, generalmente de 1 mm de diámetro.

Del agar MacConkey se escogen las colonias lactosa negativas, que aparecen transparentes, incoloras o ambarinas.

d) IDENTIFICACION PRESUNTIVA

Se toman con asa bacteriológica las colonias sospechosas, picando el centro de las mismas y se subcultivan en tubos de agar triple azúcar hierro (TSI), se incuba a 37°C durante 24 horas. (Fig. 4)

Después de la incubación se descartan los cultivos

que no dan reacciones típicas del género Shigella en el agar triple azúcar hierro (TSI). Son reacciones típicas el color rojo (reacción alcalina) de la superficie y el fondo de color amarillo (reacción ácida por fermentación de la glucosa), sin presencia de ácido sulfhídrico ni producción de gas.

De los cultivos seleccionados del agar triple azúcar hierro (TSI), se procede a inocular los siguientes medios: SIM (agar azufre indol motilidad), MIO (agar motilidad indol ornitina), agar Simmons Citrato, LIA (agar de hierro y lisina), MR (Rojo de Metilo), UP (Voges-Proskauer) y agar urea de Christensen. Se incuban a 37°C por 24 horas.

e) INTERPRETACION

Se observan los cambios ocurridos en los medios y se procede a realizar las siguientes pruebas:

Prueba del indol: Se agregan 4 gotas del reactivo de Kovacs (R-2) a los medios SIM y MIO.

Rojo de Metilo: Se agregan 4 gotas del reactivo rojo de metilo (R-3) al caldo MR-UP.

Voges-Proskauer: Se agregan 0.6 ml de alfa-

naftol (R-4) y 0.2 ml de KOH-Creatina (R-5), a 2.5 ml de caldo MR-VP, se agita y se deja reposar por 20 minutos.

Se interpretan los resultados y se comparan con la tabla descrita por Bailey y Scott para la diferenciación de Enterobacterias por pruebas bioquímicas. (Tablas No. 1 y 2)

R E A C T I V O S

(R-1) Solución Ringer:

NaCl.....	8.5 g
KCl.....	0.2 g
CaCl ₂ 2H ₂ O.....	2.2 g
Na ₂ CO ₃	0.01 g
Agua destilada.....	1000 ml

Se disuelven las sales en el agua y se esteriliza a 121°C por 15 minutos.

(R-2) Reactivo de Kovacs:

Alcohol Amílico.....	150 ml
p-dimetilaminobenzaldehído.....	10 g
Acido clorhídrico conc.	50 ml

Se disuelve el aldehído en el alcohol y se agrega lentamente el ácido. Se almacena en un frasco ámbar en

el refrigerador.

(R-3) Solución de Rojo de Metilo:

Rojo de Metilo.....	0.1 g
Alcohol abs. al 95%.....	300 ml
Agua destilada.....	200 ml

Se disuelve el rojo de metilo en el alcohol y se afora a 200 ml con el agua destilada. Se almacena en un frasco ámbar en el refrigerador.

(R-4) Solución de alfa-naftol al 5%:

Alfa-Naftol.....	5 g
Alcohol Etílico abs.....	100 ml

Se disuelve el alfa-naftol en el alcohol. Se almacena en un frasco ámbar en el refrigerador.

(R-5) Solución de KOH-Creatina:

KOH.....	40 g
Creatina.....	0.3 g
Agua destilada.....	100 ml

Se disuelve el KOH en el agua y se agrega la creatina. Se almacena en un frasco de polietileno en el refrigerador.

FIG.2.- DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA CUENTA TOTAL DE BACTERIAS

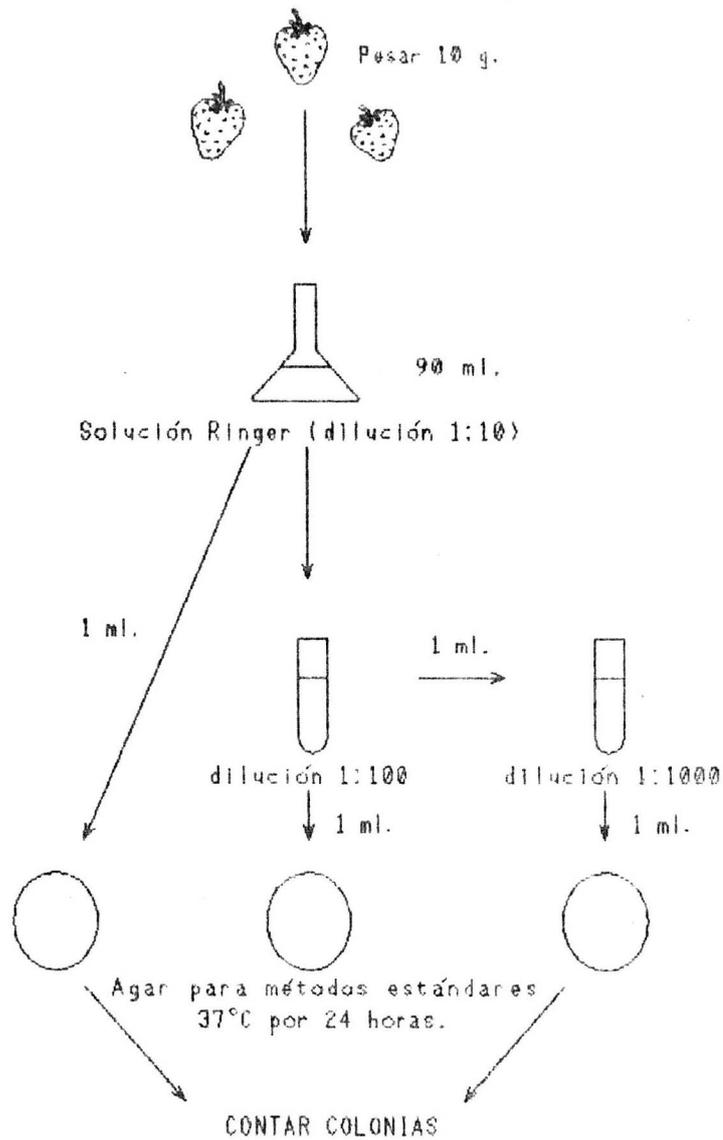


FIG. 3. - DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS COLIFORMES.

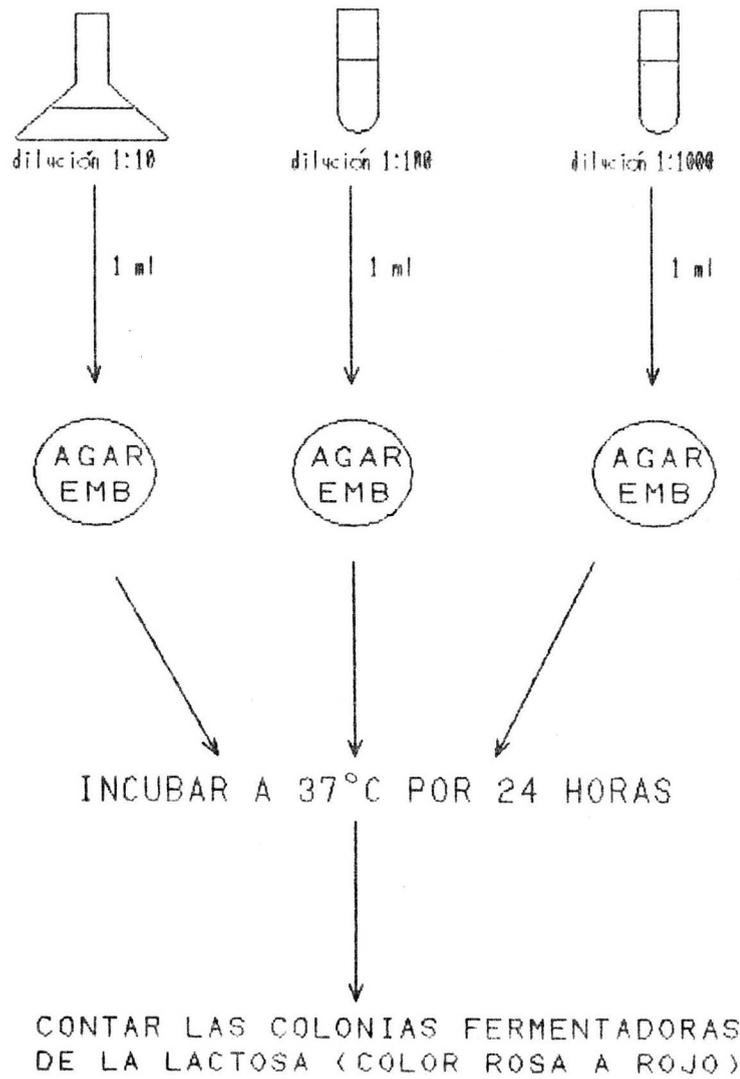


FIG.4.- DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL AISLAMIENTO DE SHIGELLA

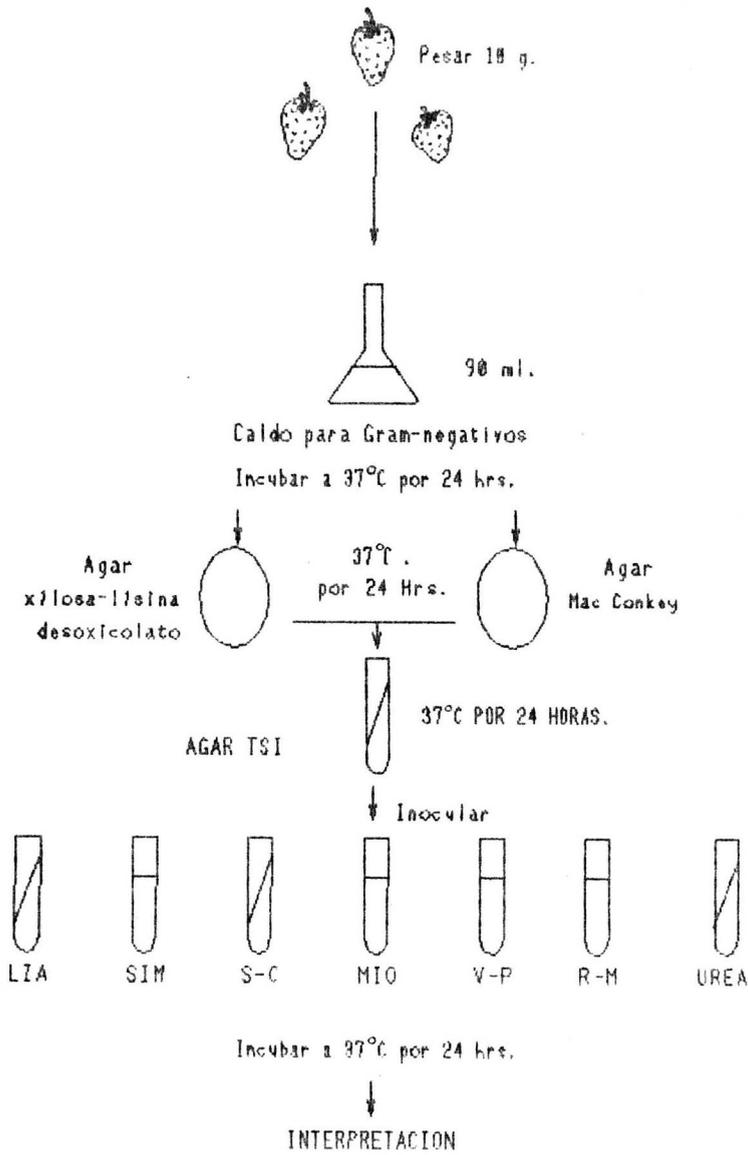


TABLA No. 1
 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DE
 LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS.

<u>PRUEBA</u>	<u>MEDIO UTILIZADO</u>	<u>RESULTADOS</u>	
		<u>POSITIVO</u>	<u>NEGATIVO</u>
Producción de Indol	MIO, SIM	Anillo rojo en superficie	Anillo Amarillo
Fermentación de Glucosa	TSI	•s (roja) •f (amarillo)	Anaranjado
Ferm. de Sacarosa y/o Lactosa	TSI	•s (amarilla) •f (amarillo)	Anaranjado
Producción de Ureasa	Agar urea de Christensen	Rosa	Amarillo
Descarboxilación de ornitina	MIO	Morado	Amarillo
Descarboxilación de la lisina	LIA	•s (lila) •f (lila)	Amarillo
Desaminación de la lisina	LIA	•s (vino) •f (amarillo)	Amarillo

Utilización de citrato	S-C	Azul	Verde
Producción de acetil-metil-carbinol.	U-P	Anaranjado-rojizo	Amarillo
Rojo de Metilo	U-P	Anaranjado-rojizo	Amarillo
Producción de H ₂ S	SIM, TSI, LIA	Negro	Color original del medio
Motilidad	MIO, SIM	Crecimiento en todo el medio	Crecimiento solo en la línea de inoculación

·s: superficie

·f: fondo

TABLA No. 2
 CARACTERES BIOQUIMICOS DEL GENERO SHIGELLA (a)

<u>MEDIO DE PRUEBA</u>	<u>REACCION</u>	<u>PORCENTAJE DE POSITIVIDAD</u>
Formación de gas a partir de glucosa	Negativo (b)	2.1
Voges-Proskauer	Negativo	0
Indol	Positivo ó Negativo	37.8
Rojo de Metilo	Positivo	100
Lisina	Negativo	0
Ornitina	Positivo ó (c) Negativo	20
Citrato	Negativo	0
Lactosa (d)	Negativo (e)	0.3 (11.4)
Ureasa	Negativo	0
Motilidad	Negativo	0

(a) Basado en el estudio de 5166 cultivos del género Shigella (Ewing y coli., 1971).

(b) Ciertos tipos de S. flexneri ó pueden producir una pequeña cantidad de gas.

(c) Los cultivos de Shigella sonnei fermentan la lactosa lentamente y descarboxilan la ornitina.

(d) La cifra entre parentesis indica porcentaje de reacciones tardías (3 ó más días). (9)

RESULTADOS

Los resultados estadísticos de los 17 experimentos entre tratamiento y testigo se muestran en la tabla No. 3 para la cuenta total de bacterias y en la tabla No. 4 para la cuenta de coliformes. Como se puede observar en la tabla No. 3, solamente un tratamiento presentó diferencia altamente significativa en comparación con el testigo (T_0), mientras que en la tabla No. 4 fueron dos los tratamientos que presentaron esta diferencia.

En ninguna de las 110 muestras destinadas para el aislamiento de Shigella sp. se obtuvieron cepas de ésta.

Se aislaron e identificaron otras especies

bacterianas las cuales aparecen indicadas en la tabla No. 5. La mayoría son de origen fecal, encontrándose con mayor frecuencia Escherichia coli, Enterobacter sp. y Proteus sp.

En la búsqueda de Shigella se aisló e identificó una cepa de Salmonella sp. la cual puede ser el agente etiológico de gastroenteritis o de fiebres entéricas.

TABLA No. 3
 PRUEBA DE STUDENT PARA EL PROMEDIO DE LAS
 MUESTRAS TRATADAS COMPARADAS CON EL PROME-
 DIO DE LAS MUESTRAS TESTIGO, PARA LA CUEN-
 TA TOTAL DE BACTERIAS.

E.E. (a)	Tratamientos			Testigo (T ₀)			t _e
	n (b)	\bar{x}	s	n	\bar{x}	s	
1	10	2.42x10 ⁴	4.26x10 ⁴	10	8.83x10 ³	1.51x10 ⁴	-1.08
2	10	1.43x10 ³	1.40x10 ⁴	10	7.33x10 ³	1.71x10 ⁴	1.08
3	10	1.15x10 ³	1.54x10 ³	10	2.38x10 ³	2.39x10 ³	-1.59
4	5	1.21x10 ³	1.31x10 ³	5	3.03x10 ³	1.91x10 ³	0.77
5	5	2.68x10 ⁴	3.52x10 ⁴	5	1.42x10 ³	1.68x10 ³	1.51
6	5	5.08x10 ⁴	1.01x10 ³	5	1.71x10 ⁴	1.45x10 ⁴	-0.73
7	5	1.87x10 ³	1.43x10 ³	5	3.91x10 ⁴	5.41x10 ⁴	1.54
8	5	1.44x10 ⁴	2.33x10 ⁴	5	5.08x10 ⁴	8.91x10 ⁴	0.88
9	5	1.68x10 ⁴	1.17x10 ⁴	5	3.92x10 ⁴	2.24x10 ⁴	1.98
10	5	1.28x10 ³	7.79x10 ⁴	5	5.10x10 ⁴	3.81x10 ⁴	-1.98
11	5	3.28x10 ⁴	3.53x10 ⁴	5	2.38x10 ³	7.10x10 ⁴	4.67**
12	15	6.76x10 ⁴	8.14x10 ⁴	15	5.83x10 ⁴	9.07x10 ⁴	-0.28
13	5	6.44x10 ²	2.87x10 ²	5	1.25x10 ⁴	1.91x10 ⁴	1.39
14	5	1.24x10 ³	1.13x10 ³	5	3.24x10 ³	2.89x10 ³	1.44
15	5	1.13x10 ³	2.14x10 ²	5	3.75x10 ³	2.95x10 ³	1.98
16	5	2.20x10 ⁴	2.86x10 ⁴	5	9.62x10 ⁴	1.33x10 ³	0.95
17	5	2.24x10 ³	1.94x10 ³	5	4.06x10 ³	4.04x10 ³	0.91

Hipótesis planteadas:

H₀ = ($\bar{x}_0 = \bar{x}_m$)

H_a = ($\bar{x}_0 \neq \bar{x}_m$)

número de tratamiento

t_{tablas}:

t_{0.05(18)} = 2.101 t_{0.01(18)} = 2.878

t_{0.05(8)} = 2.306 t_{0.01(8)} = 3.355

t_{0.05(28)} = 2.048 t_{0.01(28)} = 2.763

(a) Experimento específico

(b) Número de repeticiones

* Diferencia significativa (0.05%)

** Diferencia altamente significativa (0.01%)

TABLA No. 4
 PRUEBA DE STUDENT PARA EL PROMEDIO DE LAS
 MUESTRAS TRATADAS COMPARADAS CON EL PROME-
 DIO DE LAS MUESTRAS TESTIGO, PARA LA CUEN-
 TA DE COLIFORMES.

E.E. (a)	Tratamientos			n	Testigo		t _c
	n (b)	\bar{x}	s		\bar{x}	s	
1	10	2.85x10 ³	3.82x10 ³	10	3.25x10 ³	2.31x10 ³	0.28
2	10	1.08x10 ³	1.76x10 ³	10	7.85x10 ²	1.11x10 ³	-0.45
3	10	5.55x10 ⁴	6.81x10 ⁴	10	2.29x10 ⁴	2.54x10 ⁴	-1.42
4	5	1.22x10 ⁵	1.66x10 ⁵	5	1.21x10 ⁵	1.38x10 ⁵	-0.006
5	5	1.17x10 ³	1.25x10 ³	5	1.19x10 ³	1.20x10 ³	1.32
6	5	2.29x10 ⁴	4.55x10 ⁴	5	7.54x10 ³	3.53x10 ³	-0.75
7	5	1.08x10 ³	1.31x10 ³	5	1.22x10 ⁴	1.07x10 ⁴	2.29
8	5	1.13x10 ⁴	1.14x10 ⁴	5	3.11x10 ⁴	6.09x10 ⁴	0.72
9	5	2.76x10 ³	3.52x10 ³	5	1.51x10 ⁴	1.28x10 ⁴	2.08
10	5	5.48x10 ²	3.58x10 ²	5	3.37x10 ³	1.78x10 ³	3.47**
11	5	2.31x10 ³	3.87x10 ³	5	1.79x10 ⁴	2.63x10 ⁴	1.31
12	15	1.10x10 ⁴	8.41x10 ³	15	1.05x10 ⁵	3.71x10 ⁴	1.17
13	5	8.20x10 ¹	1.29x10 ²	5	3.10x10 ³	5.92x10 ³	1.14
14	5	5.40x10 ¹	8.35x10 ¹	5	4.16x10 ²	5.20	9.67**
15	5	2.24x10 ²	2.14x10 ²	5	4.60x10 ²	6.57x10 ²	1.98
16	5	5.70x10 ⁴	1.08x10 ⁵	5	8.17x10 ⁴	1.20x10 ⁵	0.29
17	5	3.92x10 ⁵	7.32x10 ⁵	5	2.09x10 ⁴	2.98x10 ⁴	1.11

Hipótesis planteadas:

H₀ = ($\bar{x}_0 = \bar{x}_m$)

H_a = ($\bar{x}_0 \neq \bar{x}_m$)

m: número de tratamientos

t_{tablas}:

t_{0.05(18)} = 2.101 t_{0.01(18)} = 2.878

t_{0.05(8)} = 2.306 t_{0.01(8)} = 3.355

t_{0.05(28)} = 2.048 t_{0.01(28)} = 2.763

(a) Experimento específico

(b) Número de repeticiones

* Diferencia significativa (0.05%)

** Diferencia altamente significativa (0.01%)

TABLA No.5

BACTERIAS CONTAMINANTES AISLADAS E IDENTIFICADAS EN
LAS MUESTRAS

Citrobacter freundii

Enterobacter hafniae

Enterobacter liquefaciens

Escherichia coli

Klebsiella ozaenae

Morganella morganii

Proteus vulgaris

Salmonella sp.

Serratia liquefaciens

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos para la cuenta total de bacterias se observan en la tabla No. 3. Para la evaluación de estos resultados se utilizó el método de t-Student en donde se analizó la diferencia de las medias de cada tratamiento desinfectante, con la media de cada tratamiento testigo. En esta tabla se puede apreciar que no hubo diferencia significativa para ninguno de los tratamientos en comparación con el testigo, con excepción del tratamiento No. 11, en el cual se encontró una diferencia altamente significativa. Sin embargo, el coeficiente de variabilidad es muy alto (de 107.62%), por

lo tanto se recomienda aumentar, en un estudio posterior, el número de muestras a analizar para establecer en forma definitiva la efectividad de este tratamiento.

La tabla No. 4 muestra la prueba de t-Student en donde se analiza la diferencia de las medias de cada tratamiento desinfectante con la media de cada tratamiento testigo, para la cuenta de coliformes. En este caso se encontraron dos tratamientos que presentaron diferencia altamente significativa en comparación con el testigo, estos tratamientos fueron el No.10 y el No.14. Sin embargo, al igual que en el caso anterior, estos tratamientos presentan un coeficiente de variabilidad muy alto (de 65.33% y de 154.63% respectivamente), por lo tanto se hace la recomendación anterior.

El alto coeficiente de variabilidad encontrado en la mayoría de los casos, se debe a que las fresas presentaron niveles de contaminación muy heterogéneos, aún dentro de un mismo lote. Esto explica los valores negativos obtenidos en las tablas No. 3 y No. 4.

El hecho de haberse encontrado una dispersión tan grande en los conteos bacterianos, dificultó el análisis estadístico y debido a esto no se puede concluir que los tres tratamientos, que presentaron una diferencia altamente significativa en comparación con el testigo,

realmente sean adecuados para eliminar con efectividad la contaminación de las fresas.

Para validar la información obtenida en este análisis, sería recomendable que en estudios posteriores se realizaran repeticiones de los tratamientos que presentaron diferencia altamente significativa, así como la búsqueda de un método adecuado para homogeneizar las muestras, con el objeto de reducir la dispersión de las variable involucradas en el experimento.

Los desinfectantes estudiados coinciden con los métodos más utilizados por las amas de casa para desinfectar verduras y frutas como la fresa. Además, se probaron las dosis y tiempos recomendados por los fabricantes de dichos desinfectantes, teniendo que aumentarse cuando no se observaron los resultados esperados. Sin embargo, aún aumentando la concentración del desinfectante y el tiempo de acción, no se encontró que fueran efectivos para disminuir en forma significativa el grado de contaminación de las fresas.

Debido a lo anterior, se recomienda continuar este estudio para encontrar el desinfectante adecuado y determinar la dosis y tiempo óptimos.

Por otra parte, es importante aclarar que se

utilizó detergente solamente como una prueba, pero no es un tratamiento recomendable para eliminar la contaminación, debido a que contiene sustancias residuales no degradables por el organismo humano, que penetran en las fresas al ser tratadas por este método. El detergente además altera la textura y el sabor de esta fruta.

En general, se observó que todas las fresas presentaron un alto grado de contaminación por coliformes y es muy probable que dicha contaminación provenga de las aguas de riego. Este es un grave problema si se toma en cuenta que las aguas negras pueden estar contaminadas con bacterias patógenas como la Shigella y la Salmonella y que la fresa puede convertirse en una fuente de infección para el hombre.

Debido a que el aislamiento de bacterias coliformes es un indicador de contaminación fecal, su presencia en las muestras de fresa aumenta la probabilidad de la existencia de Shigella, ya que esta bacteria se encuentra en las heces de los portadores y de los enfermos.

En el presente estudio no se logró aislar Shigella, probablemente debido los siguientes factores:

- El alto grado de contaminación de las fresas ocasionó que las shigelas fueran inhibidas por la microflora competidora.

- La morfología de las colonias del género Shigella puede variar en los medios de cultivo habitualmente utilizados. Por esto, una cepa de este género puede ocasionalmente no exhibir la morfología normal y esperada de las colonias y, consiguientemente, no ser detectada (9).

- Las shigelas se encuentran entre las bacterias entéricas patógenas más difíciles de aislar a partir de alimentos, ya que su supervivencia se ve influenciada por la temperatura, el pH y el tipo de alimento (9).

En el presente estudio se logró aislar una cepa de Salmonella, bacteria que juega un papel muy importante como agente etiológico de gran parte de las enfermedades diarreicas en México.

La contaminación fecal, en frutas como las fresas, puede provenir de diversas fuentes tales como, el agua con que se cultivan, el agua de lavado y la manipulación inadecuada de las frutas desde su cultivo hasta su venta. Si a lo anterior se agrega, que en muchas ocasiones, no se toman las medidas higiénicas adecuadas para la

desinfección de dichas frutas antes de su consumo, se tendrá una probable fuente de shigelosis y de otras enfermedades entéricas.

De esto deriva la importancia de encontrar un método efectivo para el aislamiento e identificación de estas bacterias, y así poder determinar si las frutas que llegan al consumidor están o no contaminadas, con el objetivo de tomar las medidas, tanto de control de la contaminación como de salud pública, que sean pertinentes.

Finalmente, se puede concluir que aunque los métodos actuales son satisfactorios, es necesario investigar más para desarrollar mejores medios de transporte, de enriquecimiento y selectivos para el aislamiento de Shigella sp. a partir de los alimentos.

RESUMEN

Se analizaron un total de 330 muestras de fresas, de las cuales 220 se utilizaron para probar el efecto de cuatro desinfectantes y 110 para el aislamiento de Shigella sp.

El análisis general de las 220 muestras constó de 17 experimentos específicos, realizándose en cada uno de ellos la cuenta total de bacterias y la cuenta de coliformes. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el diseño de muestras independientes con la prueba de t-Student.

Solo se encontró diferencia altamente significativa en tres tratamientos, sin embargo se observó que estos

presentaban un coeficiente de variabilidad muy alto.

Para el aislamiento de Shigella sp. se utilizaron caldo de enriquecimiento y medios selectivos, además de pruebas bioquímicas para su identificación.

De las 110 muestras examinadas ninguna resultó positiva para el aislamiento de Shigella.

BIBLIOGRAFIA

1. Alsina, L. 1978. Cultivo de Fresas y Fresones. Editorial SINTES, S.A., Barcelona. pp. 5-8.
2. APHA-AWWA-WPCF. 1975. Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. 14th.ed. Washington, pp. 955-960.
3. Burrows. 1969. Tratado de Microbiología. 10a. ed. Editorial Interamericana, México. pp. 246-254, 506-516.

4. Desrosier, N.W. 1984. Elementos de Tecnología de Alimentos. Editorial C.E.C.S.A., México. pp. 291-292.
5. Divo, A. 1971. Microbiología Médica. 2a. ed. Editorial Interamericana, México. pp. 169-171.
6. Finegold, S.M., et al. 1986. Diagnostic Microbiology Bailey's and Scott. 7th.ed. The C.V. Mosby Company, Saint Louis, Mo.
7. Frazier, W.C. 1978. Microbiología de los Alimentos. 3a. ed. Editorial Mc-Graw-Hill, México. pp. 202-237.
8. International Comission on Microbiological Specifications for Foods. 1980. Ecología Microbiana de los Alimentos. Vol. II. Productos Alimenticios. Editorial Acribia, Zaragoza, España. pp. 631-635.
9. International Comission on Microbiological Specifications for Foods. 1980. Microorganismos de los Alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológico. Editorial Acribia, Zaragoza, España. pp. 20-22, 176-182.

10. Jawetz, E., y col. 1981. Manual de Microbiología Médica. 9a. ed. Editorial El Manual Moderno, S.A. México.
11. Larrea R.S. y R.E. Tapia. 1981. Obtención de un ensilado de desechos de las empacadoras de fresa. Ind. Aliment. 3(1): 5-8.
12. Marvinl, S. 1984. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 2nd.ed. American Public Health Association, Washington, D.C. pp. 343-349.
13. Muler, G. 1981. Microbiología de los Alimentos Vegetales. Editorial Acribia, Zaragoza, España. pp. 1-23, 157-168.
14. Nicker, J.T., y col. 1978. Microbiología de los alimentos y sus Procesos de Elaboración. Editorial Acribia, Zaragoza, España. pp. 12, 202-206.
15. O'Brien, A.D. and R.K. Holmes. 1987. Shiga and Shiga-Like Toxins. Microbiol. Rev. 51(2): 206-220.
16. Potter, N. 1978. La Ciencia de los Alimentos. 2a. ed. Editorial Edutex, S.A., México.

17. Prado, D., et al. 1986. The Relation Between Production of Cytotoxin and Clinical Features in Shigellosis. J. Infect. Dis. 154(1): 149-154.
18. Reyes, C.P. 1979. Bioestadística Aplicada. ITESM, Monterrey, N.L. México.
19. Salas, M. 1969. La Fresa y el Desarrollo Agrícola de la zona de Zamora. Banco Nacional Agropecuario, S.A., México. pp. 10, 11, 26-28.
20. S/N. 1985. Dieta Sana, Cuerpo Sano. Selecciones del Reader's Digest. México, pp. 91,93.
21. Struelens, M.J., et al. 1985. Shigella Septicemia: Prevalence, Presentation, Risk Factors, and Outcome. J. Infect. Dis. 152(4): 784-787.

901007