

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Nivel de contaminación de *Brassica oleracea* "col" y *Lactuca sativa* "lechuga", por *Salmonella*, *Shigella* y coliformes fecales, regadas con aguas del río Chacco. Ayacucho-2010.

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

BIOLOGÍA

ESPECIALIDAD DE MICROBIOLOGÍA

Presentado por:

CAYO ORÉ, Ying Edwar

AYACUCHO - PERÚ

2011

A mis padres María Lourdes
Oré Sánchez y Hostilio Cayo
Miguel

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y en especial a los docentes que laboran en la Escuela de Formación Profesional de Biología por haberme acogido en sus aulas y por haberme formado como persona y profesional.

Al Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho Filial – INS por permitirme la realización del presente trabajo de investigación y a la directora la Blga. Miriam Soledad Meneses Meneses, a los biólogos Vanesa García Apaico, Víctor Luis Tenorio Aguirre, por su apoyo constante.

Al Blgo. M.Cs. Víctor Luis Cárdenas López por su asesoramiento, amistad y apoyo incondicional.

ÍNDICE

RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes.....	3
2.2. Contaminación de origen bacteriano.....	5
2.2.1. Fuentes de contaminación bacteriana.....	6
2.3. Taxonomía botánica.....	7
2.3.1. Taxonomía botánica de <i>Lactuca sativa</i> "lechuga".....	7
2.3.2. Taxonomía botánica de <i>Brassica oleracea</i> "col".....	7
2.4. Bacterias coliformes.....	8
2.5. Número Más Probable (NMP).....	8
2.5.1. Numeración de coliformes fecales por la técnica de tubos múltiples.....	8
2.6. Enterobacteriaceae.....	10
2.6.1. <i>Escherichia coli</i>	10
2.6.1.1. Signos clínicos y pronóstico.....	11
2.6.1.2. Incidencia y epidemiología.....	12
2.6.1.3. Ecología y alimentos de riesgo.....	12
2.6.1.4. Prevención y control.....	12
2.6.2. <i>Salmonella sp.</i>	13
A) Salmonelosis.....	13
B) Síndrome de fiebre entérica.....	14
2.6.2.1. Incidencia y epidemiología.....	14
2.6.2.2. Ecología y alimentos de riesgo.....	15
2.6.2.3. Aislamiento.....	15
2.6.2.4. Caracterización bioquímica.....	15
2.6.3. <i>Shigella sp.</i>	16
2.6.3.1. Incidencia y epidemiología.....	17
2.6.3.2. Alimentos implicados.....	18
2.6.3.3. Control.....	18
2.6.3.4. Aislamiento.....	19
2.6.3.5. Caracterización Bioquímica.....	19
2.7. Los criterios microbiológicos para los alimentos.....	20
2.7.1. Base legal y técnica.....	20
2.7.2. Planes de muestreo.....	20
a) Categoría de riesgo.....	20
b) Componentes del plan de muestreo.....	20
c) Tipos de plan de muestreo para lote o lotes.....	21
2.7.3. Grupos de microorganismos.....	22
2.7.4. Reporte de ensayo.....	23
2.7.5. Criterios Microbiológicos.....	23
2.8. Estándares nacionales de calidad ambiental para aguas.....	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
IV. RESULTADOS	30
V. DISCUSIÓN	38
VI. CONCLUSIONES	47
VII. RECOMENDACIONES	48
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXO	54

"Nivel de contaminación de *Brassica oleracea* "col" y *Lactuca sativa* "lechuga", por *Salmonella*, *Shigella* y coliformes fecales, regadas con aguas del río Chacco. Ayacucho -2010"

Autor : Bach. Ying Edwar CAYO ORÉ
Asesores
Interno : Mg. Víctor Luís CÁRDENAS LÓPEZ
Externo : Biga. Miriam Soledad MENESES MENESES
Bigo. Víctor Luís TENORIO AGUIRRE

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se ejecutó durante los meses de julio a octubre de 2010, con el objetivo de evaluar el nivel de contaminación de *Brassica oleracea* "col" y *Lactuca sativa* "lechuga", por *Salmonella*, *Shigella* y coliformes fecales, regadas con aguas del río Chacco. Se analizaron 60 muestras de *Brassica oleracea*, 60 muestras de *Lactuca sativa* y 60 muestras de aguas de río Chacco tomados en 10 puntos, empleando la técnica del número más probable para la numeración de coliformes fecales y la siembra en medios selectivos para el aislamiento e identificación de *Salmonella* y *Shigella*. Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Alimentos del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho.

Los resultados indican que el 100% de las muestras de las aguas del río Chacco presentan coliformes fecales cuantificándose una media total de 63×10^3 NMP de coliformes fecales/100 ml y 5% de las muestras presentan *Salmonella* y *Shigella*, superando los parámetros establecidos para uso de aguas para riego de vegetales y bebida de animales establecido en los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua, aprobado por el Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM. La contaminación de *Lactuca sativa* y *Brassica oleracea* con coliformes fecales es de

71.7% y 28.3% respectivamente. La contaminación de *Lactuca sativa* con *Shigella* y *Salmonella* es de 3.3% y 1.7% respectivamente, algunos lotes no cumplen con las normas sanitarias que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano aprobado con Resolución Ministerial N° 591-2008/MINSA, NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01, *Brassica oleracea* "col" si cumple con la norma sanitaria establecido para bacterias de los géneros *Shigella* y *Salmonella*.

I. INTRODUCCIÓN

Desde los años anteriores siempre ha existido la preocupación para proteger al público en general de los diferentes riesgos y enfermedades transmitidas por los alimentos, particularmente por las verduras u hortalizas que se consumen crudas, ya que el interés fisiológico de las verduras en la alimentación reside ante todo en su contenido en vitaminas y sales minerales, mientras que su valor nutritivo es pequeño, debido a que en comparación con otros alimentos tienen un menor contenido de hidratos de carbono, grasa y proteína. Su contenido en celulosa es de gran importancia para la regulación del peristaltismo intestinal. Por tanto, es ampliamente recomendado como parte de la dieta. No obstante, la contaminación de las aguas del río Alameda con aguas residuales deficientemente tratadas por la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) "La Totora", con aguas servidas, excretas de los hombres y animales que descargan en este río, así como también la contaminación del río Huatatas, hacen que el río Chacco no cumplan con los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua de categoría 3 (Agua para uso de riego de vegetales y bebida de animales) ya que superan el límite establecido de 10^3 NMP de coliformes fecales/100 ml, sin embargo estas aguas son utilizadas para el riego de los cultivos, convirtiendo de este modo, a un grupo de alimentos como la "col" y la "lechuga" en vehículos potenciales de microorganismos

patógenos e indicadores de contaminación fecal como la *Salmonella*, *Shigella* y los coliformes fecales. Estos grupos de microorganismos toman importancia ya que la sola presencia en los alimentos condiciona su peligrosidad y al considerar que el tiempo de supervivencia de los microorganismos patógenos puede ser prolongado, semanas o meses, particularmente cuando los microorganismos están en las partes aéreas del vegetal, en las zonas más húmedas, protegidos de la desecación y de los rayos solares, tal como ocurre con la lechuga, col y otros vegetales de tallo corto, incrementando los factores de riesgo para la salud de la población.

Por lo cual, para el presente trabajo de investigación se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivos generales

- Evaluar el nivel de contaminación de *Brassica oleracea* "col" y *Lactuca sativa* "lechuga", por *Salmonella*, *Shigella* y coliformes fecales, regadas con aguas del río Chacco.

Objetivos específicos

- Determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* y *Shigella* en *Brassica oleracea* "col", *Lactuca sativa* "lechuga" y en las aguas del río Chacco.
- Determinar coliformes fecales por la técnica del número más probable (NMP) a partir de *Brassica oleracea* "col", *Lactuca sativa* "lechuga" y en aguas del río Chacco.
- Determinar la variación de coliformes fecales en los diez puntos de muestreo en aguas del río Chacco, *Brassica oleracea* "col" y *Lactuca sativa* "lechuga".

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes.

Narváez y col. En 2008 determinó en Ciénaga Grande de Santa Marta es el sistema lagunar costero más grande e importante de Colombia y el más extenso del Caribe. En su territorio se alojan siete poblaciones carentes de un sistema de saneamiento básico adecuado, que vierten sus desechos sin ningún tipo de tratamiento directamente a la ciénaga. En el que se determinaron las concentraciones de Coliformes termotolerantes en la época seca mayor de cada año (7.800-9.000 NMP/ 100 ml) y los menores niveles en la estación Buenavista (2-1.100 NMP/100ml). Teniendo en cuenta que constituye una fuente potencial de riesgo para el desarrollo de las actividades económicas de la zona y para la salud de los pobladores.

Vega y col. en 2004 en los estudios realizados en Xochimilco donde se cultivan hortalizas regadas con agua residual sin tratar presentar bacterias de origen fecal, lo que las convierte en una fuente de transmisión de diarrea de origen bacteriano. Se determinó que la mayor cantidad de coliformes fecales se presentaron en epazote, espinaca, cilantro, zanahoria y lechuga escarola, en

cantidades que superaron el valor permitido para este tipo de alimentos.

Rivera y col. en 2009 determinó el nivel de coliformes fecales y la frecuencia de *Escherichia coli* en 85 muestras de hortalizas, obtenidas de manera aleatoria y expandidas en los principales mercados de Cajamarca. El procesamiento, aislamiento e identificación bacteriana se realizó según la *Food and Drug Administration* (FDA). El 40% de muestras presentaron coliformes fecales, con elevado número más probable por gramo (NMP/g) e importante frecuencia de *E. coli* en perejil y lechuga. El análisis revela un alto nivel de contaminación fecal, un estado sanitario inaceptable y la necesidad de establecer medidas de control frente al riesgo que esto representa para la salud.

Pastor en 1995 quien realizó en Ayacucho un estudio sobre *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* en hortalizas regadas con aguas servidas parcialmente tratadas, en la que la numeración de coliformes totales por gramo de muestra sobrepasan los niveles permisibles de aceptación para consumo humano.

Navarte en 2002 determina el 92% de las muestras de lechuga y 64% de las muestras de col están contaminados con coliformes fecales; 18% de las muestras de lechuga y 06% de las muestras de col presentan *Salmonella* y 06% en lechuga y 4% en col presentan *Shigella*.

Agurto en 2009 menciona que cuando en el abonado de los cultivos se utilizan aguas residuales domésticas sin tratar, existe la posibilidad de que los alimentos vegetales recién cosechados estén contaminados por microorganismos patógenos para el hombre, sobre todo por aquellos que producen trastornos gastrointestinales.

Frazier y col. en 1993 menciona que las aguas residuales tratadas que van a parar al suelo o al agua también aportan microorganismos aunque en comparación

con la aguas residuales no tratadas deben contener una menor cantidad total de microorganismos y un número menor de patógenos.

Brock y col. en 1993 menciona que las bacterias patógenas más importantes transmitidas por el agua son *Salmonella typhi*, el organismo causante de la fiebre tifoidea y *Vibrio cholerae* que ocasiona el cólera, Aunque el agente causal de la fiebre tifoidea también puede transmitirse por los alimentos contaminados y por el contacto directo con las personas infectadas, el medio más común y más serio de transmisión es el agua.

2.2. Contaminación de origen bacteriano.

La Organización Mundial de la Salud, actualmente viene trabajando en la búsqueda de estrategias para disminuir las enfermedades transmitidas por los alimentos. La calidad de los alimentos implica la conservación de su pureza y de sus cualidades físicas, nutritivas y organolépticas que le son propias desde su origen o producción primaria y que deben conservarse a través de su procesamiento libres de contaminación (Remes, 1997).

La contaminación de alimentos se refiere a la invasión, por pequeña que sea, de cualquier elemento ya sea físico, químico o biológico que cause alguna alteración, dañe la salud humana o simplemente contravenga el sentido estético del consumidor (Remes, 1997).

La calidad microbiológica de los alimentos se mide en función a la cantidad de microorganismos que contiene el alimento por gramo o mililitro de muestra, además depende de las características organolépticas, siendo muy necesario tener en cuenta, las disposiciones legales de sanidad para determina la aceptabilidad o rechazo del alimento (Andía, 1994).

2.2.1. Fuentes de contaminación bacteriana.

Las fuentes son: el hombre, alimentos crudos, polvo, contaminación fecal, contaminación cruzada que es el proceso por la cual bacterias de un área son trasladadas generalmente por un manipulador alimentario a otra área antes limpia, de manera que infecta alimentos o superficies. Los casos más peligrosos de contaminación cruzada se dan cuando un manipulador alimentario pasa de manejar alimentos crudos a manipular alimentos ya sancochados sin lavarse las manos entre ambas fases y entre otras fuentes de contaminación bacteriana encontramos a los insectos, roedores, pájaros, desperdicios, etc (Hazelwood, 1994).

El agua contaminada con aguas residuales pueden transmitir *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli*. En los países en desarrollo han sido identificados determinados alimentos como vehículos de infección por *E. coli* una investigación prospectiva de la diarrea del viajero en los médicos que asistían a una conferencia en la ciudad de México, reveló que *E. coli* explicaba aproximadamente el 45% de los casos de diarrea y que la enfermedad estaba relacionada con el consumo de ensaladas que contenían hortalizas crudas (Agurto, 2009).

La contaminación microbiológica de las hortalizas toma mayor importancia al considerar que el tiempo de supervivencia de los microorganismos patógenos puede ser prolongado, semanas o meses, particularmente cuando los microorganismos están en las áreas más húmedas del vegetal protegidas de la desecación y de los rayos directos del sol, como ocurre en la lechuga, repollo, zanahoria y rábanos. Diversos estudios de campo y laboratorio han demostrado que los patógenos inoculados en la tierra de cultivo o en las aguas de irrigación de vegetales pueden sobrevivir hasta por dos meses, suficiente para que alcancen en forma viable al consumidor (Monge, 1992).

2.3. Taxonomía botánica

2.3.1. Taxonomía botánica de *Lactuca sativa* "lechuga"

Reino	:	Vegetal
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Asterales
Familia	:	Asteraceae
Género	:	<i>Lactuca</i>
N. Científico	:	<i>Lactuca sativa</i>
N. Común	:	"lechuga"

Características: la lechuga presenta flores dispuestas en capítulo (hermafroditas) y autógama debido a que la estructura de la flor facilita la autofecundación, presenta fruto alado llamado aquenio, presenta ovario ínfero unilocular (con un solo óvulo), hojas alternas opuestas (39).

2.3.2. Taxonomía botánica de *Brassica oleracea* "col"

Reino	:	Vegetal
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Brassicales
Familia	:	Brassicaceae
Género	:	<i>Brassica</i>
N. Científico	:	<i>Brassica oleracea</i>
N. Común	:	"col"

Características: la col es una planta bianual, presenta flores agrupadas en racimos, fruto silicua, hojas más anchas que largas (40).

2.4. Bacterias coliformes

Los coliformes se definen como bacterias de morfología bacilar, Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, oxidasa negativo, catalasa positivo, no formadoras de esporas que fermentan la lactosa con producción de gas y ácido a 37°C en un tiempo máximo de 48 horas, reducen el nitrato a nitrito, si estos coliformes son fecales presentarán las mismas características anteriores a las que además se les añade la producción de ácido y gas a 44 °C ± 0.5 °C en un tiempo máximo de 24 horas (Granados, 1997; Brock y col., 2001).

Los coliformes son usados como índice de contaminación fecal porque se puede aislar con facilidad que cualquiera de los microorganismos patógenos transmitidos por el agua, práctica que ha sido ampliada en la actualidad a los alimentos (Jay, 1994).

2.5. Número Más Probable (NMP)

El número más probables es una estimación de la densidad de los microorganismos viables en una muestra. Para realizar este cálculo la muestra debe diluirse de tal manera que una muestra más diluida de por resultado un número menor de tubos positivos, lo cual se manifiesta por la presencia de gas o de multiplicación de bacterias. Para obtener el NMP, se aplica a los resultados la teoría de la probabilidad de tal modo que las bacterias existen como entidades, no como grupo o conglomerado y no se repelen entre sí (Agurto, 2009).

2.5.1. Numeración de coliformes fecales por la técnica de tubos múltiples (NMP)

Para la numeración de coliformes termotolerantes (fecales) por la técnica de tubos múltiples (TM) se realiza a partir de los cultivos positivos de coliformes totales en Caldo Lauril Triptosa (CLT), los cuales son transferidos por asada en tubos

conteniendo medio EC e incubados a 44.5 ± 0.2 °C en baño maría con agitación y temperatura constante durante 24 horas.

La formación de gas (CO₂) en los tubos con Medio EC se considera como una reacción positiva a coliformes fecales. Los resultados positivos se expresan en términos de número más probable (NMP/100 ml). El límite de detección depende del volumen y la combinación de tubos utilizados y varían entre valores de 1.1 y 2 NMP/100 ml (Agurto, 2009).

2.6. Enterobacteriaceae

Las Enterobacteriaceae son microorganismos oxidasa negativos, fermentadora de glucosa y reducen el nitrato. Las bacterias de esta familia habitan en una amplia variedad de sitios, como en el tracto gastrointestinal del ser humano de otros animales, y diversos sitios del medio ambiente (ver cuadro N°01).

Esta familia comprende especies que colonizan en forma habitual el aparato gastrointestinal humano o que más se asocian con infecciones gastrointestinales, hay excepciones, como el bacilo de la peste, *Yersinia pestis*. El otro grupo comprende los géneros que pueden colonizar a los seres humanos, pero que rara vez se asocian a infecciones en el ser humano, en mayoría de los casos se conocen como habitantes del medio (Forbes y col., 2004).

2.6.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo y no esporulado. Pertenece a la familia Enterobacteriaceae y tradicionalmente la más estudiada por los investigadores. Está presente en el tracto intestinal de las personas y animales de sangre caliente y también ampliamente distribuido en la naturaleza. Hasta los fines de la década de los 50 fue considerada como una especie no patógena, pero

Cuadro N° 1: Géneros y especies de la familia enterobacteriaceae

Géneros y especies de La familia Enterobacteriaceae que colonizan habitualmente en los seres humanos	Géneros y especies de la familia Enterobacteriaceae no asociados habitualmente con infecciones en seres humanos
<i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter koseri</i> <i>Edwardsiella tanja</i> <i>Enterobater aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacale</i> <i>Enterobacter gergoviae</i> <i>Enterobacter ornigenus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus penneri</i> <i>Providencia stuartii</i> <i>Providencia rettgeri</i> <i>Salmonella, todo los serotipos</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Shigella dysenteriae (grupo A)</i> <i>Shigella flexneri (grupo B)</i> <i>Shigella boydii (grupo C)</i> <i>Shigella sonnei (grupo D)</i> <i>Yersinia pestis</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Budvicia aquatica</i> <i>Buttiauxella agrestis</i> <i>Cedecea davisae</i> <i>Citrobacter braakii</i> <i>Citrobacter farmeri</i> <i>Citrobacter gillenii</i> <i>Citrobacter youngae</i> <i>Edwardsiella hoshinae</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Especies de Erwinia</i> <i>Escherichiafergusonii</i> <i>Escherichia hemannii</i> <i>Escherichia vulneris</i> <i>Ewingella americana</i> <i>Klebsiella omithinolytica</i> <i>Klebsiella planticola</i> <i>Kluyvera scorbata</i> <i>Leclercia adecarboxilata</i> <i>Leminorella grimontii</i> <i>Moellerella wisconsinensis</i> <i>Proteus hausad</i> <i>Providencia alcalifaciens</i> <i>Serratia rubidaea</i> <i>Serratia ficaria</i> <i>Yersinia rohdei</i>

Fuente: Forbes y col., 2004.

en la actualidad *E. coli* es calificada como un organismo potencialmente patógeno, por estudios de Biología Molecular, se ha demostrado que ciertas cepas tienen la capacidad de inducir enfermedad a través de diversos mecanismos de virulencia (INS, 2005).

En 1945 Bray demostró el rol de *Escherichia coli* como patógeno entérico responsable de un brote de diarrea infantil y lo llamó *bacillus coli*, Kauffman en 1947 desarrolló el esquema para diferenciar a *E. coli* en base a sus antígenos: lipopolisacárido O, flagelar H y polisacárido K y encontró que la cepa descrita por Bray pertenecía al serogrupo O111.

Actualmente se reconocen 171 serogrupos O y 56 H. En conjunto constituyen el sistema O:H.

Durante muchos años la identificación se realizó en el laboratorio por técnicas de aglutinación utilizando antisueros O y H.

Investigaciones realizadas durante los últimos 15 años, utilizando una gran variedad de ensayos “*in vivo*” e “*in vitro*”, han permitido identificar y clasificar al “heterogéneo” grupo de *E. coli* diarreogénico (ECD), al menos hasta el presente, 6 categorías de *E. coli* asociadas a diarreas (INS. 2003).

Esta clasificación se basa en factores de virulencia, interacción con la mucosa intestinal, síndrome clínico que producen, diferentes serotipos O:H dentro de cada categoría. Una vez que se establece la adherencia - colonización, hay distintos mecanismos de patogenicidad asociados a factores de virulencia específicos. Ellos son:

1. Producción de enteroxinas (ETEC y EAEC)
2. Invasión (EIEC)
3. Adherencia íntima con destrucción de la microvellosidades (EPEC Y EHEC).
4. producción de citotoxinas (EHEC) (INS, 2003).

La transmisión de ECD se realiza de persona a persona por la vía fecal-oral o a través de la ingesta de alimentos y agua contaminada. La dosis infectada varía de $10^8 - 10^9$ UFC a $10 - 10^2$ UFC (EHEC). Las características clínicas de la diarrea por ECD están asociadas a sus respectivos mecanismos de patogenicidad y en general se presentan como diarrea acuosa o mucosa, vómitos y poca fiebre (ETEC, EPEC, EAC, DAEC, EIEC y EHEC en una primera etapa) ó diarrea hemorrágica (EHEC y EIEC en una segunda etapa) (INS 2003).

2.6.1.1. Signos clínicos y pronóstico: El periodo de incubación suele durar normalmente de 12 a 72 horas, pero en algunos casos de ECEH este periodo puede durar de 2 a 8 días, e incluso 12 días, En general los síntomas varían en tipo y severidad dependiendo del serotipo interesado. Los síntomas incluyen raramente

nauseas y vómitos, pero típicamente diarrea con sangre y/o mucus, dolor abdominal y fiebre (Eley, 1994).

2.6.1.2. Incidencia y epidemiología: las infecciones alimentarias causadas por ECEP y ECEI son aparentemente raras habiendo pocos datos de brotes por todo el mundo. De otro lado ECET es responsable de la diarrea de los viajeros, característica de los individuos que viajan desde zonas de una buena higiene y clima templado a otros con niveles higiénicos más bajo tales como en los países en vías de desarrollo. ECEH fue registrado por primera vez como causante de colitis hemorrágico en 1982 en los Estados Unidos (Eley, 1994; Brock y col., 1993).

Una investigación prospectiva de la diarrea del viajero en los médicos que asistían a una conferencia en la ciudad de México, reveló que ECET explicaba que aproximadamente el 45% de los casos de diarrea y que la enfermedad estaba relacionada con el consumo de ensaladas que contienen hortalizas crudas (ICMSF, 1996).

2.6.1.3. Ecología y alimentos de riesgo: el método de transmisión más importante es la contaminación fecal de los alimentos, bien por contacto directo o indirectamente por medio del agua, lo cual afecta frecuentemente a las carnes, a los productos cárnicos y a las verduras frescas (Eley, 1994).

2.6.1.4. Prevención y control: se cree que las personas portadoras, tanto sintomáticas como asintomáticas, son el reservorio principal y la fuente de las cepas ECEP, ECEI y ECET implicadas en la enfermedad humana. Estos organismos se hallan en el tracto intestinal de los portadores y, por lo tanto, son excretados en heces. Los alimentos pueden ser contaminados por manipuladores de alimentos infectados que practican una defectuosa higiene personal o por contacto con agua contaminada con aguas residuales domésticas. Además, no se deben utilizar aguas

residuales domésticas no tratadas para abonar las hortalizas y los cultivos que se emplean para el consumo humano ni tampoco se debe utilizar agua no clorada, para limpiar el material que se emplea para tratar los alimentos y las superficies que contactan con los mismos (ICMSF, 1996).

2.6.2. *Salmonella* sp.

El género *Salmonella*, pertenece a la tribu Salmonelleae, de la familia Enterobacteriaceae. Los miembros del género *Salmonella*, son bacilos Gram negativos de 0,7 a 1,5 x 2,0 a 5 µm. Generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *Salmonella gallinarum*), son anaerobios facultativos, no esporulados, pero desarrollan bien en los medios de cultivo ordinarios en presencia de oxígeno. Este género fue objeto de sucesivas modificaciones a través de los años, en lo que respecta a su nomenclatura y taxonomía (INS, 2003).

El género *Salmonella* se dividen en más de 2400 serovariedades, que están definidos en función de diferentes asociaciones de factores antigénicos somáticos O y flagelares H (INS, 2003).

Las patologías causadas por los miembros del género *Salmonella* son las siguientes:

A) Salmonelosis: es una zoonosis de distribución mundial. Estima enfermedad de origen alimentario, por que los alimentos contaminados constituyen el principal modo de transmisión.

Los síntomas son gastroenteritis aguda, cefalalgia, dolores abdominales súbitos, diarreas, náuseas, fiebre y vómitos, La deshidratación puede ser grave sobre todo en niños menores de 1 año, ancianos e inmunocomprometidos.

Tiene un período de incubación de 6 a 72 hrs. la gastroenteritis persiste de 24 a 72 hrs.

B) Síndrome de fiebre entérica: está asociado con *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi C* y *Salmonella paratyphi B* (fiebre paratifoidea). Los tres primeros son patógenos exclusivos del hombre y *Salmonella paratyphi B* se puede encontrar también en animales (INS, 2003).

2.6.2.1. Incidencia y epidemiología. las salmonelas se encuentran en todas partes y están reconocidas universalmente como agentes zoonóticos. Han sido identificados numerosos reservorios animales. Algunos alimentos, especialmente los de origen animal y los que están expuestos a contaminación por aguas residuales, han sido identificados como vehículos para la transmisión de estos patógenos a los seres humanos y para diseminarlos a los ambientes de elaboración y de las cocinas (ICMSF, 1996).

El modo más habitual de infección es el que tiene lugar a través de los alimentos. En las gallinas infectadas los huevos se contaminan a su paso por el oviducto. Las carnes de todos los animales de abasto que son portadores de *Salmonella* (aves, cerdos, bovino, etc.) se pueden contaminar a partir del tubo digestivo, durante el sacrificio en los mataderos (Agurto, 2009).

Las verduras pueden contaminarse con *Salmonella* a consecuencia de la utilización de abonos orgánicos o del riego con aguas residuales; en las cocinas durante la manipulación de los alimentos los microorganismos pueden pasar de los contaminados a los no contaminados. En todos ellos, si no están bien conservadas las salmonelas pueden multiplicarse y alcanzar las dosis infectantes mínimas (Agurto, 2009).

El contagio directo de persona a persona es posible, pero frecuente por la elevada dosis infectante, por esta razón la transmisión hídrica, (heces-agua de consumo), es también poco frecuente ya que las *Salmonelas* no se multiplican en el agua. Por el

contrario si que es frecuente que una persona portadora enferma o portadora que manipula alimentos los contamine, pudiendo multiplicarse en ellos las salmonelas e infectar así a las personas que los consumen (ICMSF, 1996).

La transmisión a través de las aguas es también frecuente, bien porque están altamente contaminadas con material fecal, o por que se utilizan para lavar algún utensilio o preparar algún alimento y los microorganismos tienen oportunidad de multiplicarse (Agurto, 2009).

2.6.2.2. Ecología y alimentos de riesgo:

Las salmonelas se encuentran en todas partes y están reconocidas universalmente como agente zoonótico. Han sido identificados numerosos reservorios de animales. Algunos alimentos, especialmente de origen animal y los que están expuestos a contaminación por aguas residuales, han sido identificados como vehículos para la transmisión de estos patógenos a los seres humanos y para diseminarlos a los ambientes de elaboración y de las cocinas (Agurto, 2009).

2.6.2.3. Aislamiento: se utilizan medios selectivos y diferenciales como Agar Mac Conkey, Agar SS, XLD, DC, etc. Las placas se incuban a 37 °C durante 24 horas y se observan las colonias incoloras y con punto negro.

2.6.2.4. Caracterización bioquímica

a) **TSI:** K/A, inclinación alcalina (rojo)/fondo ácido(amarillo)

K: indica lactosa negativa A: indica glucosa positiva

En este medio se pueden leer lo siguiente:

Hidrogeno sulfurado:

Positivo: color negro en el medio, intensidad 1+ a 4+

Gas de glucosa:

Positivo: resquebrajamiento del medio intensidad 1+ a 4+

b) LIA: K/A - , inclinación alcalina (violeta)/fondo ácido(amarillo), con indol negativo

c) LIA: K/K - , inclinación alcalina (violeta)/ fondo alcalina (violeta), con indol negativo

Cuadro N° 2: Diferenciación bioquímica para *Salmonella*

Especies	TSI	Gas	H ₂ S	LIA	Indol	Citrato	Urea	SIM		
								S	I	M
<i>Salmonella typhi</i>	K/A	-	+	K/K	-	-	-	+	-	+
<i>Salmonella paratyphi A</i>	K/A	+	-	K/A	-	-	-	-	-	+
<i>Salmonella paratyphi B</i>	K/A	++	++	K/K	-	-	-	+	-	+
<i>Salmonella spp.</i>	K/A	++	++++	K/K	-	V	-	+	-	V

Fuente: INS, 2003 V : variable (+): positivo 90% o más de las cepas en 1 o 2 días (-): negativo 90% o más de las cepas.

2.6.3. *Shigella sp.*

El género *Shigella* pertenece a la Tribu Escherichia de la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos gram negativos de 0.7 a 2 micrones son inmóviles y no esporulados. Fermentan la glucosa y otros azúcares con producción de ácido, no utilizan citrato, no producen hidrógeno sulfurado, no descarboxilan la lisina, no hidrolizan la urea. Comprende cuatro especies y esta separación se basa en caracteres bioquímicos y antigénicos. Cada especie se subdivide en serotipos: *Sh. dysenteriae* con 13 serotipos; *Sh. flexneri* con 6 serotipos; *Sh. boydii* con 18 serotipos y *Sh. sonnei* con 2 serotipos (INS, 2003).

La shigelosis, está distribuida en todo el mundo, pero es endémica en países tropicales y de clima templado con mayor incidencia en verano. Es causa de infección intestinal aguda en niños pequeños. *Shigella*, tienen como único huésped al ser humano y a los primates. La enfermedad se transmite de persona a persona por la vía fecal - oral o por alimentos, moscas y/o aguas estancadas.

La bacteria es altamente infecciosa por la vía oral, la infección de tan solo 10 a 100 organismos puede producir infección. *Shigella dysenteriae*, produce la forma más severa, con una tasa de letalidad del 20%. En cambio las infecciones por otras shigellas se autolimitan y rara vez son fatales (INS, 2003).

Básicamente la shigellosis tiene dos presentaciones clínicas:

1. Diarrea acuosa asociada con vómitos y una deshidratación de leve a moderada.
2. Disentería caracterizada por pequeños volúmenes de materia fecal con sangre, mucus y dolor abdominal.

La enfermedad tiene un período de incubación de 1 a 7 días, pero lo más frecuente es de 1 a 3 días (INS, 2003).

Están emparentados íntimamente con *Escherichia coli* en cuanto a su homología de su ADN y en cuanto a algunas características bioquímicas y comparten algunos antígenos comunes (ICMSF, 1999).

2.6.3.1. Incidencia y epidemiología. Las shigelas no son habitantes propios del ambiente; provienen del hombre y de los primates superiores en la fase aguda de la enfermedad y son diseminados por los enfermos que tienen síntomas clínicos atípicos durante la convalecencia. La *Shigella* se transmite a través de alimentos contaminados por personas infectadas o determinados ambientes por las moscas que pueden vehicular mecánicamente el microorganismo desde las heces hacia los alimentos. Como consecuencia de un tratamiento inadecuado del agua de bebida o de la filtración de aguas residuales a través de la tierra, el agua se puede convertir en un vehículo de transmisión de *Shigella* (García, 1996).

Las hortalizas crudas, y las frutas por ejemplo, la lechuga y las fresas, pueden diseminar las *Shigella* si se lavan con agua contaminada o se contaminan por medio de las manos sucias. Las moscas contaminadas por contacto con aguas residuales

o con heces pueden llevar shigellas a los alimentos. Los organismos también han sido aislados en la clara de huevo congelada en las cáscaras de huevo en el ambiente de las granjas (ICMSF, 1999).

En incidentes esporádicos de shigelosis transmitidas por alimentos han sido citados como alimentos vehículos: la leche, la ensalada de patatas, el queso blanco, el arroz cocido y la ensalada de hortalizas. Se dice que en los EEUU la ensalada de patatas es un vehículo importante de shigelas. En Yugoslavia han sido incriminados el queso blanco y el agua de bebida contaminada (ICMSF, 1999).

En un examen del estado microbiológico de las hortalizas crudas y en la leche fresca se hallaron Shigelas (ICMSF, 1999).

2.6.3.2. Alimentos implicados: en los países en vías de desarrollo donde las shigelas son frecuentes en las aguas de abastecimiento cualquier alimento crudo que entre en contacto con el agua se convierte en un vehículo potencial de infección (Eley, 1994).

3.6.3.3. Control: los brotes de shigelosis que afectan a toda una comunidad resultan difíciles de controlar a causa de la fácil transmisión persona a persona, especialmente en los niños de corta edad, de los elevados porcentajes de ataques secundarios de la duración de los brotes y de los múltiples puntos de exposición.

La identificación general del problema, es un primer paso importante en el control; otros pasos incluyen la educación, el lavado de las manos y medidas de higiene, tales como la vigilancia del lavado de las manos en los niños antes de comer y después de que hayan defecado. Se puede evitar la contaminación usando utensilios limpios en lugar de las manos, pero el control se consigue mediante la adecuada higiene personal, siendo muy importante el lavado de las manos antes de operar con alimentos. Siempre que sea posible los alimentos no se deben tocar con

las manos. Las personas que están enfermas deben ser excluidas de las zonas en las que se prepara alimentos para el consumo (ICMSF, 1999; García, 1996; Quentín, 1991).

3.6.3.4. Aislamiento: se utilizan medios selectivos y diferenciales como Agar MacConkey, Agar SS, XLD, etc. Las placas se incuban a 37 °C durante 24 horas y se observan las colonias convexas, pequeñas, transparentes e incoloras.

3.6.3.5. Caracterización Bioquímica: la identificación se hace a partir de colonias sospechosas transfiriéndolas con asa de punción al Agar Triple Azúcar Fierro (TSI), Agar Lisina Fierro (LIA) y TSA y se incuban a 37 °C por 18 - 24 horas.

En la boca del tubo con Agar LIA, se coloca la tira de papel (reactivo de Kovacs) para la prueba de indol. La lectura de las reacciones bioquímicas son las siguientes:

- a) TSI: K/A - - , inclinación alcalina (rojo)/ fondo ácido (amarillo), sin producción de hidrogeno sulfurado, ni producción de gas.
- b) LIA: K/A + o - , inclinación alcalina (violeta)/fondo ácido (amarillo), con indol positivo o negativo.

Cuadro N° 3: Diferenciación bioquímica de *Shigella sp.*

Pruebas bioquímicas	<i>Shigella sp.</i>
Indol	Variable
Hidrógeno sulfurado	Negativo
Úrea	Negativo
Citrato	Negativo
Movilidad	Negativo
Lisina decarboxilasa	Negativo
Ornitina decarboxilasa	Positivo
Arginina dehidrolasa	Negativo

Algunos serotipos de *Shigella dysenteriae*, *Sh. flexneri* y *Sh. boydii*, pueden producir gas a partir de glucosa (INS, 2003).

2.7. Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano.

2.7.1. Base legal y técnica.

Base legal:

- La presente norma sanitaria se establece en el marco del Reglamento sobre Vigilancia y Control Sanitario de Alimentos y Bebidas, aprobado por Decreto supremo N° 007-98-SA.

Base técnica

- Principios para el establecimiento y la Aplicación de Criterios Microbiológicos para los Alimentos del *Codex Alimentarius* (CAC/GL-21, 1997).
- Microorganismos de los alimentos y métodos de muestreo para análisis microbiológico: principios y aplicaciones específicas. ICMSF. 2da. Edición. 1999.

2.7.2. Planes de muestreo.

Los planes de muestreo sólo se aplica a lote o lotes de alimentos y bebidas. Se sustentan en el riesgo para la salud y las condiciones normales de manipulación y consumo del alimento, y establece:

a) Categoría de riesgo: Escala relativa al riesgo que representa un alimento y a la manipulación posterior prevista.

b) Componentes del plan de muestreo:

- "n" (minúscula): Número de unidades de muestra requeridas para realizar el análisis, que se eligen separada e independientemente, de acuerdo a normas

nacionales o internacionales referidas a alimentos y bebidas apropiadas para fines microbiológicos.

- "c": Número máximo permitido de unidades de muestra rechazables en un plan de muestreo de 2 clases o unidades de muestra provisionalmente aceptables en un plan de muestreo de 3 clases. Cuando se detecte un número de unidades de muestra mayor a "c" se rechaza el lote.
- "m" (minúscula): Límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable. En general, un valor igual o menor a "m", representa un producto aceptable y los valores superiores a "m" indican lotes rechazables en un plan de muestreo de 2 clases.
- "M" (mayúscula): Los valores de recuentos microbianos superiores a "M" son inaceptables, el alimento representa un riesgo para la salud (MINSA/DIGESA, 2008).

c) Tipos de plan de muestreo para lote o lotes:

- **Plan de 2 clases:** Es un plan de muestreo por atributos, donde puede establecerse únicamente la condición de "aceptable" o "rechazable". Un plan de 2 clases queda definido por "n" y "c";

Para microorganismos patógenos:

Condición de "aceptable" = ausencia

Condición de "rechazable" = presencia

Para otros microorganismos:

Condición de "aceptable" = menor o igual al nivel crítico establecido, "c"

Condición de "rechazable" = mayor al nivel crítico establecido, "c"

- **Plan de 3 clases:** Es un plan de muestreo por atributos que queda definido por "n", "c", "m", "M"; donde se establece:

Condición de "aceptable":

Cuando todas las unidades de muestra presentan recuentos igual o inferiores a "m".

Cuando hasta "c" unidades de muestra pueden tener recuentos entre "m" y "M" (incluido "M").

Condición de "rechazo":

Cuando más de "c" unidades de muestra presentan recuentos entre "m" y "M" (incluido "M"). Cuando al menos 1 de las unidades de muestra presentan recuentos superiores a "M" (MINSA/DIGESA, 2008).

2.7.3. Grupos de microorganismos.

Como referencia para los criterios microbiológicos, en general los microorganismos se agrupan como:

1. - **Microorganismos indicadores de alteración:** las categorías 1, 2, 3 definen los microorganismos asociados con la vida útil y alteración del producto tales como microorganismos aeróbios mesófilos, aerobios mesófilos esporulados, Mohos y Levaduras, Lactobacillus, microorganismos lipolíticos.

2. - **Microorganismos indicadores de higiene:** en las categorías 4, 5, y 6 se encuentran los microorganismos no patógenos que suelen estar asociados a ellos, como Coliformes (que para efectos de la presente norma sanitaria se refiere a Coliformes Totales), *Escherichia coli*, aerobios sulfito reductores, Enterobacteriaceas (a excepción de "Preparaciones en polvo para Lactantes que se considera en el grupo de microorganismos patógenos).

3. - Microorganismos patógenos: son los que se hallan en las categorías 7 a la 15. Las categorías 7, 8 y 9 corresponde a microorganismos patógenos tales como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, cuya cantidad en los alimentos condiciona su peligrosidad para causar enfermedades alimentarias. A partir de la categoría 10 corresponde a microorganismos patógenos, tales como *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli H7 O157* entre otros patógenos, cuya sola presencia en los alimentos condiciona su peligrosidad para la salud (MINSA/DIGESA, 2008).

2.7.4. Reporte de ensayo

Los informes de ensayo, certificados de análisis y otras formas de reporte emitidos por los laboratorios, deberán indicar el método de análisis empleado y la expresión de resultados acorde con el método debe expresarse en: UFC/g, UFC/ml, NMP/g, NMP/ml, NMP/100 ml, ausencia o presencia/25 g ó ml

2.7.5. Criterios Microbiológicos.

Los alimentos y bebidas deben cumplir íntegramente con la totalidad de los criterios microbiológicos correspondientes a su grupo o subgrupo para ser considerados aptos para el consumo humano (MINSA/DIGESA, 2008).

Cuadro N° 4: Criterios Microbiológicos para frutas, hortalizas, frutos secos y similares.

Frutas y hortalizas frescas.(sin ningún tratamiento)						
Agente microbiano	categoría	clase	n	c	Limite por g.	
					m	M
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	2	10 ²	10 ⁻³
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia/25 g

Fuente: MINSA y DIGESA, 2008.

2.8. Estándares nacionales de calidad ambiental para aguas

Cuadro N° 5: Aguas para riego de vegetales y bebidas de animales (Categoría 3).

PARÁMETRO PARA RIEGO DE VEGETALES			
PARÁMETRO	Unidad	Vegetales Tallo Bajo	Vegetales Tallo Alto
		Valor	Valor
Biológicos			
Coliformes termotolerante	NMP/100 ml	1000	2000
Coliformes totales	NMP/100 ml	5000	5000
Enterococos	NMP/100 ml	20	100
<i>Escherichia coli</i>	NMP/100 ml	100	100
Huevos de helmintos	Huevos/litro	<1	<1(1)
<i>Salmonella sp.</i>	Ausencia		Ausencia
<i>Vibrio cholerae</i>	Ausencia		Ausencia

El peruano.2008. Publicado en www.elperuano.com.pe

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO

El río Chacco y los vegetales en estudio están ubicados entre los distritos de Jesús Nazareno y el distrito de Tambillo del departamento de Ayacucho, a 2750 y 2400 m.s.n.m., el primer punto de muestreo está ubicado en la formación del río Chacco (unión del río Alameda y el río Huatatas) y los demás puntos abarcan las comunidades de Santo Domingo, Muyurina y San Miguel de Ayacucho (Ver mapa en anexo 28).

3.2. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE LAS MUESTRAS DE AGUA, *Brassica oleracea* "col" y *Lactuca sativa* "lechuga"

3.2.1. Puntos de muestreo.

Se definieron 10 puntos de muestreo: primer punto (punto cero), 450 m, 900 m, 1350 m 1800 m, 2250 m, 2700 m, 3150 m, 3600 m y 4049 metro. Ubicados cada 450 metros, tomando como referencia desde la formación del río Chacco hasta la unión con el río Yucaes (Ver mapa en anexo 28).

3.2.2. Número de muestras y frecuencia de muestreo.

6 unidad de cada muestra de *Brassica oleracea* "col", *Lactuca sativa* "lechuga" y aguas del río Chacco (1000 ml por muestreo), tomadas al azar en cada puntos de

muestreo, la frecuencia de muestreo se realizó cada 15 días, a partir del mes de julio a octubre del 2010 haciendo un total de 180 muestras (60 por tipo de muestras) (Ver mapa en anexo 28).

3.2.3. Muestreo

Se dispuso de un frasco de vidrio de boca ancha, con tapa hermética, limpio y esterilizado, las muestras fueron recolectados entre las 9 y 12 de la mañana, el volumen final de cada muestra fue de 1000 ml. Seguidamente las muestras fueron acondicionadas en una caja de tecnoport con hielo a una temperatura aproximada de 4 a 10 °C, para su transporte y análisis en el laboratorio de Alimentos del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho.

Se recolectó 1 unidad de cada muestra de *Brassica oleracea*, "col" y *Lactuca sativa* "lechuga" regados con aguas del río Chacco en bolsas de polietileno estéril por separado, tomadas al azar de los 10 puntos de muestreo. Seguidamente las muestras fueron acondicionadas en una caja de tecnoport con hielo a una temperatura aproximada de 4 a 10 °C, para su transporte y análisis en el Laboratorio de Alimentos del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho.

3.2.4. Preparación y dilución de los homogeneizados de las muestras.

3.2.4.1. Se tomó la muestra y se inició el análisis tan pronto como fue posible.

Las muestras fueron preservadas de 4 a 10°C.

3.2.4.2. Se midió 25 ml ó g de muestras en un recipiente estéril.

3.2.4.3. Se colocó la muestra en un frasco de vidrio que contenía 225 ml de agua peptonada, obteniendo la dilución de 10^{-1} .

3.2.4.4. Se realizó la siguiente dilución tomando 10 ml de la dilución 10^{-1} del homogeneizado y se pasó a uno de los blancos de dilución conteniendo 90 ml de agua peptonada (dilución 10^{-2}).

3.2.4.5. Se realizó la siguiente dilución 10^{-3} , tomando 10 ml de la dilución 10^{-2} del homogeneizado y se pasó a uno de los blancos de dilución conteniendo 90 ml de agua peptonada (ICMSF, 2000).

3.2.5. Numeración de Coliformes fecales de las muestras mediante la técnica del Número Más Probable (NMP)

3.2.5.1. De las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} obtenido según el ítem 3.2.4, se pipeteó 1 ml de cada una de las diluciones del homogeneizado de la muestra en 3 tubos (con campanas de Durham) conteniendo Caldo Lauril Sulfato Triptosa.

3.2.5.2. Se incubaron los tubos a 37 °C durante 24 y 48 horas.

3.2.5.3. Se anotó a las 24 horas los tubos que mostraron producción de gas. Se devolvió a la estufa los tubos negativos para su incubación durante 24 horas más.

3.2.5.4. A las 48 horas, se anotó los tubos que mostraron producción de gas.

3.2.5.5. Prueba confirmativa

3.2.5.6. Se tomaron los tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptosa gas positivo, y se procedió a inocular una asa en tubos conteniendo Caldo EC.

3.2.5.7. Se incubaron los tubos con caldo EC a 44.5 ± 0.2 °C y se observaron si son positivos para la formación de gas a las 24 y 48 horas.

3.2.5.8. Para obtener el NMP, se procedió a buscar en la tabla respectiva y se anotó el NMP que corresponda al número de tubos positivos de cada dilución (ICMSF, 2000).

3.2.5.9. Se multiplicó por 100 el NMP de coliformes fecales para muestras del agua del río Chacco para reportar el resultado en NMP/100 ml

3.3. Aislamiento e identificación de Salmonella a partir de las muestras.

3.3.4. Enriquecimiento no selectivo de *Salmonella*

- 3.3.4.1. Se pesó 25 g o 25 ml de la muestra y se añadió a 225 ml de Caldo Lactosa con el cual se lavó utilizando para ello un frasco de boca ancha y una pinza estéril.
- 3.3.4.2. Se homogeneizó y se incubó a 37 °C por 24 horas (preeenriquecimiento).

3.3.5. Enriquecimiento selectivo de *Salmonella*

- 3.3.5.1. Se pipeteó 1 ml de la muestra preenriquecida a un tubo conteniendo 10 ml de Caldo Selenito Cisteína. Se incubó a 37 °C durante 24 horas.

3.3.6. Siembra en placas en medios de agar selectivo para *Salmonella*

- 3.3.6.1. Al cabo de este tiempo, se sembró por estrías y agotamiento el contenido de cada tubo enriquecido sobre una placa Petri con agar *Salmonella - Shigella* (SS).
- 3.3.6.2. Se incubó a 37°C durante 24 horas.
- 3.3.6.3. Se examinó la placa para ver si contenía colonias típicas de *Salmonella*.

3.3.7. Identificación de *Salmonella*

- 3.3.7.1. Se realizó las pruebas bioquímicas eligiendo las colonias típicas (son pequeñas y translúcidas, con producción de Hidrógeno Sulfurado) o sospechosas y se aislaron en agar nutritivo y luego se realizaron las pruebas de TSI, LIA, Indol, SIM, Citrato y agar úrea (ICMSF 2000).
- 3.3.7.2. Se envió las cepas al INS al área de Enteropatógenos para su confirmación y serotipificación.

3.4. Aislamiento e identificación de *Shigella* a partir de las muestras.

3.4.4. Enriquecimiento no selectivo de *Shigella*

- 3.4.4.1. Se pesó 25 g o 25 ml de las muestras y se añadió a 225 ml de Caldo Lactosa con el cual se procedió al lavado utilizando para ello un frasco de boca ancha y una pinza estéril.
- 3.4.4.2. Se homogeneizó y se incubó a 37 °C por 24 horas.

3.4.5. Siembra en placas en medios de agar selectivo para *Shigella*

- 3.4.5.1. Se prepararon placas con medio selectivo agar *Salmonella - Shigella*.

3.4.5.2. Se sembró por estrías y agotamiento la muestra enriquecido sobre agar *Salmonella - Shigella* (SS).

3.4.5.3. Se incubaron las placas a 37 °C durante 24 horas.

3.4.5.4. Si se ha producido el crecimiento esperado, se seleccionaron tres colonias sospechosas de cada uno de los medios sólidos selectivos.

3.4.6. Identificación de *Shigella*

3.4.6.1. Se realizó las pruebas bioquímicas eligiendo las colonias típicas (las colonias son pequeñas, convexas, transparentes e incoloras) o sospechosas y se aislaron en agar nutritivo y luego se realizaron las pruebas de TSI, LIA, Indol, SIM, Citrato y agar úrea (ICMSF 2000).

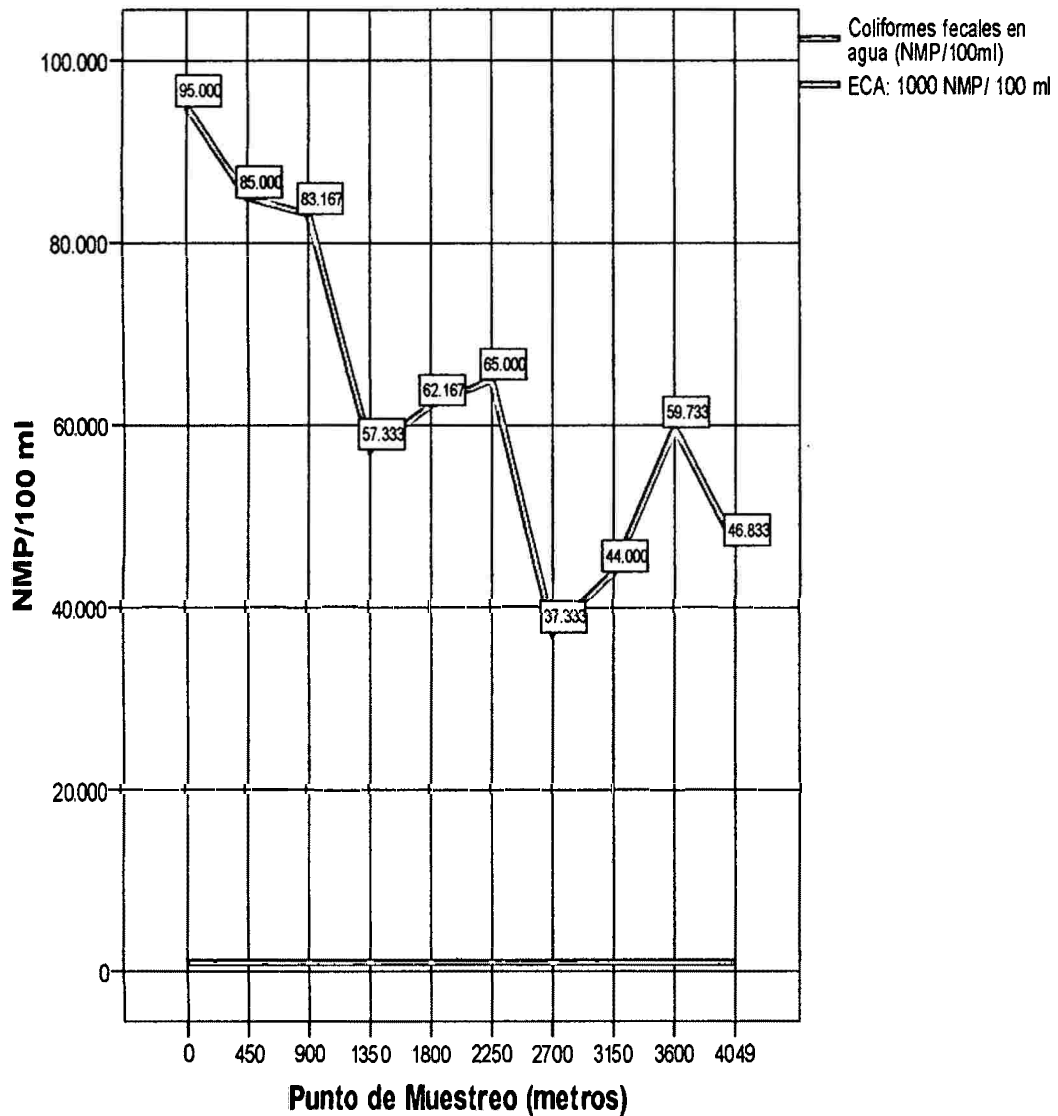
3.4.6.2. Se envió las cepas al INS al área de Enteropatógenos para su confirmación y serotipificación

4. Análisis estadístico:

Los resultados se reportaron en tablas de porcentajes y frecuencias para evidenciar en forma clara y facilitar la interpretación respectiva.

En la investigación se utilizó el análisis de varianza y la prueba de Kruskal – Wallis para estudiar la variación de coliformes fecales en los 10 puntos de muestreo tanto en aguas del río Chacco y los vegetales en estudio, considerando como significativo un $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS



Prueba de Kruskal – Wallis: Chi cuadrado para coliformes fecales en agua del río Chacco: 9,912; gl: 9; Sig.:0.358

Media total de coliformes fecales en agua del río Chacco: 63×10^3 NMP/100 ml

Gráfico N° 1: Número Más Probable de coliformes fecales cuantificados en los diez puntos de muestreo en agua del río Chacco, julio a octubre del 2010.

Cuadro N° 6: Contaminación del río Chacco con *Salmonella sp.* y *Shigella sp.* aisladas en los diferentes puntos de muestreo, julio a octubre del 2010.

Puntos de muestreo	<i>Salmonella sp.</i>						<i>Shigella sp.</i>					
	Presencia			Ausencia			Presencia			Ausencia		
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
0.00 m	1	16.7	5	83.3	1	16.7	5	83.3	1	16.7	5	83.3
450 m	1	16.7	5	83.3	1	16.7	5	83.3	1	16.7	5	83.3
900 m	1	16.7	5	83.3	0	0	5	100	0	0	6	100
1350 m	0	0	6	100	0	0	6	100	0	0	6	100
1800 m	0	0	6	100	0	0	6	100	0	0	6	100
2250 m	0	0	5	100	1	16.7	5	83.3	1	16.7	5	83.3
2700 m	0	0	6	100	0	0	6	100	0	0	6	100
3150 m	0	0	6	100	0	0	6	100	0	0	6	100
3600 m	0	0	6	100	0	0	6	100	0	0	6	100
4049 m	0	0	6	100	0	0	6	100	0	0	6	100
TOTAL	3	5	57	95	3	5	57	95	3	5	57	95

Cuadro N° 7: Especies de *Shigella* y *Salmonella* aisladas en las aguas de río Chacco, julio a octubre del 2010.

<i>Shigella sp.</i>		<i>Salmonella sp.</i>	
Punto de muestreo	especie	Punto de muestreo	especie
0.0m	<i>Shigella sp.</i>	0.0m	<i>Salmonella enteritidis</i>
450 m	<i>Shigella flexneri 2a</i>	450m	<i>Salmonella enteritidis</i>
2250m	<i>Shigella flexneri 2a</i>	900m	<i>Salmonella typhi</i>

Cuadro N° 8: Número Más Probable (NMP) de coliformes fecales en *Lactuca sativa* "lechuga" y *Brassica oleracea* "col", clasificados según el criterio microbiológico para hortalizas frescas (categoría 5 y clase 3), julio a octubre del 2010.

Puntos de muestreo	Lactuca sativa										Brassica oleracea													
	Promedio de NMP de coliformes fecales (<i>E. coli</i>)		Presencia de coliformes fecales (<i>E. coli</i>)		Ausencia de coliformes fecales (<i>E. coli</i>)		Criterio microbiológico						Promedio de NMP coliformes fecales (<i>E. coli</i>)		Presencia de coliformes fecales (<i>E. coli</i>)		Ausencia de coliformes fecales (<i>E. coli</i>)		Criterio microbiológico					
	NMP/g	N°	%	N°	%	N°	%	c	c (1)	m	M	NMP/g	N°	%	N°	%	C	m	M					
0,00 m	2x10 ²	6	100	0	0	0	0	1	0	-	Rechazable	1.7x10	3	50	3	50	0	0	0	0				
450 m	1.8 x10 ²	3	50	3	50	1	0	1	0	-	Rechazable	1	1	16.7	5	83.3	0	0	0	0				
900 m	1.8 x10	3	50	3	50	0	0	0	0	Acceptable	-	0.7	1	16.7	5	83.3	0	0	0	0				
1350 m	4.1 x10 ²	5	83.3	1	16.7	2	1	2	1	-	Rechazable	1.5x10	2	33.3	4	66.7	0	0	0	0				
1800 m	3	3	50	3	50	0	0	0	0	Acceptable	-	0.7	1	16.7	5	83.3	0	0	0	0				
2250 m	1.9x10 ²	3	50	3	50	1	0	1	0	-	Rechazable	3	1	16.7	5	83.3	0	0	0	0				
2700 m	2.2x10 ²	5	83.3	1	16.7	1	1	1	1	-	Rechazable	3	1	16.7	5	83.3	0	0	0	0				
3150 m	7.6x10	5	83.3	1	16.7	0	2	0	2	Acceptable	-	0.7	1	16.7	5	83.3	0	0	0	0				
3600 m	3.2x10	5	83.3	1	16.7	0	0	0	0	Acceptable	-	2	2	33.3	4	66.7	0	0	0	0				
4049 m	5.4x10	5	83.3	1	16.7	0	1	0	1	Acceptable	-	3.7x10 ²	4	66.7	2	33.3	2	0	0	0				
TOTAL	1.4x10 ²	43	71.7	17	28.3	-	-	-	-	5	5	4.1x10	17	28.3	43	71.7	-	-	9	1				

C₍₁₎: recuento superiores a 10³ NMP/g

c: Número máximo permitido de unidades de muestra rechazables entre m y M, Incluido M =2

m: Limite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable= 10² NMP/g

M: Recuentos microbianos superiores a "M" son rechazables = 10³ NMP/g

Prueba Kruskal – Wallis, Chi cuadrado para coliformes fecales en *Lactuca sativa*: 12.314; gl: 9; Sig: 0.196

Prueba Kruskal – Wallis, Chi cuadrado para coliformes fecales en *Brassica oleracea*: 10.346; gl: 9; Sig: 0.323

Ver anexo 15 para observar el número de muestras analizadas con sus respectivos valores del NMP de coliformes fecales/ g de los vegetales en estudio.

Cuadro N° 9: Nivel de contaminación con *Salmonella sp.* en *Lactuca sativa* "lechuga" y *Brassica oleracea* "col", según el criterio microbiológico para hortalizas frescas (categoría 10 y clase 2), julio a octubre del 2010.

Puntos de muestreo	<i>Lactuca sativa</i> "lechuga"						<i>Brassica oleracea</i> "col"						
	Presencia/ 25 g		Ausencia/ 25 g		Criterio microbiológico		Presencia/ 25 g		Ausencia/ 25 g		Criterio microbiológico		
	N°	%	N°	%	m	M	N°	%	N°	%	m	M	
0.00 m	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	6	100	0	Acceptable
450 m	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	6	100	0	Acceptable
900 m	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	6	100	0	Acceptable
1350 m	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	6	100	0	Acceptable
1800 m	1	16.7	5	83.3	1	-	Rechazable	0	0	6	100	0	Acceptable
2250 m	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	6	100	0	Acceptable
2700 m	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	6	100	0	Acceptable
3150 m	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	6	100	0	Acceptable
3600 m	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	6	100	0	Acceptable
4049 m	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	6	100	0	Acceptable
TOTAL	1	1.7	59	98.3	-	-	-	0	0	60	100	-	-

c: Número máximo permitido de unidades de muestra rechazables =0

m: Límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable= Ausencia/ 25 g

M: Recuentos microbianos superiores a "M" son inacceptables = Presencia/ 25 g

Cuadro N° 10: Nivel de contaminación con *Shigella* sp. en *Lactuca sativa* "lechuga" y *Brassica oleracea* "col", según el criterio microbiológico para hortalizas frescas (categoría 10 y clase 2), julio a octubre del 2010.

Puntos de muestreo	<i>Lactuca sativa</i> "lechuga"						<i>Brassica oleracea</i> "col"											
	Presencia/ 25 g			Ausencia/ 25 g			Criterio microbiológico			Presencia/ 25 g			Ausencia/ 25 g			Criterio microbiológico		
	N	%		N	%		c	m	M	N	%		N	%		c	m	M
0.00 m	0	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	-
450 m	0	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	-
900 m	1	16.7	5	83.3	1	-	Rechazable	Rechazable	0	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	-
1350 m	1	16.7	5	83.3	1	-	Rechazable	Rechazable	0	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	-
1800 m	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	-	
2250 m	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	-	
2700 m	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	-	
3150 m	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	-	
3600 m	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	-	
4049 m	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	0	0	6	100	0	Acceptable	-	0	-	
TOTAL	2	3.3	58	96.7	-	-	-	-	0	0	0	60	100	-	-	-	-	

c: Número máximo permitido de unidades de muestra rechazables = 0

m: Límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable = Ausencia/ 25 g

M: Recuentos microbianos superiores a "M" son inaceptables = Presencia/ 25 g

Cuadro N° 11: Especies de *Shigella* y *Salmonella* aisladas en *Lactuca sativa* "lechuga", julio a octubre del 2010.

<i>Shigella sp.</i>		<i>Salmonella spp.</i>	
Punto de muestreo	especie	Punto de muestreo	especie
900m	<i>Shigella sp.</i>	1800m	<i>Salmonella spp.</i>
1350m	<i>Shigella flexneri 2a</i>		

V. DISCUSIÓN

En el Gráfico N° 1 se observa el Número Más Probable de coliformes fecales cuantificados en los diez puntos de muestreo en agua del río Chacco durante los meses de julio a octubre del 2010. De un total de 60 muestras de agua analizadas el 100% de ellas superan el valor máximo permitido en aguas para riego de vegetales y bebida de animales (aguas de categoría 3), cuantificándose en los puntos: primer punto (punto cero), 450 m, 900 m, 1350 m 1800 m, 2250 m, 2700 m, 3150 m, 3600 m y 4049 metros los valores de 95×10^3 , 85×10^3 , 83×10^3 , 57×10^3 , 62×10^3 , 65×10^3 , 37×10^3 , 44×10^3 , 59×10^3 y 47×10^3 NMP de coliformes fecales/100 ml respectivamente, con una media total de 63×10^3 NMP de coliformes fecales/100 ml, siendo la prueba no significativo para la variación de coliformes fecales en los puntos de muestreo. La calidad de higiene del agua no cumple con las normas técnicas peruanas donde establecen $<10^3$ NMP/100 ml de BCF (bacterias coliformes fecales) para ser consideradas aguas de categoría 3 establecido en los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua, aprobado por el Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM, estos resultados reflejan la deficiente calidad de agua que se utiliza para el riego de los cultivos. Nuestros

resultados se deben a la contaminación de las aguas del río Alameda siendo este un río superficial en la que desembocan las aguas deficientemente tratadas de la PTAR "La Totorá", las actividades antropogénicas existente en las orillas de este río y río Huatatas. Al respecto Chuchón y Aybar, (2005) mencionan que la capacidad de remoción de BCF (bacterias coliformes fecales) de la PTAR "La Totorá" fue del 99.9850%, evacuando efluentes con una cantidad en promedio de $1,29 \times 10^5$ NMP/100 ml, siendo deficiente, pues para alcanzar una cantidad promedio de $<10^3$ NMP/100 ml de BCF, se requiere que la PTAR tenga una capacidad de remoción del orden del 99.9999% por lo tanto Las aguas efluentes de la PTAR "La Totorá" aún no pueden ser consideradas como agua de categoría 3 (para riego de vegetales y bebida de animales) de acuerdo a lo establecido en los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua. Morales, (2001) quien también realizó un trabajo sobre la contaminación microbiológica en la micro cuenca del río Alameda indica, que en su último punto de muestreo a 200 metros después, que el efluente "La Totorá" descarga sus aguas servidas y determinó la contaminación de 18.878×10^6 /100 ml de coliformes fecales. Al respecto Aronés, (2001) menciona que en la quebrada de Chaquihuaycco que cruza la ciudad de Ayacucho opera como canal de conducción de desagüe que corresponde a las aguas servidas de 318 viviendas que se ubican en sus márgenes con una población total de 1654 personas y que descargan esta agua sobre el río Alameda.

Guardia, (2001) en su trabajo investigación sobre coliformes fecales en el río Yucaes menciona que en la zona de río arriba (769.13 NMP/100ml) presenta menor concentración con un incremento para la zona río abajo (956.50 NMP/100 ml) altura de la comunidad de Muyurina donde la actividad antropogénica es mayor, contaminando aun más el río Chacco ya que en el desemboca sus aguas.

Tinco, (2005) en su trabajo de investigación realizado en Huanta menciona que la capacidad de remoción de coliformes fecales en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Ichpico es de 99.98215%.

Otros trabajos realizados por Narváez y col. en 2008 determinan en Ciénaga Grande de Santa Marta es el sistema lagunar costero más grande e importante de Colombia y el más extenso del Caribe. En su territorio se alojan siete poblaciones carentes de un sistema de saneamiento básico adecuado, que vierten sus desechos sin ningún tipo de tratamiento directamente a la ciénaga. En el que se determinaron las concentraciones de Coliformes termotolerantes en la época seca mayor de cada año (7.800-9.000 NMP/ 100 mL) y los menores niveles en la estación Buenavista (2-1.100 NMP/100mL). Teniendo en cuenta que constituye una fuente potencial de riesgo para el desarrollo de las actividades económicas de la zona y para la salud de los pobladores.

Marchán y Méndez, (2007) mencionan que en el Perú, a fines de 2007, el 63,6% de la población urbana total tuvo servicio de alcantarillado administrado por Empresas Prestadoras de Servicios de Saneamiento (EPS); el resto fue administrado directamente por las municipalidades o a través de Operadores Especializados (OES) en pequeñas ciudades, comités de agua o simplemente no cuenta con dicho servicio. Durante ese año los sistemas de alcantarillado recolectaron aproximadamente 747,3 millones de metros cúbicos de aguas residuales, producto de las descargas de los usuarios conectados al servicio. De ese volumen, sólo 29,1% ingresaron a un sistema de tratamiento de aguas residuales, muchos de los cuales con deficiencias operativas y de mantenimiento, y el resto se descargó directamente a un cuerpo de agua (mar, ríos o lagos), se infiltró en el suelo o se usó clandestinamente para fines agrícolas, Es decir, al menos 530

millones de metros cúbicos de aguas residuales pasaron a contaminar los cuerpos de agua superficial que se usan para la agricultura, pesca, recreación e incluso para el abastecimiento de agua potable.

En el cuadro N° 6 se observa la contaminación del río Chacco con *Salmonella sp.* y *Shigella sp.* aisladas en los diferentes puntos de muestreo, en el periodo comprendido entre los meses de julio a octubre del 2010. De un total de 60 muestras de agua analizadas el 5% tanto para *Salmonella sp.* y *Shigella sp.* Superan lo permisible en aguas para riego de vegetales y bebida de animales (aguas de categoría 3), llegándose a determinar la presencia de *Salmonella sp.* en los puntos de muestreo a 0.00 (primer punto), 450 m y 900 m y la presencia de *Shigella sp.* en los puntos de muestreo a 0.00 (primer punto), 450 m y 2250 m que nos indica que la calidad de higiene del agua no cumple con las normas técnicas peruanas donde establecen la ausencia de *Salmonella* y *Shigella* para ser consideradas aguas de categoría 3 de acuerdo a lo establecido en los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua, aprobado por el Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM.

En el cuadro N° 7 se observa especies de *Shigella* y *Salmonella* aisladas en las aguas de río Chacco, en el periodo comprendido entre los meses de julio a octubre del 2010. Llegándose a aislar *Shigella sp.* en el punto 0.0 , *Shigella flexneri* 2a en los puntos 450 m y a 2250 m; *Salmonella enteritidis* a 0.0 m y a 450 m, *salmonella typhi* a 900 m, estos resultados superan lo permisible que es la ausencia en aguas para riego de vegetales de consumo crudo y bebida de animales (aguas de clase III), siendo la calidad de esta agua inadecuadas para estos usos, ya que estos patógeno no debe estar presente en cuerpos de aguas destinadas a la bebida de animales (Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua, aprobado por

el Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM), porque es un patógeno altamente contaminante.

Al respecto Agurto, (2009) menciona que las salmonelas han sido identificados en animales y algunos alimentos que están expuestos a contaminación con aguas residuales. Las salmonelas sobreviven más de 28 días a 2-4 °C y aproximadamente la mitad de ese tiempo a temperatura ambiente, encontrando en hortalizas, que incluían judías verdes, remolacha, col, apio, lechuga, tomates y pueden transmitir salmonelas, especialmente *S. typhi* (Feachem et al., 1983). El marisco y los berros recolectados en aguas contaminadas con aguas residuales también han actuado como vehículos de salmonelas.

EPA, (1993) menciona que la *Shigella* tiene una máxima supervivencia en el agua de 30 días.

Cabrera y col, (2005) mencionan que en cuanto a las especies de *Shigella*, han ocurrido cambios en la epidemiología; en regiones industrializadas la *Sh. dysenteriae* fue primero reemplazada por *Shigella flexneri* y luego por *Shigella sonnei* que es la más frecuente actualmente, en regiones en desarrollo *Sh. flexneri* es la más frecuente, y que pueden causar bacteriemia.

En el Cuadro N° 8 se observa el Número Más Probable (NMP) de coliformes fecales en *Lactuca sativa* "lechuga" y *Brassica oleracea* "col" regados con aguas del río Chacco, clasificados según los criterios microbiológicos para hortalizas frescas (categoría 5 y clase 3), en el periodo comprendido entre los meses de julio a octubre del 2010, llegándose a determinar en *Lactuca sativa* de un total de 60 muestras analizadas el 71.7% de ellas están contaminados con coliformes fecales, con un promedio total de 1.4×10^2 NMP de coliformes fecales por gramo de muestra, llegándose a rechazar 5 lotes (puntos de muestreo) ya que superan los límites por

gramo según las normas sanitarias. En *Brassica oleracea* de un total de 60 muestras analizadas el 28.3% están contaminados con coliformes fecales, con un promedio de 4.1×10 NMP de coliformes fecales/g de muestra, llegándose a rechazar un lote ya que supera el límite por gramo según las normas sanitarias (Ver anexo 15 para observar el número de muestras analizadas con sus respectivos valores del NMP de coliformes fecales/gen cada punto de muestreo). Estas normas sanitarias que establecen los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano aprobado con Resolución Ministerial N° 591-2008/MINSA, NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01. Según la norma para las hortalizas frescas sin ningún tratamiento el límite por gramo aceptable es de 10^2 NMP de coliformes fecales/g (*E. coli*) y como número máximo permitido de unidades de muestra rechazables entre m y M, incluido M es 2 muestras y rechazables mayor a 10^3 NMP de coliformes fecales/g (*E. coli*) ya que representan un riesgo para la salud, la variación de coliformes fecales no es significativa para la lechuga y la col. Al respecto Pillaca, (1998) coincide con nuestros resultados ya que realizó en Ayacucho una investigación sobre el grado de contaminación y reporta que el 100% de de las verduras provenientes de Totorilla y Compañilla están contaminadas con coliformes fecales. García, (2000) también realizó un trabajo de investigación de 45 muestras de lechugas provenientes de del valle de Totorilla, Muyurina y Chacco, 41 muestras (91%) presentan un alto grado de contaminación por bacterias coliformes totales.

Nalvarte, (2002) después de una investigación en los mercados de abastos de la ciudad de Huanta menciona que el 92% de las muestras de lechuga y 64% de las muestras de col están contaminados con coliformens fecales, y menciona que estos cultivos son regados con aguas de provenientes de la PTAR "Ichpico". Como

se sabe la capacidad de remoción de coliformes fecales en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Ichpico - Huanta es de 99.98215%, según Tinco, (2005).

Rivera y col. en 2009 determinaron el nivel de coliformes fecales y la frecuencia de *Escherichia coli* en 85 muestras de hortalizas, obtenidas de manera aleatoria y expandidas en los principales mercados de Cajamarca. El procesamiento, aislamiento e identificación bacteriana se realizó según la *Food and Drug Administration* (FDA). El 40% de muestras presentaron coliformes fecales, con elevado número más probable por gramo (NMP/g) e importante frecuencia de *E. coli* en perejil y lechuga. El análisis revela un alto nivel de contaminación fecal, un estado sanitario inaceptable y la necesidad de establecer medidas de control frente al riesgo que esto representa para la salud.

Otro trabajo realizado por Vega y col. en 2004 en los estudios realizados en Xochimilco donde se cultivan hortalizas regadas con agua residual sin tratar presentar bacterias de origen fecal, lo que las convierte en una fuente de transmisión de diarrea de origen bacteriano. Se determinó que la mayor cantidad de coliformes fecales se presentaron en epazote, espinaca, cilantro, zanahoria y lechuga escarola, en cantidades que superaron el valor permitido para este tipo de alimentos.

En el cuadro N° 9 se observa el nivel de contaminación con *Salmonella sp.* en *Lactuca sativa* "lechuga" y *Brassica oleracea* "col", según el criterio microbiológico (categoría 10 y clase 2) para hortalizas frescas, en el periodo comprendido entre los meses de julio a octubre del 2010, donde de un total de 60 muestras de *Lactuca sativa* analizadas el 1.7% de ellas supera el límite establecido que es la ausencia de *Salmonella* en 25 g de muestra, rechazando un lote ya que no cumple con las normas sanitarias que establecen los criterios microbiológicos de

calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano aprobado con Resolución Ministerial N° 591-2008/MINSA, NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01. En *Brassica oleracea* "col" si cumple con las normas sanitarias ya que no se aislaron *Salmonella*. Al respecto este trabajo no coincide con realizado por Pastor, (1995) quien realizó un trabajo sobre hortalizas regadas con aguas servidas parcialmente tratadas por la PTAR "La Totorá", donde encontró que el 48.3% de la lechuga y 38.3% de la col están contaminadas con *Salmonella*.

Nalvarte, (2002) en su trabajo de investigación realizado en Huanta menciona que las lechugas analizadas está contaminadas con un 18% con *Salmonella* y en caso de col con un 06%.

En el cuadro N° 10 se observa el nivel de contaminación con *Shigella sp.* en *Lactuca sativa* "lechuga" y *Brassica oleracea* "col", según el criterio microbiológico (categoría 10 y clase 2) para hortalizas frescas, en el periodo comprendido entre los meses de julio a octubre del 2010, donde de un total de 60 muestras de *Lactuca sativa* analizadas el 3.3 % presentan shigellas. Al considerar que es un microorganismo patógeno y cuya sola presencia en los alimentos condiciona su peligrosidad para la salud se llega a rechazar dos lote ya que no cumple con las normas sanitarias que establecen los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano aprobado con Resolución Ministerial N° 591-2008/MINSA, NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01. *Brassica oleracea* "col" si cumple con las normas sanitarias ya que no se aislaron *Shigella*. Al respecto estos resultados son respaldados por Nalvarte, (2002) que de un total 50 muestras de lechuga en 03 muestras (6%) se detectaron presencia de *Shigella*. En cambio en la col 02 muestras (04%) demostraron presencia de *Shigella*.

Pastor, (1995) en Ayacucho detectó la presencia de *Shigella* en hortalizas como lechuga, apio y col. A diferencia de Carhuarupay (1994), en Cusco demostró no haber encontrado en absoluto *Shigella*.

En el cuadro N° 11 se observa especies de *Shigella* y *Salmonella* aisladas en *Lactuca sativa* "lechuga", en el periodo comprendido entre los meses de julio a octubre del 2010. Llegándose a aislar *Shigella sp.* a 900 m, *Shigella flexneri 2a* a 1350 m; *Salmonella spp.* a 1800 m, según Resolución Ministerial N° 591-2008/MINSA, NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01, estas cepas no deben estar presentes ya que son microorganismos patógenos que ponen en riesgo la salud de la población. Al respecto García, (1994) menciona que las shigelas tienen como único hospedero al hombre y a los primates, y que la enfermedad se transmite de persona a persona por vía fecal oral, por alimento, moscas o aguas contaminados.

Según el INS, (2005) la salmonellosis es una zoonosis de distribución mundial, es una enfermedad de origen alimentario, siendo los alimentos contaminados al principal modo de transmisión.

VI. CONCLUSIONES

1. El nivel de contaminación del agua del río Chacco, *Lactuca sativa* "lechuga" y *Brassica oleracea* "col" por coliformes fecales es 100%, 71.7% y 28.3%; por *Salmonella* es de 5%, 1.7% y 0%; y por *Shigella* es de 5%, 3.3% y 0%, respectivamente.
2. Se determinó en las aguas del río Chacco la presencia de *Salmonella enteritidis* en el primer punto y a 450 m, *Salmonella typhi* a 900 m, *Shigella sp* en el primer punto (0,00 m), *Shigella flexneri 2a* a 450 m y 2250 m; en *Lactuca sativa* "lechuga" se determinó la presencia de *Shigella sp.* a 900 m, *Shigella flexneri 2a* a 1350 m y *Salmonella spp.* a 1800 m; en *Brassica oleracea* "col" no se aisló *Salmonella* y *Shigella*.
3. La contaminación del agua del río Chacco, por coliformes fecales presentan una media total de 63×10^3 NMP de coliformes fecales / 100 ml; en *Lactuca sativa* "lechuga" y *Brassica oleracea* "col" presentaron una media total 1.4×10^2 y 4.1×10 NMP de coliformes fecales / g de muestra respectivamente.
4. La variación del número más probable de coliformes fecales en aguas del río Chacco, *Lactuca sativa* y *Brassica oleracea*, en cada punto de muestreo no es significativo.

VII. RECOMENDACIONES

1. Implementar en el tratamiento terciario la cloración u otro tipo de desinfección para reducir la carga bacteriana en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales "La Totorá".
2. Informar a las autoridades del distrito de Tambillo, distrito de Jesús Nazareno, a las comunidades de Muyurina y Chacco sobre los resultados del presente trabajo para que exijan la cloración en el tratamiento terciario de los efluentes de la PTAR "La Totorá".
3. Que la Dirección Regional de Educación y de Salud ejecuten programas integrales de educación ambiental y sanitaria a la población y en especial en las personas que viven a las riberas de los ríos Chacco, Alameda y Huatatas.
4. La Universidad y las instituciones públicas y privadas debe impulsar trabajos de investigación para determinar las especies y serotipos de enteropatógenos y así contribuir en el bienestar y desarrollo de las comunidades de la región.
5. La Dirección Regional de Saneamiento Ambiental de Ayacucho debe ejecutar un estricto y eficiente control de la calidad de los efluentes de la PTAR "La totora" y de aguas del río Chacco.

6. El ministerio de agricultura debe ejecutar un estricto y eficiente control de los reglamentos sobre vigilancia y control sanitario de alimentos y bebidas, establecido según el DS N° 007-98-SA.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Agurto, T. 2009. Microbiología: bioquímica bacteriana, enterobacteriaceae. Universidad Ricardo Palma, Perú.
2. Andía, V. 1994. Guía de prácticas: Control Microbiológico de los Alimentos. Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH. Ayacucho-Perú.
3. Aronés, E. 2001. Diagnóstico y Manejo Ambiental en la Provincia de Huamanga, Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia. Tesis. UNSCH. Ayacucho – Perú.
4. Brock, T., Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. 2001. Biología de los Microorganismos, Octava Edición. Editorial Prentice - Hall. España.
5. Brock, T. y Madigan, M. 1993. Microbiología. Cuarta Edición. Editorial Prentice - Hall Hispanoamericana S.A. México.
6. Cabrera C, Purizaca R, León A, Celis J. Sepsis por *Shigella flexneri*. Rev Perú Med Exp Salud Pública 2005; 22(2): 145-46.
7. Chuchón, S. y Aybar, C. 2008. Evaluación de la Capacidad de Remoción de Bacterias Coliformes Fecales y Demanda Bioquímica de Oxígeno de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”, Ayacucho – Perú.
8. Dirección Regional de Saneamiento Ambiental (DIGESA). 2008. diagnóstico situacional de los sistemas de tratamiento de aguas residuales en las EPS del Perú y propuestas de solución. Perú.
9. El Peruano. 2008. Ley General del Ambiente (DS.002-2008-MINAM). Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua. Lima.
10. Eley, A. 1994. Intoxicación Alimentaria de Etiología Microbiana. Editorial Acribia S.A. Zaragoza.
11. EPA. 1993. Previniendo Enfermedades Propagadas por el Agua, un enfoque en la investigación del EPA. Agencia para la Protección del Ambiente de Los Estados Unidos. Estados Unidos.
12. Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A. 2004. Diagnóstico Microbiológico. Undécima Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Argentina.

13. Frazier, W. y Westhoff, D. 1993. Microbiología de los alimentos. Cuarta Edición, Editorial Acribia S.A. Zaragoza.
14. García, R. 1996. Microbiología Médica. Tercera Edición. Editorial MOSBY. Madrid - España.
15. García, O. 1994. Protocolo práctico de pediatría. Ediciones DOYMA. Barcelona - España.
16. García, V. 2000. Evaluación de la Calidad Microbiológica de las Lechugas de Consumo Humano Expendidos en los Mercados de Abasto de la ciudad de Ayacucho. V Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Huancayo – Perú.
17. Granados, R. 1997. Microbiología. Editorial paraninfo. Madrid- España.
18. Guardia, D. 2007. Capacidad fisicoquímica, microbiológico y macroinvertebrados bentónicos del río yucaes. Tesis. UNSCH. Ayacucho - Perú.
19. Hazelwood, D., Molean, A. 1994. Curso de higiene para manipuladores de alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza - España.
20. ICMSF. 1996. International Comision on Microbiological Specificatios for Foods. Editorial Acribia S.A. Zaragoza - España.
21. ICMSF. 1999. International Comision on Microbiological Specificatios for Foods. Editorial Acribia S.A. Zaragoza - España.
22. ICMSF. 2000. International Comision on Microbiological Specificatios for Foods, of the International Union of Microbiological Societies, segunda edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza - España.
23. INS. 2003. Guía de procedimiento de laboratorio para diagnóstico de *Salmonella*, *Shigella* y otros enteropatógenos bacterianos. Instituto Nacional de Salud. Perú.
24. INS. 2005. Guía de procedimiento de laboratorio para diagnóstico de *Salmonella*, *Shigella* y otros enteropatógenos bacterianos. Instituto Nacional de Salud. Perú.
25. Jay, J. 1994. Microbiología moderna de los alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza - España..

26. Marchán, J y Méndez, J. 2008. Diagnóstico Situacional de los Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales en las EPS del Perú y Propuestas de Solución. SUNASS. Lima.
27. MINSA/DIGESA. 2008. "Normas sanitarias que establecen los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano". Perú.
28. Monge, C. 1992. Presencia de parásitos y bacterias intestinales en hortalizas que se consumen crudas en costa rica. Departamento de control de alimentos. Ministerio De Salud. San Jose De Costa Rica.
29. Morales, M. 2001. Evaluación de la contaminación microbiológica en la microcuenca del río alameda y el efecto contaminante de sus efluentes en época de estiaje. Tesis. UNSCH. Ayacucho– Perú.
30. Nalvarte, E. 2002. Calidad Bacteriológica de la *Lactuca sativa* "lechuga" y *Brassica oleraceae* "col" Comercializada en el Mercado de Abasto de la Ciudad de Huanta. Tesis. UNSCH. Ayacucho– Perú.
31. Narváez S, Gómez M, Acosta A. Coliformes termotolerantes en aguas de las poblaciones costeras y palafíticas de la ciénaga grande de santa marta, Colombia. *Acta biol. Colomb* 2008; 13 (3): 113 – 122.
32. Pastor, R. 1995. *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella* en hortalizas regadas con aguas servidas parcialmente tratadas procedentes de la Poza de Oxidación de la Totorilla. Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH. Ayacucho– Perú.
33. Pillaca, E. 1998. Grado de contaminación de las verduras provenientes del valle de "La Totorilla" y Compañía. Tesis. UNSCH. Ayacucho - Perú.
34. Quentin, N. 1991. Bacteriología y Micología Médica, Segunda Edición. Editorial interamericana. McGraw Hill S.A. de C. México.
35. Remes, A. 1997. Sistema integrador de aseguramiento de la calidad de los alimentos. Editorial. AGT EDITOR SA. México.
36. Rivera J, Rodriguez U, Lopez O. Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, peru. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* 2009; 26(1): 45-48.
37. Tinco, V. 2005. Capacidad de Remoción de Coliformes Totales, Coliformes Fecales y demanda Bioquímica de oxígeno (DBO₅) de la planta de tratamiento de aguas residuales Ichpico – Huanta. Tesis. UNSCH. Ayacucho– Perú.

38. Vega M, Jiménez M, Salgado R, Pineda G. Determinación de bacterias de origen fecal en hortalizas cultivadas en Xochimilco de octubre de 2003 a marzo de 2004. Invest Univ Multidisciplinaria. 2005; 4(4): 21-25.
39. Fundación Wikipedia. Enciclopedia libre (página de internet). fecha de acceso: diciembre 2011. disponible en:
http://es.wikipedia.org/wiki/Lactuca_sativa+lechuga&ct=clnk
40. Fundación Wikipedia. Enciclopedia libre (página de internet). fecha de acceso: diciembre 2011. disponible en:
http://es.wikipedia.org/wiki/Brassica_oleracea_var._viridis+col&ct=clnk

ANEXO

ANEXO N° 01

Cuadro N° 12: Análisis descriptivo para el Número Más Probable de coliformes fecales hallados en los diez puntos de muestreo en agua del río Chacco, *Lactuca sativa* "lechuga" y *Brassica oleracea* "col". Ayacucho, julio a octubre del 2010.

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Coliformes fecales en agua(NMP/ 100 ml)	60	63556.667	44574.8594	400.0	110000.0
Coliformes fecales en <i>Lactuca sativa</i> (NMP/g)	60	138.8833	327.93742	.00	1100.00
Coliformes fecales <i>Brassica oleracea</i> (NMP/g)	60	41.6167	198.88844	.00	1100.00
Puntos Muestreo	60	5.5000	2.89652	1.00	10.00

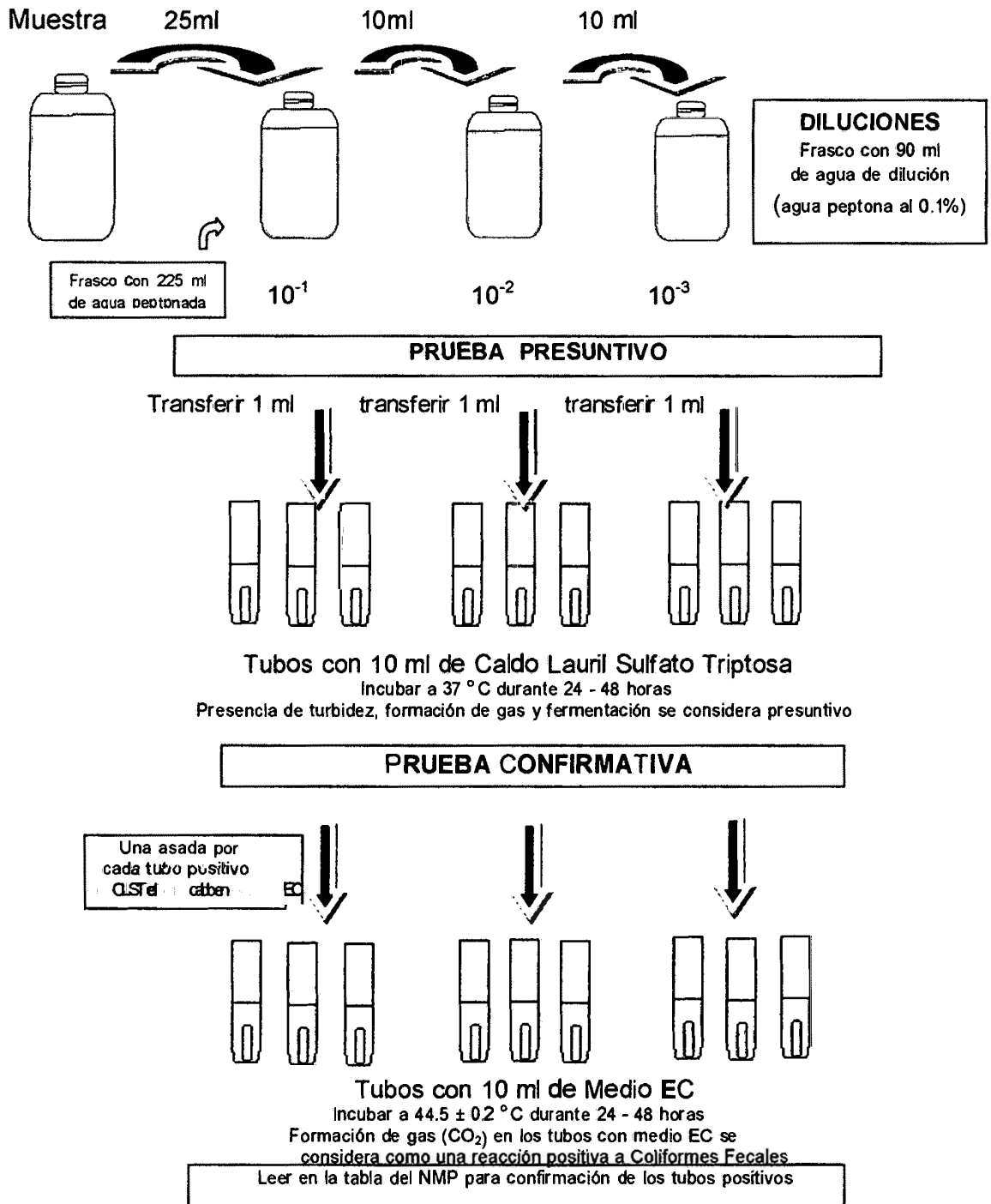
ANEXO N° 04

Cuadro N° 15: Prueba de Kruskal-Wallis para coliformes fecales en agua del río Chacco, *Lactuca sativa* "lechuga" y *Brassica oleracea* "col" según los diez puntos de muestreo. Ayacucho, julio a octubre del 2010

	Coliformes fecales en agua (NMP/ 100 ml)	Coliformes fecales en <i>Lactuca sativa</i> (NMP/g)	Coliformes fecales <i>Brassica oleracea</i> (NMP/g)
Chi-cuadrado	9.912	12.314	10.346
gl	9	9	9
Sig. asintót.	.358	.196	.323

ANEXO N° 05

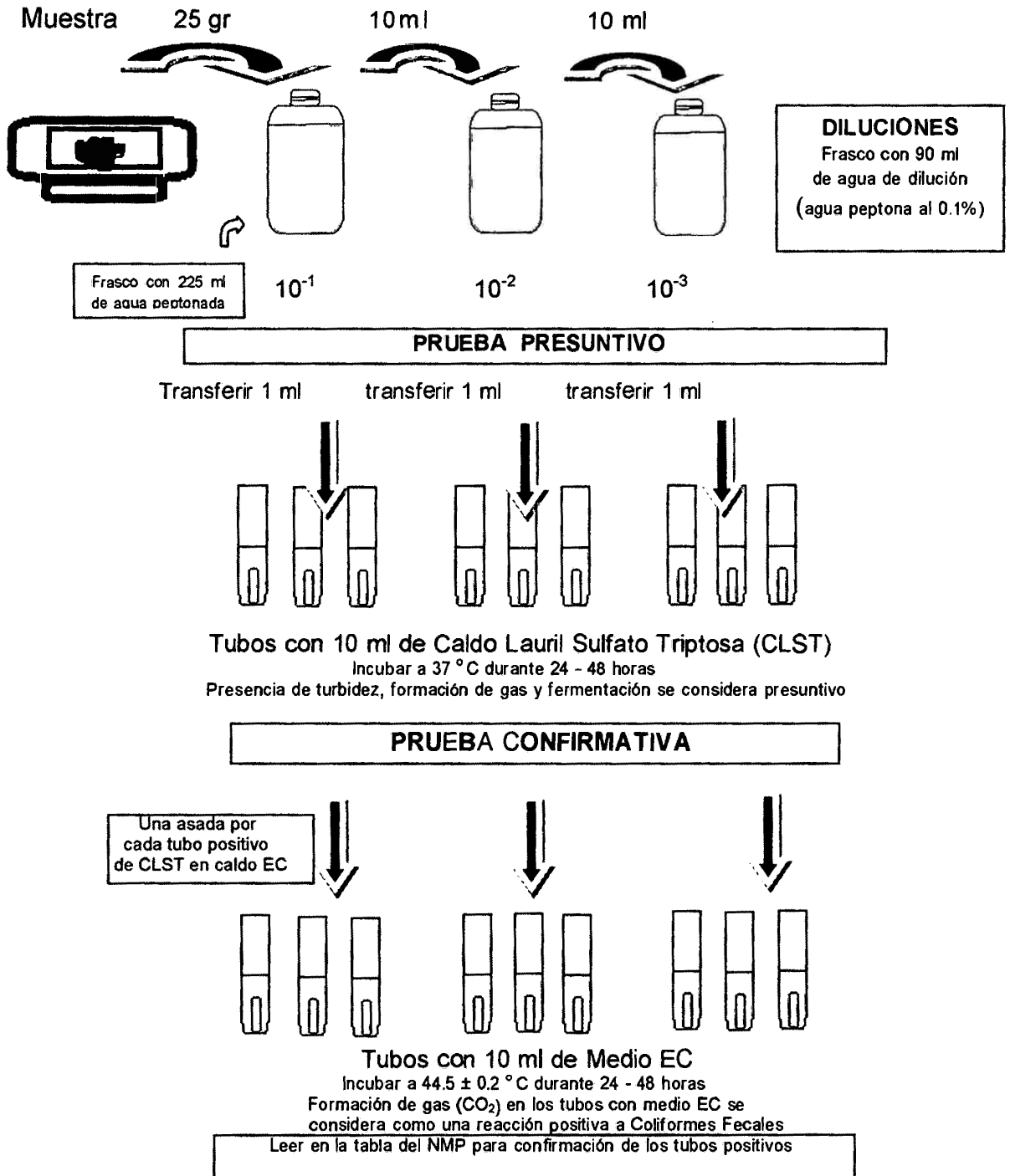
Gráfico N° 2: Numeración de coliformes fecales en aguas de río Chacco por la técnica del Número Más Probable (NMP)



Fuente: ICMSF, 2000.

ANEXO N°06

Gráfico N° 3: Numeración de Coliformes Fecales de los vegetales por la técnica del Número Más Probable (NMP)



ANEXO N°07

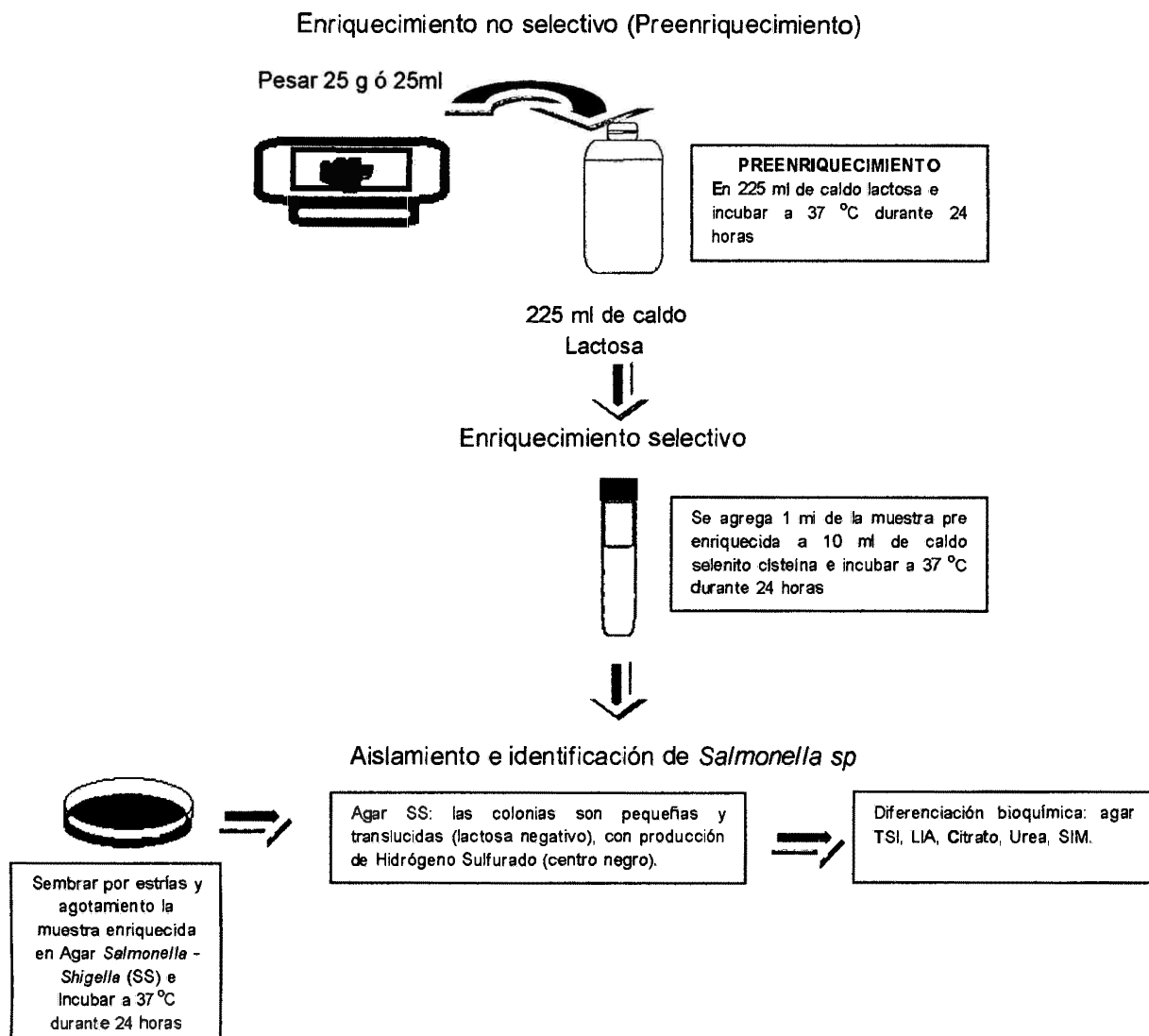
CUADRO N° 16: Número más probable (NMP) de bacterias; tres tubos por cada dilución.

Número de tubos positivos en cada dilución				Límite de confianza			
Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻²	Dilución 10 ⁻³	NMP por gramo	99%		95%	
0	1	0	3	< 1	23	< 1	17
1	0	0	4	<1	28	1	21
1	0	1	7	1	35	2	27
1	1	0	7	1	36	2	28
1	2	0	11	2	44	4	35
2	0	0	9	1	50	2	38
2	0	1	14	3	62	5	48
2	1	0	15	3	65	5	50
2	1	1	20	5	77	8	61
2	2	0	21	5	80	8	63
3	0	0	23	4	177	7	129
3	0	1	40	10	230	10	180
3	1	0	40	10	290	20	210
3	1	1	70	20	370	20	280
3	2	0	90	20	520	30	390
3	2	1	150	30	660	50	510
3	2	2	210	50	820	80	640
3	3	0	200	<100	1.900	100	1.400
3	3	1	500	100	3.200	200	2.400
3	3	2	1.100	200	6.400	300	4.800

fuentes: ICMSF. 2000. International Commission on Microbiological Specifications for Foods, of the International Union of Microbiological Societies

ANEXO N° 08

Gráfico N° 4: Aislamiento e identificación de salmonella



PRUEBAS BIOQUIMICAS DE SALMONELLA

Especies	TSI	Gas	H ₂ S	LIA	Indol	Citrato	Urea	SIM		
								S	I	M
<i>Salmonella typhi</i>	K/A	-	+	K/K	-	-	-	+	-	+
<i>Salmonella paratyphi A</i>	K/A	+	-	K/A	-	-	-	-	-	+
<i>Salmonella paratyphi B</i>	K/A	++	++	K/K	-	-	-	+	-	+
<i>Salmonella spp.</i>	K/A	++	++++	K/K	-	V	-	+	-	V

V : variable

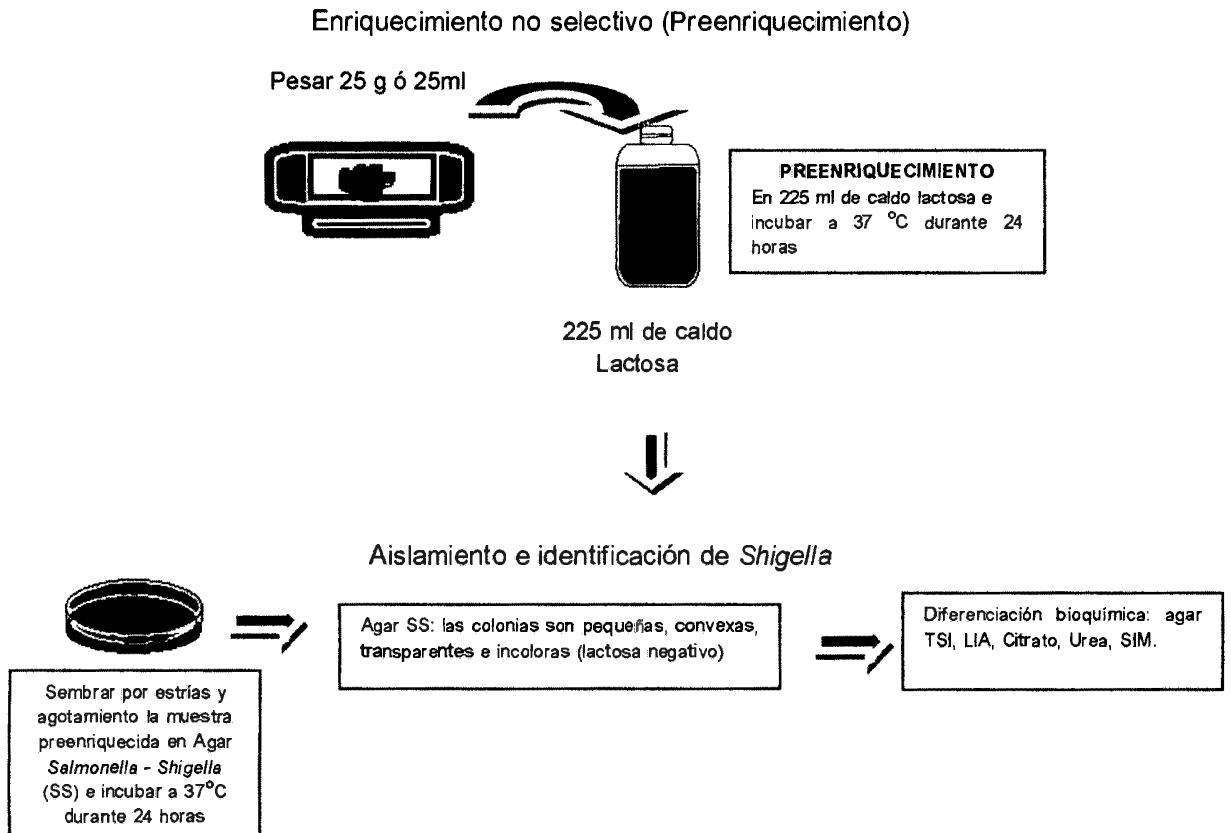
+: 90% o más de las cepas en 1 o 2 días

- 90% o más de las cepas

Fuente: ICMSF. 2000.

ANEXO N° 09

Gráfico N° 5: Aislamiento e identificación de *Shigella*



PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE *Shigella*

Especie	TSI	Gas	H ₂ S	LIA	Indol	Citrato	Urea	SIM		
								S	I	M
<i>Shigellasp</i>	K/A	-	-	K/A	v	-	-	-	v	-

DIFERENCIACIÓN BIOQUÍMICA ENTRE ESPECIES DE SHIGELLA

especie	Manitol (fermentación)	ONPG	Omitina descarboxilasa	Sacarosa (fermentación)	Xilosa (fermentación)	Dulcitol (Fermentación)	Mucato
Sh. <i>dysenteriae</i>	-	-	-	-	-	-	-
Sh. <i>flexneri</i>	+	-	-	-	-	-	-
Sh. <i>sonnei</i>	+	+	+	(+)	-	-	-
Sh. <i>boydii</i>	+	-	-	-	+	-	-
<i>Escherichia coli</i>							+

V : variable

+: 90% o más de las cepas en 1 o 2 días

(+) Positivo luego de 3 o más días

- 90% o más de las cepas

Fuente: ICMSF. 2000.

ANEXO N° 10

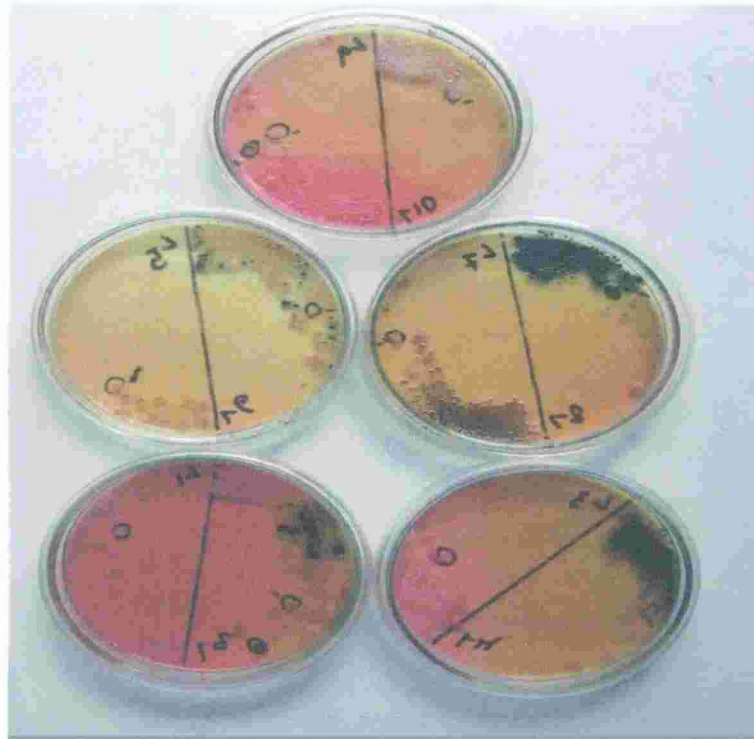


Fotografía N° 1: Materiales y medios cultivado listos para el aislamiento de las cepas de *Shigella sp* y *Salmonella sp*. En el Laboratorio de Enteropatógenos del Laboratorio de Referencia Regional Ayacucho.

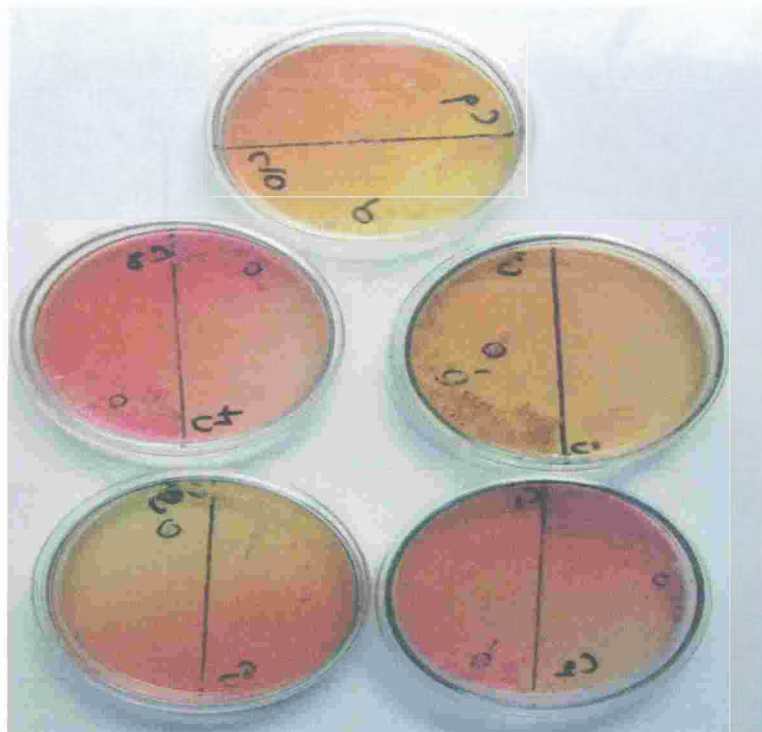


Fotografía N° 2: Caldo selenito cisteína incubado a 37 °C por 24 horas

ANEXO N° 11



Fotografía N° 3: Colonias aisladas a partir *Lactuca sativa* en agar SS

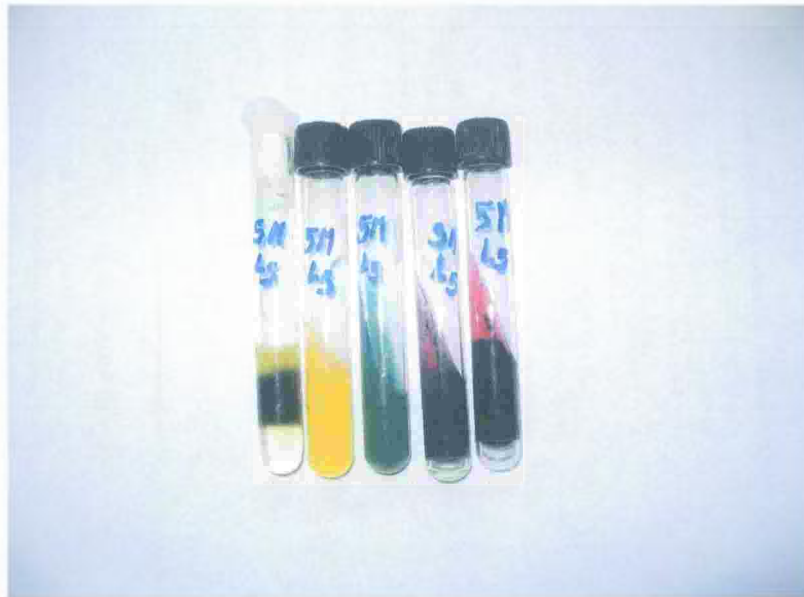


Fotografía N° 4: Colonias aisladas a partir *Brassica oleracea* en agar SS

ANEXO N° 12



Fotografía N° 5: Cultivo de agua del río Chacco en Agar SS



Fotografía N° 6: Identificación bioquímica de cepas de *Salmonella enteritidis*

ANEXO N° 13



Fotografía N° 7: Identificación bioquímica de *Shigella sp.*, en muestra de agua a la izquierda y muestra de lechuga a la derecha