F A C U L T A D D E F A R M A C I A D E G R A N A D A

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SOCIAL

DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGIA, TOXICOLOGIA Y ANALISIS QUIMICO APLICADO.

ESTUDIO DE LA CONTAMINACION MICROBIOLOGICA DE AGUAS DE RIEGO Y DE LAS VERDURAS Y HORTALIZAS DE PRODUCCION Y CONSUMO EN GRANADA.

MEMORIA para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia que presenta la Licenciada en Farmacia BELEN GARCIA-VILLANOVA RUIZ.

Granada, Diciembre de 1984

MEMORIA presentada para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia por la Licenciada BELEN GARCIA-VILLANOVA RUIZ.

DIRECTORES DE ESTA TESIS:

Profesores: Dr. D. Ramón Galvez Vargas
Dr. D. Gonzalo Piédrola Angulo
Dr. D. Rafael Garcia Villanova

LICENCIADA: Belén Garcia-Villanova Ruiz
Aspirante al Grado de Doctor en Farmacia

Granada, Diciembre de 1984

CATEDRA DE MEDICINA
PREVENTIVA Y SOCIAL
DE LA
FACULTAD DE MEDICINA

PROF. R. GALVEZ

AVENIDA DE MADRID 9
TFNOS PSH · 28 01 44
28 01 45
GRANADA · 12

EL PROFESOR DR. D. RAMON GALVEZ VARGAS, CATEDRATICO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SOCIAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA,

CERTIFICA; Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, Dª BELEN GARCIA-VILLANOVA RUIZ, sobre el tema: "ESTUDIO DE LA CONTAMINACION MICROBIOLOGICA DE AGUAS DE RIEGO Y DE LAS VERDURAS Y HORTALIZAS DE PRODUCCION Y CONSUMO EN GRANADA", ha sido realizada bajo mi dirección durante los últimos cuatro años, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedora del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 18 de Enero de 1985

Ramón Galvez Vargas

CATEDRA DE
MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
DE LA
FACULTAD DE MEDICINA

PROF. G. PIEDROLA

AVENIDA DE MADRID, 9
TFNO. 958/26 01 45
GRANADA

EL PROFESOR DR. D. GONZALO PIEDROLA ANGULO CATEDRATICO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada Dª BELEN GARCIA-VILLANOVA RUIZ, sobre el tema: "ESTUDIO DE LA CONTAMINACION MICROBIANA DE AGUAS DE RIEGO Y DE LAS VERDURAS Y HORTALIZAS DE PRODUCCION Y CONSUMO EN GRANADA" ha sido realizada bajo mi dirección durante los últimos cuatro años, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedora del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 18 de Enero de 1.985.

Fdo. Gonzalo Piédrola Angulo

DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGIA,

TOXICOLOGIA Y ANALISIS QUIMICO APLICADO

FACULTAD DE FARMACIA DE GRANADA

RAFAEL GARCIA VILLANOVA, CATEDRATICO DE ANALISIS QUIMICO, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA,

CERTIFICA: Que parte del trabajo realizado por la Licenciada Dª BELEN GARCIA-VILLANOVA RUIZ para optar al Grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bromatologia, Toxicologia y Análisis Químico Aplicado, durante los años 1981 a 1984.

Y para que conste firmo en Granada, a 18 de Enero de 1985.

Deseo expresar mi sincero y profundo agradecimiento:

A los Directores de esta Tesis Doctoral y muy especialmente al Prof. D. Ramón Galvez Vargas, por su estímulo y por la confianza que siempre me ofreció. Su gran capacidad de trabajo ha influido notablemente en mi formación.

A D. Antonio Cueto que en todo momento ofreció su colaboración y ayuda y que supo alentarme en los momentos más difíciles.

A todo el personal del Departamento de Microbiología y Medicina Preventiva de la Facultad de Medicina que siempre han ofrecido su ayuda y colaboración en la realización de este trabajo.

A mis compañeros del Departamento de Bromatología por sus consejos y optimismo.

Al Departamento de Bioestadística de la Facultad de Medicina y especialmente a Jorge Bolaños y Juan de Dios Luna por la realización del estudio estadístico.

A mis compañeros Alberto Mariscal y Lola Jurado con quienes pasé horas interminables y que sin su ayuda y comprensión la realización de este trabajo hubiera sido más difícil y cómo no a mis amigos por su continuo apoyo.

Por último quiero hacer una mención especial a Serafín por quién conocí la vida del agricultor.

A todos muchas gracias.

A mi familia

INDICE

I N D I C E

		Página
	INTRODUCCION	1
I	REVISION BIBLIOGRAFICA	
I.1.	ENFERMEDADES DE TRANSMISION FECOHIDRICA	3
I.2.	TOXIINFECCIONES ALIMENTARIAS	6
I.3.	VALOR NUTRITIVO DE LAS VERDURAS Y HORTALIZAS. ALTERACIONES MICROBIANAS	13
I.4.	INDICADORES MICROBIOLOGICOS	16
	I.4.1. Criterios para la elección de las muestras . . .	21
	I.4.2. Preparación de las muestras	22
	a) Volumen de muestra	22
	b) Homogenización y diluyentes	22
	I.4.3. Recuento total de bacterias aerobias	24
	a) Medios de recuento	25
	b) Técnicas de recuento	26
	I.4.4. Recuento de bacterias coliformes	28
	a) Características y Distribución	28
	b) Medios de recuento	31
	c) Técnicas de recuento	33
	d) Interés del recuento de coliformes	36
	I.4.5. Recuento de escherichia coli	39
	a) Características y Distribución	40
	b) Medios y técnicas de recuento	41
	c) Interés de la identificación	42

Página

I.4.6. Recuento de estreptococos fecales 44
a) Características y Distribución 44
b) Medios de recuento 47
c) Técnicas de recuento 49
d) Interés del recuento de estreptococos fecales 49
I.4.7. Recuento de clostridios sulfito-reductores . . . 51
a) Características y Distribución 52
b) Medios y técnicas de recuento 53
I.5. GENERO SALMONELLA 54
I.5.1. Historia 54
I.5.2. Nomenclatura y clasificación 55
I.5.3. Características morfológicas y bioquímicas . . . 57
I.5.4. Cultivo y aislamiento 62
I.5.5. Características serológicas y fagotipia 71
I.5.6. Aspectos genéticos del género Salmonella 75
I.5.7. Aspectos clínicos del género Salmonella 79
a) Concepto y clasificación 79
b) Patogenia 79
c) Sintomatología 83
d) Diagnóstico 85
e) Tratamiento 89
f) Resistencia a antibióticos y plásmidos R en Salmonella 94
g) Epidemiología 97
h) Control de la infección 108
I.6. NORMATIVA Y LIMITES MICROBIOLOGICOS EN ALIMENTOS 112
I.7. NORMATIVA LEGAL DE AGUAS RESIDUALES 117

Página

MATERIAL Y METODOS

II. MATERIAL

II.1. Muestras de aguas de riego 121

II.2. Muestras de verduras y hortalizas 123

II.2.1. Muestras procedentes de fincas de la Vega de Granada 123

II.2.2. Muestras procedentes del Mercado Central . . . 123

II.2.3. Muestras procedentes de Supermercados 128

II.2.4. Muestras procedentes de Establecimientos pequeños 128

II.2.5. Muestras de verduras tratadas con aliño . . . 128

II.3. Supervivencia de salmonelas en lechugas cultivadas . . 135

II.4. Salmonelas de referencia 135

II.5. Antibióticos 137

III. METODOS

III.1. Recogida de muestras 140

III.1.1. Aguas de riego 140

III.1.2. Verduras y hortalizas 140

III.2. Preparación de las muestras 141

III.2.1. Aguas de riego 141

III.2.2. Verduras y hortalizas 141

III.2.3. Verduras y hortalizas tratadas con aliño . . 142

III.2.4. Cultivo y contaminación de lechugas 143

III.3. Siembra de muestras 150

III.3.1. Recuento de bacterias aerobias (aguas, verduras y hortalizas) 150

III.3.2. Recuento de coliformes totales (aguas, verduras y hortalizas) 150

III.3.3. Recuento de Escherichia coli (aguas, verduras y hortalizas) 151

III.3.4. Recuento de estreptococos fecales (aguas, verduras y hortalizas) 155

Página

III.3.5. Recuento de Clostridios sulfito-reductores (aguas) 155

III.3.6. Aislamiento de salmonelas (aguas, verduras y supervivencia de salmonelas) 157

III.4. Identificación de microorganismos 158

III.4.1. Identificación de Escherichia coli 158

III.4.2. Identificación bioquímica de Salmonella . . 160

III.4.3. Identificación serológica de Salmonella . . 160

III.5. Estudio de la sensibilidad de las salmonelas aisladas a antibióticos y quimioterápicos 163

III.6. Método estadístico 164

III.6.1. Análisis de la varianza de dos vías (Método mixto) 164

III.6.2. Comparaciones múltiples entre medios de filas tras un análisis de la varianza de dos vías (Método mixto) 166

III.6.3. Análisis de la varianza de tres vías 167

III.6.4. Comparación de dos medias de muestra independientes 167

III.6.5. Test χ^2 para comparación de muestras cualitativas 169

III.6.6. Regresión y correlación 170

IV RESULTADOS

IV.1. Aguas de riego 171

IV.1.1. Recuento total de bacterias aerobias 171

IV.1.2. Recuento de coliformes totales 172

IV.1.3. Recuento de Escherichia coli 173

IV.1.4. Recuento de estreptococos fecales 173

IV.1.5. Recuento de clostridios sulfito-reductores . 174

Página

IV.1.6. Comparaciones entre los indicadores microbiológicos de aguas de riego 195

IV.1.7. Aislamiento de salmonelas en aguas de riego 221

IV.2. Verduras y hortalizas 243

IV.2.1. Muestras procedentes de huertas de la Vega de Granada 243

IV.2.2. Muestras procedentes de establecimientos pequeños 244

IV.2.3. Muestras procedentes de supermercados 244

IV.2.4. Muestras procedentes del mercado Central . . 244

IV.2.5. Recuento de bacterias aerobias en verduras y hortalizas 300

IV.2.6. Recuento de coliformes totales en verduras y hortalizas 301

IV.2.7. Recuento de Escherichia coli en verduras y hortalizas 301

IV.2.8. Aislamiento de salmonelas en verduras y hortalizas 325

IV.3. Muestras de verduras aliñadas 333

IV.3.1. Recuento total de bacterias aerobias 333

IV.3.2. Recuento de coliformes totales 333

IV.3.3. Recuento de Escherichia coli 334

IV.3.4. Comparación de los resultados 334

IV.4. Contaminación de lechugas cultivadas 369

IV.5. Relación entre salmonelas aisladas en nuestro estudio y las aisladas en patogenos humanos 370

IV.6. Sensibilidad a los antibióticos de las salmonelas aisladas en aguas de riego, verduras, hortalizas y patogenos humanos 376

Página

V. DISCUSION

V.1. Estudio de los indicadores microbiológicos de las aguas de riego . . . . . .

V.1.1. Recuento de bacterias aerobias 380

V.1.2. Recuento de coliformes totales 382

V.1.3. Recuento de Escherichia coli 383

V.1.4. Recuento de estreptococos fecales 384

V.1.5. Recuento de clostridios sulfito-reductores . . . 385

V.1.6. Aislamiento de salmonelas en aguas de riego . . . 386

V.1.7. Comparación de los indicadores microbiológicos y aislamiento de slamonelas en aguas de riego . . . 389

V.2. Estudio de la contaminación de verduras y hortalizas cultivadas y las procedentes de mercados 390

V.2.1. Contaminación de verduras recogidas en la huerta 390

V.2.2. Contaminación de verduras procedentes del mercado central 392

V.2.3. Contaminación de verduras procedentes de supermercados 392

V.2.4. Contaminación de verduras procedentes de establecimientos pequeños 394

V.2.5. Aislamiento de salmonelas en verduras y hortalizas 396

V.2.6. Comparación de los indicadores y el aislamiento de salmonelas en verduras y hortalizas 398

V.3. Acción de la condimentación sobre la contaminación bacteriana 398

V.4. Estudio comparativo entre el número de aislamientos y los distintos serotipos de salmonelas aislados en el medio ambiente y los encontrados en patógenos humanos 400

V.5. Resistencia a antibióticos de las salmonelas aisladas del medio ambiente y las aisladas de patógenos humanos . . . 404

CONCLUSIONES 406

BIBLIOGRAFIA 408

I N T R O D U C C I O N

I N T R O D U C C I O N

En los paises europeos y principalmente en los del área mediterránea, las verduras y hortalizas constituyen una parte importante de la dieta diaria.

Estos alimentos son la fuente principal del aporte de vitaminas, sales minerales y juegan un papel esencial en el metabolismo intestinal y en la regulación de la flora.

El cultivo y recolección de los vegetales en las condiciones en que se hacen permiten la contaminación microbiológica y de ahí la alteración y destrucción de estos alimentos con la consiguiente disminución de sus cualidades alimentarias y el peligro potencial en la transmisión de enfermedades infecciosas.

La Organización Mundial de la Salud pone de manifiesto que las verduras regadas con aguas contaminadas o residuales durante el cultivo entraña un riesgo así como las etapas siguientes de transporte y comercialización.

En el área de estudio elegida por nosotros, los microorganismos del género Salmonella son los principales agentes productores de brotes infecciosos, de ahí, la importancia del control microbiológico a que deben ser sometidos estos alimentos y las precauciones que han de ser tenidas en cuenta en lo que se refiere a las aguas de riego, abonado, recolección y distribución.

Los objetivos propuestos al iniciar el presente estudio, se basaron en comprobar la posible relación entre la contaminación de las aguas de cauces y acequias de riego con la de las verduras y hortalizas regadas por dichos efluentes.

Igualmente se pretendía demostrar el grado de contaminación de las diversas hortalizas en el momento de la oferta al público y la influencia de los procesos culinarios.

REVISION BIBLIOGRAFICA

I.1. ENFERMEDADES DE TRANSMISION FECOHIDRICA

El agua es el principal constituyente de la materia viva, sin la cual no es posible concebir ningún tipo de sistema biológico según los esquemas clásicos de su propia definición.

El agua, que constituye también un factor fundamental para el desarrollo económico, es a su vez uno de los principales responsables de un gran número de enfermedades infecciosas. La Organización Mundial de la Salud calcula que alrededor de 500 millones de personas contraen cada año enfermedades producidas por contaminación de las aguas (PUMAROLA, 1979).

La transmisión de enfermedades por el agua se conoce desde muy antiguo. Hipócrates en el siglo IV a. de C. recomendaba la ingestión de agua hervida para evitar los posibles efectos perjudiciales.

La transmisión de enfermedades por el agua puede originarse bien por la ingestión de agua o hielo contaminado o simplemente por su contacto. Las enfermedades adquiridas por ingestión pueden deberse a una intoxicación causada por sustancias químicas o toxinas producidas por microrganismos, a infecciones originadas por bacterias que elaboran enterotoxinas y, en tercer lugar, a infecciones causadas por la propia proliferación de los microorganismos en los tejidos animales (BES, 1982a).

De todos los agentes responsables de enfermedades transmitidas por el agua, los de origen microbiano incluyendo los virus, son los que presentan una mayor incidencia en el hombre y en los animales.

La contaminación microbiana afecta principalmente a las aguas superficiales y, aunque cualquier bacteria patógena puede propagarse por este medio, en realidad son únicamente un pequeño

número de microorganismos los que al eliminarse por las heces o la orina pueden llegar a constituir una seria amenaza al encontrarse en una cantidad suficientemente elevada.

Los tipos más importantes de infecciones conocidas como enfermedades de transmisión fecohídrica, con capacidad para manifestarse en forma epidémica, son: fiebres tifoidea y paratifoidea, cólera, disenteria bacilar, gastroenteritis, diarreas infantiles y en ocasiones la leptospirosis, parasitosis y algunas enfermedades originadas por virus (PUMAROLA, 1979). En la Tabla I se indican los principales microorganismos responsables de las infecciones de transmisión fecohídrica (PIEDROLA y col., 1983).

Dentro de este esquema general, en nuestro medio, los microorganismos que más frecuentemente se han aislado como responsables de gran número de infecciones de origen hídrico de naturaleza epidémica son especies bacterianas de los géneros **Salmonella** y **Shigella** (PEREZ LOPEZ y cols., 1983 y 1984). En 1982, según los datos epidemiológicos recogidos por la Dirección General de Salud Pública se detectaron en España 11 brotes hídricos originados por especies del género **Shigella** y 5 por especies del género **Salmonella** 4 de ellos producidos por **S. typhi** (BES, 1983b). Esta cifra hace pensar que las declaraciones no son correctas por defecto.

El agua de bebida, cuando el abastecimiento se realiza en condiciones de garantía sanitaria, no es la responsable de este tipo de enfermedades. Como se ha demostrado en numerosas ocasiones, la mala infraestructura de algunas canalizaciones de aguas residuales ocasionan filtraciones con la correspondiente contaminación. Asimismo, el uso de aguas residuales no depuradas para el riego o procesado de ciertos alimentos suelen ser, en gran medida, los responsables de este tipo de enfermedades.

TABLA I .- PRINCIPALES MICROORGANISMOS RESPONSABLES DE ENFERMEDADES DE TRANSMISION FECOHIDRICA.

BACTERIAS	Shigella sp
	Salmonella (incluida S.typhi y S. paratyphi A, B y C).
	Vibrio cholerae
	Leptospira
	Escherichia coli enteropatógena
VIRUS	Enterovirus
	Reovirus
	Adenovirus
	Virus de la hepatitis A
PROTOZOOS	Entamoeba histolítica
	Giardia lamblia
	Balantidium coli
HELMINTOS	Ascaris lumbricoides
	Trichuris trichura
	Anquilostoma, etc.

I.2. TOXIINFECCIONES ALIMENTARIAS

Debido a su trascendencia social y económica las toxiinfecciones alimentarias constituyen un problema sanitario grave, sobre todo a causa de su enorme incidencia.

De la presencia y papel de los microorganismos en los alimentos se tenía evidencia antes del desarrollo de la microbiología como ciencia. A finales del siglo pasado se lograron aislar los agentes etiológicos responsables de un gran número de infecciones producidas como consecuencia de la ingestión de determinados alimentos. Entre los primeros microorganismos aislados responsables de toxiinfecciones alimentarias destacan S. enteriditis por Garner en 1888, el estafilococo por Denis, 1884, Clostridium botulinum por Van Ermenghen en 1896, S. typhimurium por Nobele, 1888, estreptococos por Linden, Turner y Thom en 1926, etc. (PIEDROLA y col. 1983; JAY, 1978).

Los alimentos, según la Organización Mundial de la Salud, constituyen la segunda causa de morbilidad en Europa, pero debido a la falta de datos es difícil conocer en toda su magnitud el número de casos de intoxicaciones alimentarias y se supone que es varias veces superior a los declarados (TURNBULL, 1981).

Las intoxicaciones ocasionadas por el consumo de alimentos pueden tener su origen en productos químicos o sustancias tóxicas procedentes de plantas o animales aunque el mayor número de las mismas es debido a la contaminación de estos alimentos por microorganismos del tipo de las bacterias, virus o parásitos. De estos tres tipos de agentes, las bacterias constituyen la principal fuente de toxiinfecciones alimentarias y llegan a suponer, según algunos datos, el 86% de las mismas (TURNBULL, 1981)(Tabla II).

TABLA II .- INCIDENCIA DE LOS DISTINTOS AGENTES ETIOLOGICOS EN LAS INTOXICACIONES DE ORIGEN ALIMENTARIO EN ESTADOS UNIDOS, CANADA Y JAPON.

	ESTADOS UNIDOS 1972-1976		CANADA 1973-1975		JAPON 1969-1975	
	Brotes	Casos	Brotes	Casos	Brotes	Casos
Bacterias	65,7	91,7	86,1	94,8	84,0	95,4
Productos químicos	23,2	3,6	9,1	2,4	1,1	2,4
Plantas/animales	8,3	1,2	4,8	2,8	14,9	2,1
Virus	2,8	3,5	0	0	NC	NC
NUMERO TOTAL	784	31.164	231	5.768	6.091	180.959

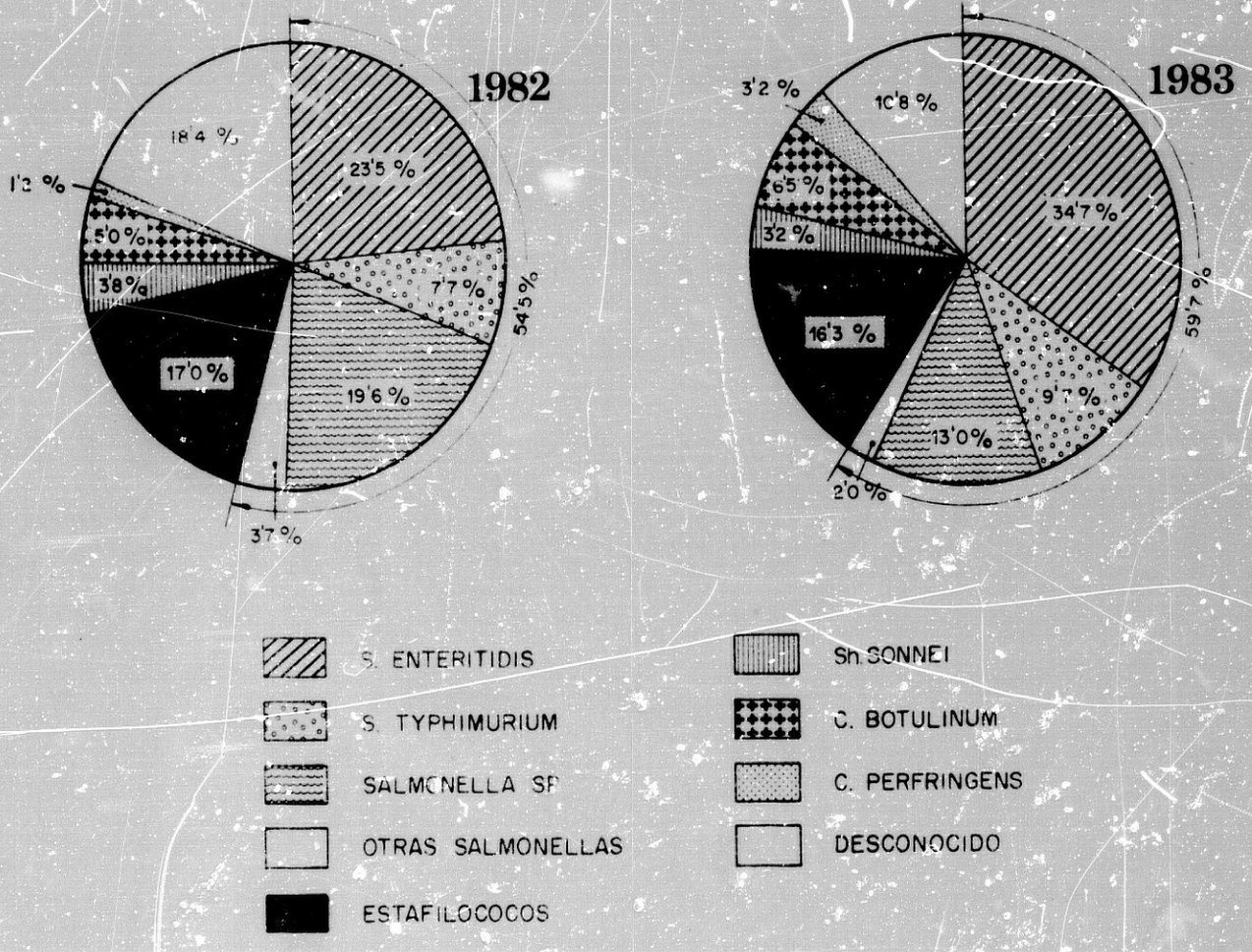
Las intoxicaciones alimentarias de origen bacteriano pueden estar producidas por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos, y/o por las toxinas producidas por estos. Las bacterias que destacan por su capacidad para producir intoxicaciones alimentarias en nuestra zona geográfica son: especies de los géneros Salmonella, Staphilococcus, Clostridium botulinum y Shigella sonnei (Tabla III y fig. 1)(BES, 1984).

Los agentes etiológicos responsables de las toxiinfecciones alimentarias varian en gran medida dependiendo del lugar o zona geográfica puesto que los hábitos alimenticios condicionan de manera importante la frecuencia y tipo de microorganismos presentes en los alimentos (TURNBULL, 1981). Ciertos factores ecológicos deben incidir también de una manera importante en la distribución de los microorganismos en los distintos paises; así por ejemplo Vibrio parahaemolyticus que en Japón es el principal agente responsable de este tipo de infecciones, en los paises europeos, sin embargo, su incidencia es practicamente nula aún cuando su presencia en nuestro habitat es frecuente (PEREZ LOPEZ, 1978). Otras diferencias importantes se observan por la frecuencia con que aparecen determinados microorganismos en los brotes epidémicos. De este modo, mientras que en Inglaterra y Pais de Gales, microorganismos del género Salmonella son responsables de casi el 89% de los brotes epidémicos ocurridos entre los años 1969-1976, en Japón, en el mismo período de tiempo, el número de brotes originados por este microorganismo no ha supuesto más del 11,5%. Otras bacterias como Staphilococcus aureus o Clostridium perfringens también presentan una heterogeneidad en su distribución. El primero supone en Inglaterra y Escocia un 4% de los brotes epidémicos y en otros paises como Canadá, Hungria o Finlandia sobrepasa el 40 o incluso el 50%. En cuanto a

TABLA III .- BACTERIAS PRODUCTORAS DE TOXIINFECCIONES ALIMENTARIAS

BACTERIAS ENTEROINVASORAS	*Shigella sp*
	Salmonella (incluida S. typhi y S. paratyphi A, B y C)
	Campilobacter sp
	Escherichia coli enteroinvasiva
	Yersinia enterocolitica
	Vibrio parahaemolitico
BACTERIAS ENTEROTOXICAS	*Vibrio cholerae*
	Escherichia coli enterotoxigénica
	Clostridium perfringens
	Staphylococcus aureus
	Clostridium botulinum
	Bacillus cereus

FIGURA 1.- MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE TOXIINFECCIONES ALIMENTARIAS AISLADOS EN 1982 y 1983.



Clostridium perfringens en Escocia es el responsable del 31% de las toxiinfecciones alimentarias mientras que en Inglaterra y Pais de Gales sólo supuso el 7% entre los años 1969-1976 (TURNBULL, 1981).

La presencia de microorganismos de origen fecal se ha detectado en practicamente todos los tipos de alimentos de origen animal y vegetal, siendo los primeros los responsables del mayor número de brotes infecciosos de origen alimentario. De igual forma que ocurría con su distribución geográfica la presencia de este grupo de microorganismos se hace tambien más patente en ciertos alimentos: ensaladillas, huevos, productos de confitería y carnes y han supuesto más del 60% del conjunto de toxiinfecciones alimentarias ocurridas en España en 1982 (BES, 1983 a).

La presencia de microorganismos patógenos en vegetales supone un peligro potencial para el hombre dada su incidencia en la aparición de toxiinfecciones de tipo epidémico. La presencia de microorganismos del tipo de Salmonella, Staphilococcus y también Clostridium ,etc. se extiende practicamente a todo tipo de alimentos vegetales, debido a la contaminación por el riego, abonos, manipulación y procesado (OMS, 1968). En un estudio realizado por TAMMINGA y cols.(1978) ,de un total de 103 muestras de vegetales se aislaron salmonelas en 23 de ellas. La presencia de bacterias de origen fecal superó en todos los casos más del 50% de las muestras estudiadas. Otros microorganismos como estafilococo coagulasa positivo y Clostridium perfringens se aislan también de forma frecuente en alimentos elaborados con vegetales. La alta proporción del primer tipo de microorganismo citado se debe más a la manipulación que a la previa contaminación de las materias primas (CHRISTIANSEN, y col. 1971).

El avance en los últimos años de las técnicas para la identificación de microorganismos patógenos ha facilitado el establecimiento de normas para el control microbiológico de los alimentos.

No obstante el mayor intercambio comercial entre los paises ha ocasionado un aumento del número y variedad de microorganismos responsables de toxiinfecciones alimentarias al aparecer especies patógenas que eran practicamente desconocidas en determinadas áreas geográficas. Ello ha dado ocasión al aumento del número de enfermedades producidas por el consumo de alimentos contaminados en poblaciones no sensibilizadas.

I.3. VALOR NUTRITIVO DE LAS VERDURAS Y HORTALIZAS.

ALTERACIONES MICROBIANAS.

Las diversas clasificaciones que se han propuesto para las hortalizas y verduras con criterio bromatológico (CASARES LOPEZ, 1968) confirman la dificultad de incluir en un solo grupo a estos alimentos. La diversidad de especies botánicas de procedencia, las partes del vegetal que se emplean en la alimentación, la composición química, tanto cuali como cuantitativa, la variedad de los nutrientes, etc. son factores que confirman cuanto antecede. Si, además, ha de tenerse en cuenta en dicha clasificación, el valor nutritivo, tan variado según la especie y la parte comestible, como pueden ser algunos tubérculos (QUINTIN OLASCOAGA, 1975) de un valor calórico considerable si se comparan con el de las verduras clasificadas por algunos como ensaladas (lechuga, escarola), se comprenderá la dificultad del tratamiento de estos alimentos como se hace con otros grupos más homogéneos (carne, leche, etc.).

Si separamos de este grupo los tubérculos y raices feculentas (patata, batata, yuca) encontramos que las verduras y hortalizas se caracterizan por su escaso valor calórico y como consecuencia el alto contenido en agua, (alrededor del 90%).

La fracción no digestible de los hidratos de carbono está constituida por celulosa, hemicelulosa y pectinas. Las dos primeras juegan un papel esencial en el volumen fecal y la flora intestinal por lo que constribuyen indirectamente al aporte vitamínico de la dieta normal. Las pectinas modifican la textura de los alimentos cocinados aumentando la adherencia a la mucosa de la boca y por tanto la palatabilidad.

Otra fracción parcialmente digestible de los carbohidratos está formada por inulina, mannosanas y rafinosa cuya digestión de-

pende de la flora intestinal y puede lograrse algún aporte calórico al dar fructosa, manosa y glucosa respectivamente en la hidrólisis.

En cuanto al almidón y otros azúcares, en las verduras y hortalizas de consumo más frecuente se encuentra en la proporción del 5-10% (LEANDRO MONTES, 1981). Este hidrato de carbono produce el mayor aporte calórico de los nutrientes de estos alimentos.

La presencia de ácidos orgánicos (FENNEMA, 1982) (cítrico, málico, tartárico, isocítrico entre otros) hace que las verduras, hortalizas y en general las frutas se consideren como alimentos alcalinizantes y ayuden a mantener el equilibrio ácido-base del organismo, al compensar la acidez de los elementos minerales de la carne, huevos y cereales considerados como acidificantes.

Si bien la proporción de lípidos y prótidos puede considerarse como despreciable desde el punto de vista calórico, la presencia de vitaminas y elementos minerales principalmente, obliga a la inclusión de estos alimentos en una dieta completa y equilibrada. Son particularmente ricos en ácido ascórbico principalmente en las partes más coloreadas del vegetal- riboflavina, tiamina, ácido pantoténico, niacina, carotenos entre otros.

Asimismo, son una fuente importante de elementos minerales (TREMOLIERES y col., 1968) en las que destacan como macroelementos el calcio, magnesio y fósforo que alcanzan concentraciones próximas a los 50 mg % gramos y el hierro está presente en una proporción de 1-4 mg para igual peso del vegetal. Estos alimentos son más ricos en potasio que en sodio, lo cual hace de ellos la principal fuente del primero en la alimentación.

De cuanto antecede, se puede concluir que las verduras y hortalizas son indispensables en la dieta ordinaria y ocupan un lugar preferente en regímenes de adelgazamiento cuando se impone una dieta hipocalórica rica en elementos minerales y vitaminas. La dificultad de digestión de estos alimentos les confiere un considerable poder de saciedad, factor indispensable en dietética de la obesidad (TREMOLIERES y col., 1958) tanto constitucional como la producida por un disturbio del apetito.

El elevado contenido de agua en los productos vegetales facilita en gran medida no solamente el mantenimiento de microorganismos patógenos para el hombre sino tambien de aquellos que producen alteraciones en el propio vegetal. Se conocen más de 250 tipos de alteraciones producidas tanto por bacterias como por virus, hongos o parásitos (BERAHA y col. 1961; JAY 1978).

Actualmente en los paises más desarrollados que son los que tambien cuentan con más métodos de protección de los cultivos como pueden ser Estados Unidos, Canadá o Europa se calcula que más del 20% de las verduras y hortalizas recolectadas se pierden a causa de ese deterioro. Tan solo en Estados Unidos la pérdida de verduras y hortalizas por estas causas entre los años 1951-1960 se calcula que fué superior a los 100 millones de dólares (LUND, 1971).

Las especies bacterianas que más frecuentemente originan alteraciones en los vegetales suelen ser Erwinia carotovora, Pseudomonas marginalis y también, aunque en menor grado, especies de los géneros Clostridium, Bacillus, Xanthomonas y Corynebacterium. Es de destacar que la mayoría de estas especies rara vez afectan al hombre si bien, recientemente parece que ciertas especies que hasta ahora eran totalmente inofensivas están adquiriendo algún tipo de adaptación que en algunos casos puede originar determinados trastornos al ser ingeridos con los alimentos.

I.4. INDICADORES MICROBIOLOGICOS

En los últimos 50 años se ha visto la necesidad de afrontar de una manera más amplia una serie de problemas que afectan a la Salud Pública no solamente para subsanar los problemas, esto es, curar las enfermedades, sino también para conocer sus causas e intentar suprimirlas. Cuando se consideran para su estudio el estado sanitario y los cambios producidos en ciertas áreas (regiones, comarcas, pueblos) referentes a la salud pública, la medida o evaluación de sus parámetros, raramente puede realizarse de una manera directa. Con el fin de obtener la información que nos exprese de una forma cuantitativa el estado y la evolución de los problemas relacionados con la sanidad, se han establecido una serie de indicadores cuyo objeto es medir aquello que no puede cuantificarse de una manera directa. La Organización Mundial de la Salud define a los indicadores como variables que sirven para medir los cambios (OMS, 1981).

Según el comité de expertos de la OMS, los requisitos básicos que debe poseer todo indicador sanitario son los siguientes: facilidad de obtención, representatividad, estabilidad a lo largo del tiempo, universalidad, aceptación general, identidad de los resultados obtenidos, especificidad, sensibilidad y validez. (OMS, 1981)

Dentro de la clasificación de indicadores sanitarios que cita la OMS (1981), los problemas relacionados con las enfermedades de transmisión oral-fecal de los alimentos y el agua, se recogen dentro del grupo de indicadores de riesgo ambiental que a su vez forma parte de un grupo más amplio conocido como indicador de calidad de vida (OMS, 1981).

Dado el objeto de nuestro estudio a continuación se comentará con mayor detalle todo aquello relacionado con los indicadores microbiológicos de origen fecal que pueden ser más utilizados.

Como ocurre con cualquier otro caso relacionado con la salud pública, se han desarrollado una serie de técnicas que nos permiten disponer en cualquier momento de ciertos tipos de indicadores que nos dan un reflejo del estado microbiológico de los alimentos de consumo público.

Estos indicadores no solamente nos servirán para conocer el número y tipo de microorganismos presentes en los alimentos, sino también conocer el peligro potencial que suponen para la salud del hombre, así como un gran dato de interés sobre la epidemiología de las enfermedades de origen alimentario.

Los primeros datos que se conocen sobre el uso de indicadores microbiológicos se remontan a 1892, en que Shradinger sustituye a los microorganismos del género Salmonella por Escherichia coli con el fin de determinar con mayor posibilidad la contaminación fecal de las aguas (JAY, 1978). De este modo se evitaban los inconvenientes originados por el hecho de que la falta de bacterias del género Salmonella no es en ningún caso indicador de la ausencia de contaminación fecal. Posteriormente debido a la detección de microorganismos de origen fecal y a su identificación como responsables de toxiinfecciones alimentarias, se extiende la utilización de estos indicadores de contaminación fecal también a los alimentos (CONTY, 1982; ICMSF, 1983).

Se definen como indicadores microbiológicos a aquellos microorganismos que pertenecen a grupos definidos por sus características ecológicas o taxonómicas cuya presencia o ausencia en los alimentos nos pueden indicar su calidad higiénica (MORENO GARCIA, 1978). Cualquier resultado microbiológico que no coincida

con el estado normal de un alimento puede ser una indicación de que el mismo no se encuentra en condiciones favorables para su consumo. Este desvio de la normalidad es ya un indicador (OMS, 1974).

Según BUTTIAUX y MOSSEL (1961) todo indicador de contaminación fecal debe poseer los siguientes requisitos: a) ser específico del intestino humano o animal; b) encontrarse en un gran número en las heces; c) poseer cierta resistencia a los habitats extraentéricos y d) las técnicas de determinación deben ser sencillas y sensibles.

En la Tabla IV se recogen los indicadores usados más frecuentemente en la determinación del índice de calidad higiénica de los alimentos. MORENO GARCIA (1978).

Los indicadores microbiológicos utilizados en los distintos tipos de muestras con objeto de determinar su contaminación fecal se indican en la Tabla V.

TABLA IV.- INDICADORES MICROBIOLOGICOS Y OTRAS DETERMINACIONES UTILIZADAS COMO INDICE DE CALIDAD HIGIENICA EN LOS ALIMENTOS.

Indicadores de contaminación de origen fecal (riesgo potencial de presencia de organismos patógenos de procedencia entérica).	*Coliformes*	*a) Coliformes totales*
		b) Coliformes fecales
		c) E. coli tipo I (colifecal)
	Estreptococos fecales	
	Enterobacterias totales	
Indicadores de calidad higiénica o microbiológica.	*Recuentos microscópicos directos*	
	Flora aerobia mesófila viable	
	Flora psicrófila	
	Flora anaerobia	
	Clostridios sulfito-reductores	
Indicadores de calidad higiénica o microbiológica	*Pruebas de reducción de colorantes*	
	(Azul de metileno, resazurina)	
Calidad sanitaria	*Pruebas enzimáticas (fosfatasa, amilasa)*	

TABLA V.- INDICADORES MICROBIOLOGICOS DE CONTAMINACION FECAL UTILIZADOS EN AGUAS Y VERDURAS FRESCAS.

A.- Indicadores microbiológicos en aguas:

- Recuento total de bacterias aerobias
- Recuento de Coliformes totales
- Recuento de E. coli
- Recuento de Estreptococos fecales
- Recuento de Clostridios sulfito reductores

B.- Indicadores microbiológicos en verduras frescas:

- Recuento total de bacterias aerobias
- Recuento de Coliformes totales
- Recuento de Escherichia coli

I.4.1. Criterios para la elección de las muestras.

Debido al aumento constante del comercio Internacional de verduras, tanto frescas como congeladas, ha parecido conveniente establecer unos programas de muestreo con el fin de determinar los análisis más adecuados que se deben realizar a este tipo de muestras. Es poco probable que dichos análisis se realicen de forma rutinaria dadas las grandes diferencias con que se realizan los diferentes cultivos según su procedencia. Por tanto se sugiere que el muestreo se realice solo en aquellos lotes que se sospeche presentan alguna alteración, en aquellos que procedan de lugares en los cuales las condiciones higiénicas no sean las adecuadas o, cuando se pretenda realizar un estudio epidemiológico.

El control y mantenimiento de sistemas agrícolas adecuados en el cultivo de verduras junto a medidas higiénicas apropiadas desde la recolección a su venta en mercados internacionales posee un mayor significado que las pruebas bacteriológicas en el control de las enfermedades.

Se han establecido una serie de categorías según las cuales se proponen una serie de análisis que aporten las suficientes garantías sanitarias de los productos alimenticios (ICMSF 1981). Sin embargo estas categorías vendrán, como indica este organismo, condicionadas por el tipo de muestra, lugar de procedencia, manipulación, índice de peligrosidad y las características propias del laboratorio que realice el análisis.

I.4.2. Preparación de las muestras

Las muestras recogidas para el análisis necesitan una serie de preparaciones que varían según sea sólida o líquida el tipo de muestra. En el caso de los vegetales, una vez conocido el volumen de muestra a analizar se realiza una homogenización con el diluyente apropiado. En el caso de las aguas, solo en aquellas que sean potables, se procederá antes de su siembra a la neutralización del cloro presente.

a) Volumen de muestra.

Tanto para aguas como para vegetales el volumen estará en función del tipo de estudio a realizar y de la técnica que se aplique. En el caso de alimentos hemos de tener en cuenta al escoger el volumen, su representatividad y su fácil o cómoda manipulación. Las cantidades de muestra recomendadas por PASCUAL ANDERSON (1982) para vegetales son de 10 gramos; sin embargo estas cantidades sufren variaciones según los diferentes autores que trabajan en este tipo de muestras. Las cantidades oscilan entre 10 y 50 gramos (RODRIGUEZ DE LECEA y col. 1981. KRAMER y col. 1978. CONEJO DIAZ 1979. FOWLER y col. 1975 y 1976 y LARKIN y cols.1955a y 1955b).

b) Homogenización y diluyentes

Los métodos utilizados para el aislamiento y recuento de microorganismos presentes en alimentos sólidos requieren un

tratamiento previo con el fin de liberar en un medio líquido los microorganismos existentes en la superficie o en las estructuras internas. Los procedimientos utilizados para este fin son los siguientes: a) lavado de la muestra; b) trituración mediante aparatos eléctricos denominados homogenizadores, y c) empleo del aparato denominado "Stomacher" (ICMSF, 1983).

El lavado de la muestra se utiliza actualmente muy poco, salvo en aquellos lugares que no poseen cualquiera de los otros aparatos indicados. El inconveniente de este método se debe a que los microorganismos que se encuentran en las partes internas del vegetal se liberan dificilmente; después de dos horas de lavado solo se consigue que el 90% de los microorganismos pasen al medio líquido (ERCOLANI, 1976). Los problemas expuestos en el método anterior quedan resueltos mediante la trituración debido a que el sistema rompe las estructuras internas de los vegetales y permite una correcta homogenización (REEVES, 1973). Sin embargo es preciso tener un gran cuidado en la normalización de este procedimiento ya que una excesiva velocidad o una elevada temperatura puede lesionar las células microbianas y producir recuentos inferiores a los reales (ICMSF, 1983). El Stomacher está reemplazando a los anteriores métodos, ya que permite una correcta homogenización sin que las células microbianas sufran ningún deterioro (TUTTLEBEE, 1975).

El tipo de diluyente empleado es otro factor de gran importancia si se desean obtener recuentos óptimos. Muchos de los diluyentes habitualmente utilizados como el agua destilada, la solución salina, las soluciones de tampón fosfato, son tóxicas para algunos microorganismos, especialmente si se prolonga de forma excesiva el tiempo de exposición (ICMSF, 1983). Al estudiar la eficacia de los diluyentes anteriormente citados sobre diferen-

tes microorganismos, OBLINGER y col. (1976) encuentran que el agua de peptona al 0,1% es el diluyente que mejor favorece la recuperación de bacterias debido a que su protección sobre éstas es mayor que la que ejerce por ejemplo el tampón fosfato (THOMASON y cols. 1977a). No obstante HOADLEY y cols. (1974) proponen el empleo del tampón fosfato como diluyente para la recuperación de bacterias.

I.4.3. Recuento total de bacterias aerobias

El recuento de bacterias aerobias es un índice que nos permite conocer el número de microorganismos mesófilos presentes en una muestra. De todos los índices conocidos este es el más utilizado tanto para conocer la calidad microbiológica de un alimento como para conocer el estado sanitario de un agua (PASCUAL ANDERSON, 1982; OMS, 1976). Este índice tiene, no obstante, limitaciones en determinados alimentos como son los fermentados y madurados e incluso en algunos frescos ya que el número de bacterias en los mismos es muy elevado (ICMSF, 1983). Sin embargo, resulta bastante útil para comprobar los sistemas de limpieza, desinfección y el control de la temperatura durante los procesos de tratamiento industrial asi como para conocer si el transporte y almacenamiento del alimento se ha realizado de forma adecuada. Esta determinación también permite tener información sobre la alteración del alimento, su vida útil asi como fallos que hallan podido producirse durante la refrigeración o congelación. (BANWART, 1982 ; KARLA , 1967 y PASCUAL ANDERSON, 1982). En vegetales congelados es un buen índice del control de calidad debido a que el número de bacterias en alimentos sometidos a tan bajas tempera-

turas es pequeño (SILLIKER, 1963).

SPLITTSTOESSER (1973) afirma que la fuente de contaminación de las hortalizas congeladas se encuentra en las superficies de las máquinas de procesado. Esto queda confirmado al comprobar que los guisantes extraidos asepticamente de las vainas son practicamente estériles, mientras que los extraidos con la podadera pueden alcanzar recuentos de hasta 10^6 bacterias por gramo.

SWARTZENTRUBER Y COLS. (1982) determinan la calidad microbiológica de pastas alimenticias (macarrones y tallarines) en comercios al por menor y SCHWAB y cols. (1982) lo hacen en muestras de igual procedencia pero aplicada a especias y condimentos.

Un estudio bacteriológico de las aguas de la comarca del rio Aljarafe (Sevilla) se ha hecho por MATEOS NEVADO y col. (1980) para conocer la calidad bacteriológica de las aguas de riego y bebida de aquella zona.

a) Medios de recuento.

Cuando se desea conocer el número de bacterias presentes en una muestra se debe elegir aquel medio que permita el crecimiento del mayor número posible de microorganismos. Si, por ejemplo, nos encontramos con un alimento que posee como flora predominante estreptococos y el medio no lleva glucosa encontraremos falseados los resultados (HARRIGAN y col. 1979) . Parece ser que el agar Plate Count o agar recuento es el medio que ha dado mejores resultados debido a que posee una gran riqueza en nutrientes (THATCHER y CLARK,1973; FOWLER y col.1975;APHA,1976; DURAN y cols.1982).No obstante, existen una serie de medios que se utilizan ampliamente

en vegetales como son el agar triptosa-glucosa, agar triptosa soja y agar extracto de levadura-triptosa-glucosa (ERCOLANI, 1976; LARKIN y cols.1955a; RODRIGUEZ DE LECEA y col., 1981; SPLITTSTOESSER y col. 1966).

Un medio de recuento basado en caldo nutritivo solidificado con agar para la recuperación de bacterias aerobias de muestras procedentes de plantas de tratamiento es propuesto por JOHNSTON y col. (1979).

b) Técnicas de recuento.

Existen una gran variedad de técnicas de recuento de bacterias. Nosotros centraremos la atención sobre las técnicas de recuento de microorganismos en placa por ser estas las más utilizadas. De todas las técnicas de recuento en placa las más usadas son: Método de recuento standard en placa, también denominado método de vertido en placa; método de recuento en placa por extensión en superficie y método de recuento en placa por siembra de gotas en superficie (ICMSF, 1983).

El método de recuento standard se utiliza en muchos paises y casi de modo exclusivo en Norteamérica. Sin embargo, esta técnica posee algunos inconvenientes como son la dificultad para distinguir las colonias de las particulas de alimento y por otro lado la gran cantidad de material y tiempo que se precisa (HARDY y cols. 1977). No obstante, este método está tan arraigado y su exactitud y limitaciones son tan bien conocidas que se recomienda como método de referencia en caso de litigio (ICMSF, 1983). Algunos de los inconvenientes que presentaba esta técnica se han resuelto mediante la utilización de la técnica de siembra en

superficie debido a su fácil automatización con el consiguiente ahorro de tiempo y material. Al mismo tiempo facilita el crecimiento de aquellos microorganismos sensibles al calor que no resisten temperaturas de 45 ºC (MOSSEL, 1964). Con el fin de solventar los inconvenientes de los métodos citados anteriormente respecto al coste que suponen, se ha ideado la técnica de siembra de gotas en superficie que posee ventajas similares a las del caso anterior y que según estudios realizados no presentan diferencias significativas respecto a las dos técnicas ya citadas (KRAMER y col. 1978).

Una combinación del sistema "stomacher" aplicado con la técnica de placas en espiral ha sido propuesto por KONUMA y cols. (1982) con objeto de reducir el volumen de material de la técnica convencional.

Paralelamente a estas técnicas se han propuesto otras como la medida de la impedancia para muestras de vegetales congelados cuyas ventajas son la reducción del tiempo de incubación a 5 horas (HARDY y cols.1977) y las pruebas de reducción de colorantes (OMS, 1976).

Con el fin de obtener una buena información sobre la calidad higiénica de un alimento y de un agua es necesario controlar la temperatura y tiempo de incubación de las muestras. No existen normas concretas respecto a la temperatura. Sin embargo, en vegetales frescos, MOSSEL y col. (1956) opinan que la temperatura ideal sería la de 30-32 ºC debido a que la mayoría de los microorganismos patógenos crecen a esta temperatura así como los microorganismos responsables de alteraciones y aconsejan un período de incubación de 72 horas (OMS, 1976). No obstante algunos organismos internacionales como la AOAC (1975) aconsejan temperatura de 35 ºC durante 48 horas.

I.4.4. Recuento de bacterias coliformes

La utilización de las bacterias como indicadoras de la calidad sanitaria de un agua se remonta a 1880 cuando se identificaron Klebsiella pneumoniae y Klebsiella rhinoscleromatis como bacterias indicadoras de la contaminación humana. En 1885, Escherich descubrió en los excrementos humanos un gérmen al que denominó "Bacterium coli" posteriormente conocido como Escherichia coli el cual sería utilizado años más tarde como indicador de microorganismos patógenos en el agua (DRAPEAU y col. 1977). Este grupo indicador se amplió años más tarde debido al descubrimiento en el intestino humano de otras enterobacterias de características parecidas, surgiendo asi el empleo del término "coliformes" ahora denominados por algunos autores Enterobacterias lactosa positivas, para poner de manifiesto la contaminación fecal presente tanto en aguas como en alimentos.

a) Características y Distribución

La Organización Mundial de la Salud, así como diversos autores americanos, canadienses y británicos han propuesto una serie de definiciones que coinciden con la propuesta por la Legislación Española para el grupo coliforme. La más generalizada es aquella que las define como bacilos gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa a 37 ºC en un tiempo menor de 48 horas con producción de ácidos y gases.

El origen de los coliformes es muy diverso. Pueden proceder del intestino, de las aguas y del suelo (OGER y cols.1981) motivo

por el cual a veces su determinación no resulta adecuada cuando se utiliza como indicador de contaminación fecal. Unicamente el empleo de métodos que nos permitan conocer el origen de los coliformes y consecuentemente el de la contaminación podrán darnos un correcto control sanitario de las aguas o alimentos.

Existen una serie de especies pertenecientes a los géneros Escherichia, Enterobacter, Serratia, Citrobacter y Edwarsiella que se consideran como coliformes algunos de los cuales no se han encontrado sistemáticamente en heces y otros pueden poseer procedencias diversas (DRAPEAU y col. 1977; ESTRADA, 1983). Las especies que generalmente se aislan en las heces son: Escherichia coli, Citrobacter freundii, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae y Klebsiella phneumoniae.Este grupo de coliformes denominados coliformes fecales pueden definirse como bacilos gram negativos que fermentan la lactosa a 44,5 ºC (PASCUAL ANDERSON, 1982). Los coliformes crecen en los alimentos pero en el agua, aunque pueden mantenerse viables durante cierto tiempo, son sin embargo incapaces de multiplicarse. A temperatura normal de refrigeración estas bacterias no solo se mantienen viables sino que incluso puden llegar a reproducirse. A temperaturas de congelación o de pasteurización, por el contrario, serán eliminadas en un corto periodo de tiempo. La escala de pH en que pueden crecer los coliformes está comprendida entre 4,4-9,0 (JAY, 1978; BANWART, 1982; PASCUAL ANDERSON, 1982). Sin embargo, a temperaturas de refrigeración los coliformes se mantienen en aguas no potables durante al menos 24 horas (STANDRIDGE y col., 1977).

Debido al origen diverso de este grupo de microorganismos su distribución es muy amplia. Pueden encontrarse en gran variedad de alimentos los cuales se contaminan mediante el transporte, contacto con animales, insectos, plantas, agua, suelo, aire, manipuladores, etc. (GELDREICH y col. 1971; COYAL y cols. 1977).

Existen diversidad de opiniones respecto a la procedencia de los diversos géneros de coliformes. El género Citrobacter, Enterobacter y Klebsiella, se encontraban inicialmente en los vegetales (CANDIDO y col. 1955), pero a lo largo del tiempo estos géneros se han ido adaptando hasta llegar a formar parte en algunas ocasiones de la flora intestinal del hombre y animales de sangre caliente. Esta teoría puede confirmarse a partir de los resultados de diferentes autores en estudios sobre la presencia de coliformes en verduras frescas y congeladas. Aproximadamente en el 50% de las muestras de vegetales pueden aislarse coliformes tales como Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae y Citrobacter freundii (WERNER DE GARCIA y cols. 1978; WRIGHT y cols. 1976; RODRIGUEZ REBOLLO, 1974; ERCOLANI, 1976; FOWLER y col. 1976; RODRIGUEZ DE LECEA y col. 1981; MILLAN PEREZ y cols. 1980La irrigación de los cultivos con aguas de desecho supone según SADOSKI y cols.(1978b) un aumento en la contaminación de 38 veces respecto a los cultivos irrigados con agua limpia. Es por ello por lo que la presencia de coliformes en verduras así como de otros indicadores microbiológicos o microorganismos patógenos estará en función de la situación de los cultivos, época de recolección, proximidad a lugares habitados así como a las cualidades higiénicas de los manipuladores (PAPAVASSILIOU y cols. 1967; GELDREICH y col. 1971).

SADOVSKI y cols. (1978a) observan que cuando el riego con aguas residuales se hace por goteo, los niveles de contaminación disminugen.

MAXCY y col. (1972) estudian la calidad microbiológica de rodajas de cebolla para empanadas y encuentran niveles altos de coliformes.

En carnes y personal manipulador, STILES y col. (1981) aislan entre otros, E. coli biotipo I y confirman que la contamina-

ción de estas carnes procedía en muchos casos de los manipuladores.

Se han determinado coliformes fecales en guarderías de Atlanta por WENIGER y cols. (1983) y encuentran proporciones pequeñas de estos microorganismos.

Independientemente a la utilización de estos microorganismos como indicadores de contaminación, debido a su localización en el suelo, aguas asi,como en el aparato digestivo del hombre y animales. Se han descrito también casos de infecciones urinarias y de septicemias por especies del género Enterobacter. El género Serratia que durante mucho tiempo se le consideró totalmente saprofito siendo encontrado como formas libres en el suelo y aguas, posteriormente se les ha visto implicados en infecciones pulmonares y septisemias. Por otro lado el género Klebsiella aislado de gran variedad de alimentos vegetales es patógeno de vias urinarias y respiratorias y también se ha descrito como agente causal de meningitis, peritonitis, etc. El género Citrobacter aunque se le han achacado casos de diarreas e infecciones urinarias, sin embargo, no se consideran como verdaderos patógenos (RAMOS CORMENZANA, 1979).

b) Medios de recuento

Con el fin de seleccionar el mejor método para la enumeración de coliformes totales y fecales, la "International Commission on Microbiological Specifications for Foods", patrocinó una serie de ensayos comparativos en colaboración con diversos laboratorios (ICMSF, 1983). Los medios utilizados para esta experiencia fueron caldo lauril sulfato triptosa (LST), caldo lactosado biliado verde brillante (CLBVB), caldo lactosado (CL) y agar bilis lactosa rojo

neutro cristal violeta. Estos medios se utilizaron de forma combinada en diferentes tipos de alimentos y los experimentos se realizaron en diversos laboratorios con el fin de obtener resultados fácilmente homologables. Los distintos laboratorios llegaron a la conclusión de que no existen diferencias significativas respecto a los medios utilizados; únicamente fue inferior el recuento en el caso del caldo lactosado, y esto solo para un determinado tipo de alimento, por lo que la ICMSF (1983) en la redacción de sus conclusiones, indicó la falta de diferencias significativas entre los medios de recuento utilizados así como la recomendación e idoneidad de todos ellos. Este mismo estudio se realizó para la elección de una técnica idónea para los coliformes fecales en los cuales se parte de los medios descritos para los coliformes en general si bien se introducen algunas modificaciones cuya característica base es la temperatura de incubación que en lugar de ser como en los coliformes de 37 ºC, se realiza a 44,5 ºC. Los resultados obtenidos en los diferentes laboratorios no tuvieron diferencias significativas al igual que ocurrió en el caso mencionado anteriormente. Independientemente de estos estudios, también se han realizado otros en que se comparan los medios anteriormente citados. PIERSON y cols.(1978) encontraron que el LST es sin lugar a dudas el mejor medio de recuento de coliformes totales mientras que con el CLBVB y el caldo lactosado los recuentos resultaron inferiores. Los estudios de ABISS y cols.(1981) también pusieron de manifiesto que el medio CLBVB era el menos adecuado para el recuento de todos aquellos que se determinaron.

Otros medios que se utilizan en el recuento de coliformes son el formiato-lactosa-glutamato usado en jugo de manzana sobre el que no hemos encontrado estudios comparativos y el caldo lauril triptosa salicina triton X-100, medio que según STANDRIDGE

y col. (1981) ofrece buenos resultados para la determinación de coliformes en aguas residuales. De cualquier modo, los medios más utilizados para la confirmación de coliformes fecales son el agar eosina azul de metileno y el agar Endo en cualquiera de los tipos de muestras que se analicen (ICMSF, 1983).

c) Técnicas de recuento

El primer bacteriólogo que aplicó el método de las diluciones sucesivas para un análisis de aguas fue Foi de Miguel en 1880. A partir de entonces, las técnicas para la determinación de bacterias coliformes en aguas han ido evolucionando. Desde 1920 se viene utilizando practicamente en todo el mundo el procedimiento del tubo de fermentación como indicador de la calidad de las aguas (EVANS y cols, 1981a).

En la actualidad existen una serie de técnicas para la enumeración de las bacterias coliformes en aguas y alimentos. Las más utilizadas son la técnica de dilución en tubos o técnica del número más probable (NMP). La técnica de recuento en placa, aunque poco utilizada, su aplicación se ha limitado al análisis de alimentos. La técnica de filtración sobre membrana es utilizada solo para aguas y en algunos casos para bebidas.

La técnica del NMP es actualmente la más utilizada para la detección de coliformes en aguas y alimentos. Es aceptada como técnica oficial por gran número de paises y organismos internacionales para la investigación preliminar de coliformes (DRAPEAU y col. 1977). La legislación Española la aconseja para los análisis sistemáticos de aguas asi como el Servicio de microbiologia del Centro Nacional de Alimentación y Nutrición (PASCUAL ANDERSON,

1982). Esta técnica consta de tres pruebas; presuntiva, en la cual se informa sobre la probabilidad de la presencia de coliformes; confirmativa y prueba de identificación de las especies aisladas. La prueba confirmativa puede realizarse en tubo o en placa. El inconveniente principal de esta prueba radica en el tiempo de duración de la misma el cual se prolonga en la mayoría de los casos practicamente hasta las 72 horas. Precisamente, con el fin de solucionar este problema con respecto a los alimentos, se desarrolló el método de recuento en placa, el cual permite reducir el tiempo de análisis a solo 24 horas.

RAYMAN y cols. (1979) comparan la técnica del NMP y el método de recuento en placa para el recuento de E. coli en carne de vaca fresca y congelada. Encuentran que el segundo método da mejores resultados. A esta conclusión llegan RAY y col. (1978) en productos lácteos.

JOINT COMMITTEE REPORT (1980a) comprueban dos medios para el recuento de E. coli en aguas por el método del NMP y SILIKER y cols.(1979) operan con tres métodos para la detección de coliformes mediante la técnica del NMP sin encontrar diferencias. El mismo Comité ya citado (1980b) aconseja el caldo lauril-sulfato como test confirmativo de E. coli. La técnica citada ha servido a HUSSONG y cols. (1980) para el recuento total de coliformes en mariscos y aguas.

La técnica de filtración a través de membrana tuvo su desarrollo durante la Segunda Guerra Mundial. Actualmente la Legislación Española la recomienda como técnica alternativa para exámenes rutinarios de agua. Esta técnica posee grandes ventajas respecto a las anteriormente citadas como son la precisión, rapidez, comodidad, mayor representatividad y menor costo; sin embargo, posee el gran inconveniente de no poderse utilizar para aguas

turbias, ni homogenizados de alimentos debido al bloqueo de los filtros con residuos sólidos y al efecto de inhibición que puede ejercer sobre el crecimiento de los microorganismos las sustancias que quedan atrapadas en el filtro (CUINEA y cols. 1979). Así, por ejemplo, con aguas residuales esta técnica es menos efectiva que la del NMP y está además sujeta a interferencias motivadas por el género Aeromonas (GREEN y cols. 1977; MUÑOZ y col. 1979; TOBIN y cols. 1980).

Los métodos de filtración sobre membrana son de amplia aplicación en el análisis microbiológico de las aguas. Así PAGEL y cols. (1982) utilizan 4 filtros de membrana para la detección de E. coli en aguas residuales y GRABOW y col. (1979) comparan dos medios en el recuento de coliformes en aguas. También DUFOUR y cols.(1981) emplean el método de filtración de membrana en muestras de aguas de procedencia diferentes y JOINT COMMITTEE of the PHLS and SCA (1980c) realizan el recuento de coliformes y E. coli en aguas comparando dos medios.

En alimentos de origen vegetal y animal, SHARPE y cols. (1981) utilizan este tipo de técnica para la determinación de E. coli y de modo similar operan PETERKIN y col. (1981); SHARPE y cols. (1979a), SHARPE y cols. (1979b) en suspensiones líquidas y también, los mismos autores (1980) en productos lácteos.

EVANS y cols. (1981b) comparan la técnica de filtración sobre membrana con dos técnicas de NMP en aguas de bebida y demuestran que no existen marcadas diferencias en ambos métodos, e igualmente en alimentos, YOOVIDHYA y col. (1981) llegan a la misma conclusión.

Existen otra serie de técnicas cuyo fin primordial es el de ofrecer resultados en el menor tiempo posible. En realidad son mucho más complicadas y por tanto más difíciles de ejecutar en los

laboratorios medianamente dotados (KENARD y col. 1974). Entre ellos están la determinación de anticuerpos fluorescentes para coliformes fecales (ABSHIRE y col. 1973), cromatografía de gases (NEWMAN y col. 1975) y la medida de la impendancia usada por SILVERMAN y col. (1979) y MUÑOZ y col. (1979) para aguas residuales.

Si se considera necesaria la identificación de los distintos coliformes se pueden utilizar las pruebas que se indican en la Tabla VI.(RAMOS CORMENZANA, 1979).

d) Interés del recuento de coliformes

La presencia de bacterias coliformes en el agua se ha utilizado desde hace mucho tiempo como indicador de una eventual contaminación fecal (GUINEA y cols.1977 y OMS 1976). El aislamiento en las aguas de abastecimiento público de coliformes, puede indicarnos un mal tratamiento de las mismas, una recontaminación del agua tratada o bien incluso algún fallo en las técnicas de análisis (SAYLER y cols.1975; ICMSF, 1983; DRAPEAU y col. 1977).

A la hora de efectuar un informe sobre la calidad bacteriológica de un agua sería necesario identificar el tipo de coliforme que se ha aislado ya que la presencia de coliformes no fecales cuya existencia está comprobada puede dar lugar a una información poco correcta desde el punto de vista sanitario. No obstante, la determinación de estos indicadores tiene en algunos casos limitaciones, pero en ciertos paises de Europa, Estados Unidos y Canadá principalmente, se consideran todavía de primer orden en el control de las aguas de bebida (TOBIN y col. 1980). A pesar de ello, no

TABLA VI.- PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS COLIFORMES.

	Escherichia	Citrobacter	Enterobacter	Serratia	Klebsiella
Indol	+	-	-	-	-
Rojo de Metilo	+	+	-	(-)	-
Voges-Proskover	-	-	+	+	+
Citrato	-	+	+	+	+
Fenilalanina desaminasa	-	-	-	-	-
Arginina	-	+	(-)	-	-
Lisina	-	-	(+)	+	+
Ornitina	-	±	+	+	-
Glucosa	AG	AG	AG	A(G)	AG
Lactosa	+	(+)	+	(-)	+
Manita	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	±	+	+	+
Salicina	±	±	+	+	+
Adonita	-	-	(+)	(+)	+
Inosita	-	(-)	+	(+)	+
Dulcita	±	±	(-)	-	(±)
KCN	-	±	+	+	+
H_2S (en TSI)	-	-	-	-	-

debemos olvidar que aunque la falta de coliformes fecales en aguas y alimentos implica una ausencia de contaminación fecal próxima o remota, no nos garantiza necesariamente una ausencia de microorganismos patógenos (GUINEA y cols.1979; HARRIGAN y col. 1979).

La utilización de este parámetro de forma aislada para indicar la posibilidad de una contaminación fecal hace que en algunos casos puedan producirse resultados falsos, hecho que podemos observarlo en un brote de gastroenteritis citado por ICMSF (1983)

En el caso de las aguas, la cuantia de la contaminación fecal inicial no sufre alteraciones debido, como ya se ha indicado, a la incapacidad de estos microorganismos de multiplicarse en este medio (MORENO GARCIA, 1978). Este hecho sin embargo, no ocurre igual en los alimentos ya que en algunos de ellos estas bacterias pueden multiplicarse con gran rapidez y dar en los análisis resultados superiores respecto a la contaminación real o inicial (HARRIGAN y col. 1979). Los coliformes fecales constituyen un buen indicador de la contaminación de los alimentos. La valoración de este indicador en estos productos está en función del tipo de alimento y de su procesado. En vegetales frescos o en cualquier alimento fresco que se consuma en estado crudo estos indicadores resultan especialmente útiles (GELDREICH y col 1971). Con respecto a la determinación de coliformes totales, no resulta demasiado útil ya que estos alimentos pueden portar generalmente gran cantidad de bacterias coliformes como flora autóctona (OMS, 1976) y según los estudios realizados por RODRIGUEZ DE LECEA y col. (1981) en lechugas frescas, la determinación de estos microorganismos dificulta la interpretación sanitaria de las mismas ya que su presencia no implica necesariamente una contaminación fecal. De igual forma, en alimentos que han recibido un tratamiento para garantizar su

calidad higiénica, la presencia de niveles considerables de coliformes nos podrá indicar un tratamiento inadecuado y/o una contaminación posterior al tratamiento, producidos normalmente por el uso de materias primas, equipos sucios o un manejo no higiénico, con lo que se puede favorecer la multiplicación microbiana y permitir el crecimiento de toda una serie de microorganismos patógenos (ICMSF, 1983); HALL y cols. 1967; CONEJO, 1979; MAXCY, 1973). En alimentos congelados el aislamiento e identificación de bacterias coliformes, es sumamente complicado debido a la variación bioquímica que suelen sufrir los microorganismos, así como por la existencia de flora competitiva (FISHBEIN y col. 1964).

Además de la utilización de este grupo de microorganismos como indicadores de contaminación tambien pueden provocar la alteración de alimentos como es el caso de la acción del género Enterobacter sobre determinados componentes de la leche lo que la hace rechazable para la fabricación del queso (NAVARRO FILGUEIRA, 1980).

I.4.5. Recuento de escherichia coli

Escherichia coli, es el coliforme fecal más abundante ya que su habitat principal es el tracto intestinal del hombre y animales de sangre caliente. Por tanto, su presencia en aguas o alimentos nos proporcionará uno de los mejores índices que nos permita conocer la posible contaminación fecal de cualquier tipo de muestras.

a) Características y Distribución

E. coli, es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo inmóvil o móvil por flagelos peritricos, no esporulado y fermenta la lactosa con producción de ácidos y gases a 44,5 ºC (lo que le diferencia entre otras pruebas de los coliformes) en medios que contienen sales biliares u otros agentes selectivos equivalentes.

Este microorganismo se excreta por las heces en cantidades que varían entre 100 millones y 20 billones al día y tiene la característica de que, serológicamente, las cepas de origen animal suelen ser diferentes a las excretadas por el hombre, por lo cual este tipo de identificación puede indicarnos también su procedencia.

E. coli es muy sensible, como todos los coliformes, a las temperaturas de congelación si bien la supervivencia a estas temperaturas vendrá condicionada principalmente por el tipo de alimento. A temperatura de refrigeración sin embargo, las cepas de *E. coli* suelen ofrecer una resistencia bastante mayor, mientras que con el tratamiento de pasteurización éstas, al igual que el resto de enterobacterias, quedan totalmente destruidas. La supervivencia en los alimentos es similar a la de las salmonelas aunque en ocasiones los patógenos persisten después de la destrucción de *E. coli* (PASCUAL ANDERSON, 1982).

Como hemos señalado anteriormente, *E. coli* es un microorganismo cuya localización primaria es el intestino grueso del hombre y animales de sangre caliente. Los estudios realizados por GRIFFIN y col. (1940) con 6577 coliformes de diferentes procedencias nos muestran la estrecha relación de *E. coli* con el intestino humano y animal. Según MORENO GARCIA (1978) *E. coli* tipo I no ofrece dudas respecto a su origen humano o animal sin embargo

E. coli tipo II ofrece ciertas dudas en cuanto a su procedencia. *E. coli* ocupa un lugar predominante dentro del grupo de los coliformes fecales de los cuales alrededor del 90% son *E. coli* (BUTTIAUX y col. 1961; GELDREICH y col. 1971).

En cuanto a su distribución, ésta se encuentra estrechamente relacionada con sus características bioquímicas y fisiológicas. Al ser eliminado por las heces se depositan en todos aquellos lugares con los que pueden ponerse en contacto. En las aguas de desecho, por ejemplo, normalmente estos microorganismos se encuentran en una gran cantidad. Existen numerosísimos trabajos en los que se detecta la presencia de *E. coli* en aguas tanto naturales, residuales o marinas (CATALAN, 1969; REALI y cols. 1975; LALIBERTE y col. 1982; DRIFT y cols. 1977). REespecto a los alimentos, sobre todo los vegetales frescos, la identificación de *E. coli* es casi obligada ya que estos alimentos poseen coliformes como flora autóctona y solo su identificación nos servirá como valor indicativo de una contaminación fecal. (FREZZA y cols. 1977; BARNARD y cols. 1982; WERNER DE GARCIA y cols. 1978; FOWLER y col. 1976; CONEJO y cols. 1978; VELAUDAPILLAI y cols. 1969; TAMMINGA y cols. 1978; PAPAVASILIOU y cols. 1967; BARNARD y cols. 1982; REEVES, 1973; UBEDA, 1979; CONEJO, 1979; LARKIN y cols. 1956b).

b) Medios y Técnicas de recuento

Los medios y métodos de recuento de *E. coli* se describieron en el apartado dedicado a coliformes. En cuanto a la identificación de *E. coli* tipo I y *E. coli* tipo II sólo se realizará en casos especiales en los que se crea necesario y justificado.

El enorme volumen de trabajo de los laboratorios y la necesidad de obtener resultados lo más rápidamente posible hace que la identificacion no pueda realizarse como sistemática normal. En la Tabla VII se indican las pruebas bioquímicas para la identificación de E. coli tipo I y II.

c) Interés de la identificación

Debido a la localización de E. coli en el tracto intestinal y heces del hombre y animales de sangre caliente, su identificación puede constituir en cualquier momento un excelente indicador. E. coli es el indicador clásico de la posible presencia de patógenos entéricos en el agua constituyendo en dicho medio una medida de la cuantía de polución, mientras que en los alimentos sobre todo en los frescos, donde suele ser muy utilizado, los niveles detectados con frecuencia pueden estar influenciados por otros factores tales como la multiplicación del microorganismo, la muerte o inactivación o bien su adherencia a las partículas del alimento (ICMSF 1983). No obstante, la obtención de cifras importantes de E. coli pueden indicar bien una falta general de limpieza en el manejo del mismo, un almacenamiento inadecuado o incluso una contaminación de las materias primas. De igual forma que con los demás parámetros, la presencia de E. coli en las distintas muestras no indica necesariamente la existencia de algún microorganismo patógeno, sino únicamente la posibilidad o riesgo de que pueda estar presente (BANWART 1982). La Organización Mundial de la Salud considera que la identificación de E. coli debe ser la prueba elegida para indicar la calidad sanitaria de un alimento y no la detección de coliformes fecales (OMS, 1976). En cuanto a las aguas, E. coli constituye aún el primer indicador utilizado para la determina-

TABLA VII .- PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE *E. coli* tipo I y II.

	Indol	Rcjo de Metilo	Voges Proskauer	Citrato
E. coli I	+	+	-	-
E. coli II	-	+	-	-

ción de la contaminación. Su presencia no es admitida en aquellas consideradas como potables.

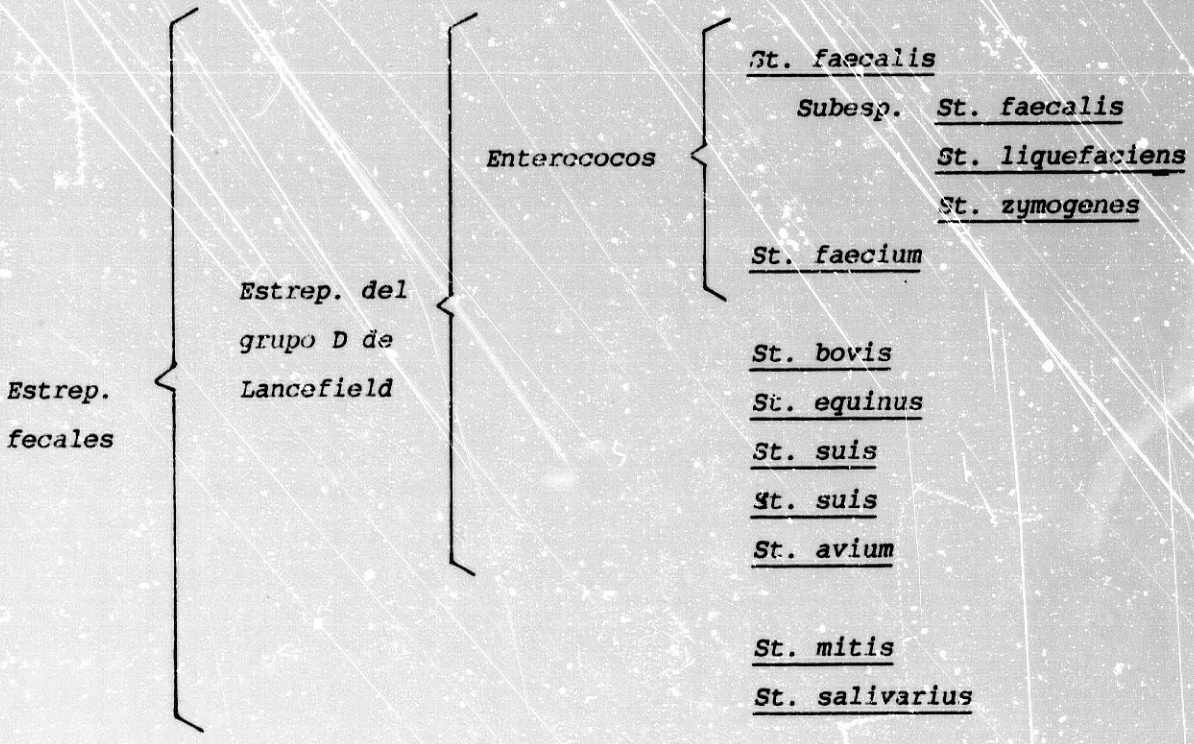
I.4.6. Recuento de estreptococos fecales

Alrededor del año 1900, una serie de bacteriólogos detectaron la presencia de estreptococos en heces de animales de sangre caliente, asi como en aguas contaminadas con restos de origen fecal. A partir de estos hallazgos la Metropolitan Water Board de Londres, propuso en 1910 la determinación de los estreptococos fecales como bacterias indicadoras de la posible contaminación fecal. Sin embargo, no fu hasta después de la Segunda Guerra Mundial, al conseguirse medios realmente eficaces para el aislamiento e identificación de estos microorganismos, cuando comenzaron a utilizarse como indicadores (DRAPEAU y col. 1977).

a) Caracteristicas y Distribución

Existe una evidente confusión en el uso de los términos estreptococos fecales, estreptococos del grupo D de Lancefield y enterococos. En la bibliografía es frecuente encontrar la denominación estreptococos fecales, pero debido a la falta de precisión ésta ha perdido en gran parte su valor. Algunos autores, cuando utilizan éste término lo hacen para referirse a los enterococos y otros a los estreptococos del grupo D de Lancefield. En el siguiente esquema se han recopilado las opiniones de diferentes autores acerca de cuales son o no las especies incluidas en cada

uno de los términos con el fin de completar aquellas clasificaciones que pudieran resultar insuficientes (ICMSF, 1983; ABSHIRE, 1977; MORENO GARCIA, 1978; PASCUAL ANDERSON, 1982; DRAPEAU y col. 1977).



Los estreptococos pertenecen a la familia Streptococcaceae, género Streptococcus. Son cocos gram positivos, aerobios o anaerobios facultativos ácidos a 37 ºC en un tiempo máximo de 48 horas, característica que se utiliza en su identificación.

Este grupo de bacterias es mucho más resistente que los coliformes cuando se les somete a condiciones extremas. Así, por ejemplo, en alimentos que se conserven entre 10 y 45 ºC pueden

desarrollarse sin dificultad, mientras que los coliformes habituales del intestino de mamíferos únicamente se mantendrían en estado latente (ICMSF, 1983). Son, por otro lado, muy exigentes en cuanto a su crecimiento e incapaces de crecer en medios simples con sales y azúcares como única fuente de carbono. Necesitan vitaminas del grupo B y otras sustancias orgánicas para el desarrollo. Sin embargo, crecen bien en caldos con un porcentaje de NaCl del 6,5% o incluso mayor, propiedad ésta que se utiliza para la preparación de medios selectivos de crecimiento. En aguas de mar contaminadas con materias fecales en las que han desaparecido todas las bacterias fecales, los estreptococos constituyen el único indicador que permanece viable (GUINEA y cols, 1979). Sobreviven fuera del tracto intestinal mejor que los coliformes. En alimentos ácidos y congelados así como en los tratados a temperaturas de 60-65 ºC resisten más que las cepas de E. coli. SHANNON y cols. (1965) han confirmado la mayor resistencia a la acción del cloro de los estreptococos con relación a los coliformes.

El principal lugar de localización de los estreptococos fecales es el intestino de los animales de sangre caliente (DRAPEAU y col 1977). La distribución de las diferentes especies en los animales es muy variada y compleja (MORENO GARCIA, 1978). Según un estudio realizado por BUTTIAUX y col. (1961) sobre heces humanas y porcinas, el 100% de las muestras examinadas poseían estreptococos siendo casi exclusiva de las heces humanas el Streptococcus faecalis, mientras que solo el 66 y el 88% respectivamente de las heces de vaca y oveja portaban estreptococos. A partir del intestino animal estos microorganismos pasan al suelo, a las aguas, o a los insectos y a través de estos, junto con los abonos de restos fecales pueden localizarse en los cultivos (MUNDT, 1976; CONEJO y cols. 1978; ERCOLANI, 1976; LARKIN y col. 1955b SPLITTSTOES

SER y cols 1961; MOSSEL 1969; INSALATA y cols. 1969). En las aguas residuales los estreptococos se encuentran casi en la misma proporción de muestras que E. coli (BUTTIAUX, 1959) y en aguas estancadas se aislan en una cantidad muy superior respecto a otras especies bacterianas (HAMMAD y col., 1982)

LARKIN y cols. (1955b) proponen el empleo de estreptococos fecales como indicadores sobre E. coli en vegetales congelados y estos autores (1955a) estudian igualmente los estreptococos fecales en una variedad de alimentos de origen vegetal. INSALATA y col. (1969) indican que el valor de los enterococos como indicadores de contaminación fecal depende del tipo de producto y procesado. La persistencia y distribución de bacterias indicadoras en los lugares de desagüe de pocilgas se ha estudiado por CHANDLER y col .(1981).

b) Medios de recuento

Se ha intentado repetidamente encontrar medios selectivos o diferenciales para la determinación cuantitativa de los estreptococos. Sin embargo, la mayor parte de los utilizados adolecen de estas características ya que frecuentemente crecen en ellos miembros de los géneros Lactobacillus, Pediococcus, Aerococcus y Leuconostoc (ICMSF, 1983). La mayoría de estos medios se basan en la tolerancia relativa de los estreptococos a condiciones adversas y utilizan un compuesto químico como la azida para inhibir el crecimiento de otros géneros de bacterias, junto con otra sustancia inhibidora o indicadora que ayuda a distinguirlos de otras especies de estreptococos.

El medio más utilizado para la prueba presuntiva es el

caldo azida dextrosa o medio de Rothe (AD) (SAYLER y cols. 1975 ; GUINEA y cols. 1979; KIRBEY y cols. 1978; HAMMAD y col. 1982). Posteriormente ABSHIRE (1977) encontró que el caldo de estreptococos D-enterococos da mejores resultados en las muestras de aguas residuales que el caldo azida o el caldo KF aconsejado por BANWART (1982). Hay otros medios como el caldo Kanamicina-esculina azida (KAA) utilizado por PASCUAL ANDERSON (1982) el cual lleva un antibiótico como la Kanamicina que inhibe el mayor número posible de otros géneros de bacterias. El medio más utilizado para la prueba confirmativa de estreptococos es el caldo Lit ky; además de llevar azida lleva etil violeta que inhibe todas aquellas bacterias que no sean estreptococos. Este medio no es aconsejado por SPLITTOESSER y cols. (.961) debido a la gran cantidad de falsos positivos que origina. Existe un medio como es la gentamicina talio-carbonato que posee la ventaja de obtener resultados en 16-18 horas frente a los anteriores en que el tiempo de incubación no es inferior a 48 horas (THIAN, S.T. y HARTMAN,P.A.1981)Además de los caldos anteriormente citados para la identificación de estreptococos, existen medios sólidos que pueden utilizarse en las pruebas confirmativas o bien incluso como única prueba sin necesidad de una nueva confirmación. Estos medios no suelen venir recogidos por la legislación a no ser que se siga la técnica de filtración sobre membrana. Los más utilizados son el agar sangre azida cristal violeta de Parker y el agar KF para estreptococos, de los cuales al parecer el más selectivo es el agar KF (ICMSF 1983). Aparte de estos se han desarrollado otros medios muy utilizados en aguas residuales como pueden ser el medio de estreptococos D-enterococos con cloruro de tetrazolio (ABSHIRE, 1977) o el agar kanamicina-esculina azida recomendado por PASCUAL ANDERSON (1982) para alimentos.

c) Técnicas de recuento

Para el recuento de estreptococos la Legislación Española recomienda dos métodos; el de los tubos múltiples o técnica del número más probable para análisis sistemáticos y el método de filtración sobre membrana como método alternativo. Sin embargo, para aguas residuales, aunque este último método es recomendado por SAYLER y cols. (1975) y por BERG y cols. (1978) posee serios inconvenientes como el atoramiento de los filtros.

Cuando se desean estudiar los estreptococos presentes en muestras de alimentos, sobre todo si se sospechan que están muy contaminados, la técnica más aconsejada es la de recuento en placa en sustitución de los dos anteriores (ICMSF, 1983; PASCUAL ANDERSON, 1982).

Existen otra serie de técnicas cuyo fin es disminuir el tiempo de análisis pero su utilización debido a la complejidad y coste no es muy frecuente. Pueden citarse entre otros la inmunofluorescencia (PUGSLEY y col. 1975), tipificación por fagos (CAPRIOLI y col. 1975) y el ensayo de contrainmunofluorescencia (PORTAS y cols. 1976).

d) Interés del recuento de estreptococos fecales

La determinación de estreptococos fecales en aguas ha contribuido en la actualidad a centrar el concepto de contaminación fecal. La razón por la que este grupo de microorganismos se consideran como buenos indicadores fecales es debida a la ausencia de los mismos en aguas puras, suelos o lugares que estén exentos de contaminación fecal, argumento que no resulta válido para

el grupo coliforme, debido a que su presencia no nos asegura la existencia de una contaminación fecal (GUINEA y cols.1979).

Este grupo de microorganismos necesita una gran cantidad de nutrientes para el desarrollo. La resistencia a los procesos de cloración es la causa de que perduren en las aguas durante tanto tiempo. Este hecho no sucede en el caso del grupo de los coliformes. Las cepas de Citrobacter aerogenes poseen una gran capacidad de multiplicación en aguas contaminadas y falsean de este modo los resultados (DRAPEAU y col. 1977). La cantidad de estreptococos en aguas contaminadas es siempre inferior al de coliformes. Llega en ocasiones a ser incluso 13 veces inferior en las aguas de alcantarillado (LISTKY y cols.1953) y se mantienen en una proporción de 4:1 con superioridad de los coliformes (GELDREICH y col. 1969; SAYLER y cols. 1975). DRAPEAU y col. (1977) hacen una recopilación de los resultados obtenidos por varios autores en aguas contaminadas e indican que la relación coliformes-estreptococos se mantiene entre 4,4 y 27,9.

Numerosos autores opinan que a causa de la resistencia de este grupo de microorganismos a temperaturas extremas de conservación de los alimentos, a las que, microorganismos patógenos de los géneros Salmonella y Shigella, entre otros, serían sensibles, hace que este parámetro no sea el más adecuado para indicar la calidad higiénica del alimento, si bien puede informar sobre la eficacia o no del proceso seguido (ICMSF, 1983).

BUTTIAUX (1959, 1961) opina que para ciertos alimentos naturales, la asociación de coliformes y estreptococos puede ofrecer una información más satisfactoria sobre la calidad sanitaria de los mismos. No obstante, este indicador puede ser de gran importancia como control de los sistemas de limpieza y desinfección de grandes industrias debido a su resistencia a la desecación,

temperaturas elevadas y a los detergentes y desinfectantes.

Se han descrito intoxicaciones alimentarias debido a la ingestión de alimentos que portaban estreptococos. Sin embargo, no se reconoce de forma general la capacidad de los enterococos para producir estas intoxicaciones y, asimismo, tampoco se conoce lo suficiente de las especies o serotipos responsables ni incluso el mecanismo por el cual pueden llegar a producir dichas intoxicaciones (ICMSF, 1983). Aparte de los posibles casos de intoxicaciones asociadas a los enterococos, estos pueden tambien comportarse en ocasiones como patógenos oportunistas y por ello no es poco frecuente encontrarlos en casos de infecciones urinarias, de meningitis neonatales, endocarditis, septicemias, etc. (DRAPEAU y col. 1977).

I.4.7. Recuento de Clostridios sulfito reductores

Los clostridios sulfito-reductores constituuen un grupo de microorganismos cuya procedencia principal es el intestino humano o animal, si bien, en algunos casos pueden poseer un habitat telurico (RODIER, 1981). Estos microorganismos poseen la capacidad de formar esporas. Debido a la existencia de estas formas de resistencia junto con su origen fecal se han venido utilizando durante mucho tiempo como indicadores de contaminación fecal de las aguas.

El número de clostridios sulfito-reductores en las heces es muy inferior al de coliformes y estreptococos fecales, por lo que este indicador no se debe utilizar en sustitución de los dos anteriores. No obstante, su presencia en las aguas carentes de E. coli puede informar sobre la posibilidad de contaminaciones intermitentes o lejanas. Por ello será necesario una mayor frecuencia de muestreo (GUINEA y cols.1979).

La procedencia telúrica en algunos casos de este grupo de microorganismos junto con su pequeña cantidad en las heces

hace que este indicador obligue a ciertas reservas (RODIER 1981; CANDIDO y col. 1955). Así pues, la gran supervivencia de las formas de resistencia puede ser causa de una errónea información sobre la calidad microbiológica del alimento en un momento dado al encontrarse que hayan podido desaparecer la mayoría de los microorganismos entéricos presentes en un principio. (BANWART, 1982). Frente a todos estos inconvenientes existen sin embargo autores como BUTTIAUX (1959) que lo aconsejan en detrimento del uso de los coliformes y la Legislación Española lo aconseja sobre todo en estudios epidemiológicos.

a) Características y Distribución

Este grupo de bacterias pertenece a la familia Bacillaceae y dentro de ésta al género Clostridium. Poseen una morfología bacilar, son anaerobios y tienen la propiedad de formar esporas. La característica esencial que posee este grupo y que se utiliza para su identificación es la de producir SH_2 a partir de los sulfatos y sulfitos presentes en el medio, por la acción de un sulfitoreductasa endocelular que roduce el sulfito que se encuentra en contacto con el cuerpo celular produciéndose el ennegrecimiento solo en la zona próxima a la espora (GUINEA y cols. 1979). Los valores de pH necesarios para su desarrollo se encuentran comprendidos entre 5,5 y 9 y el máximo crecimiento se realiza a temperaturas comprendidas entre 37 y 47 ºC aunque tambien pueden desarrollarse a 20 ºC. Las formas esporuladas son muy resistentes tanto al frio como al calor y son capaces de resistir a las dosis habituales de antisépticos como el cloro.

La distribución de estos microorganismos en la naturaleza

es muy extensa. Se encuentran en el suelo, en el aire donde pueden permanecer largos periodos de tiempo y en aguas o alimentos que hallan tenido contacto con materias fecales (DUDLEY y cols. 1980; HOLTZAPFFEL y col. 1968). En las heces, estos microorganismos se encuentran en cantidades variables según las poblaciones elegidas. Por ejemplo, en las heces animales se encuentran en cantidades comprendidas entre 10^3 a 10^9 bacterias/gramo, mientras que en las humanas aparecen valores inferiores a 10^2 ó 10^4 bact./gramo (BANWART, 1982). En aguas naturales o superficiales que no hallan tenido contacto con restos fecales raramente son aislados estos microorganismos (GUINEA y cols, 1979).

b) Medios y Técnicas de recuento

Los medios utilizados para la identificación de Clostridios sulfito reductores suelen llevar incorporados sulfatos o sulfitos y alguna sal soluble bien de plomo o de hierro con el fin de producir un precipitado de color negro. La Legislación Española recomienda el agar de Wilson-Blair al que se le añade sulfito férrico y alumbre de hierro.

Existen otros medios que llevan incorporados antibióticos con el propósito de seleccionar los clostridios como el agar sulfito-polimixin-sulfadiacina de MOSSEL y col. (1956) o el agar triptona sulfito-cycloserina aconsejado por PASCUAL ANDERSON (1982) ya que estos microorganismos poseen mayor resistencia a la cicloserina que a la sulfadiazina, polimicina o neomicina.

La técnica más comunmente usada para el recuento de clostridios es la de siembra en tubos en profundidad que nos permite un fácil recuento de las esporas, técnica aconsejada por la Legislación Española.

I.5. GENERO SALMONELLA

I.5.1. Historia

El género Salmonella fue descrito por primera vez en 1880 por el alemán Karl Joseph Eberth. La salmonela identificada recibió el nombre de Eberthella typhosa o Bacillus typhi, pero posteriormente cuando este microorganismo se consiguió aislar en cultivo puro se le comenzó a denominar como bacilo de Eberth-Gaffky debido a su descubridor asi como al primer microbiólogo que consiguió aislarlo, Georg T.A. Gaffky.

Los microorganismos descubiertos en el siglo pasado que poseían las caracteristicas descritas para el género encontrado por Eberth se les denominaba Bacillus, si bien, algunos años más tarde se les asignó el nombre de Salmonella en recuerdo al bacterióloqo americano D.E Salmon.

Años más tarde, en 1888, Gaertner descubrió que el agente etiológico responsable de una intoxicación producida por el consumo de carne, poseía caracteristicas similares a las descritas para el Bacillus typhi, por lo que se denominó a este microorganismo como Bacillus enteritidis, hoy dia conocido como Salmonella enteritidis. En 1892 Loeffer, consiguió aislar de un ratón otro bacilo semejante, al que denominó Bacillus typhimurium y, a partir de entonces, la bibliografía ha ido recogiendo gran cantidad de especies correspondientes al género Salmonella. Ya en 1940 se conocían 100 serotipos de este género, pero ha sido en los últimos años cuando el número de especies de Salmonella conocidas ha experimentado un incremento espectacular, hasta ser en 1981 2.072 los serotipos identificados (LE MINOR,1983).

I.5.2. Nomenclatura y clasificación

La clasificación de los diferentes géneros bacterianos y más concretamente el del género **Salmonella**, no puede considerarse como perfecta debido principalmente a las dificultades que implica el conocimiento de la relación genética entre las diferentes especies, géneros o familias y su filogenia más o menos relacionada. No obstante, es necesario indicar que si bien, como hemos señalado, la clasificación actual del género **Salmonella** en base a sus serotipos no es todo lo perfecta que se desaría, la utilidad en el campo práctico asi como el interés para estudios epidemiológicos, hacen de dicha clasificación una de las mejores desarrolladas dentro del campo de la microbiología. En el momento actual, es imposible definir un género o una especie en el sentido Linneano, tal como se deduce por ejemplo de las discusiones y controversias surgidas en torno a considerar el grupo **Salmonella** bien como un género o bien como unas pocas especies que englobarían a más de las dos mil descritas hasta la fecha (LE MINOR y cols. 1982a).

En un principio, la denominación de los serotipos de **Salmonella** se hizo siguiendo la nomenclatura linneana, es decir, evocando el origen de la enfermedad y la especie zoológica en la cual se aisla el microorganismo; de este modo surgieron, **S. typhimurium**, **S. bovis-morbificans** y **S. abortusovis** entre otras. Sin embargo a veces la especificidad del huesped no es tal, ya que frecuentemente una misma especie puede reproducirse y provocar enfermedades en muy distintos animales, motivo por el cual ésta denominación de especies se abandonó practicamente de forma inmediata. De este modo, se dió paso a la denominación según el origen geográfico en que se identificó por primera vez, como por ejemplo la **S. helsinky** y **S. biafra.**

Años más tarde Kauffman y Edwards propusieron una clasificación del género Salmonella en tres especies; Salmonella choleraesuis (especie tipo), S typhi y S. enteritidis y en 1965-66 KAUFFMANN las subdivide en cuatro subgéneros a los cuales designó con los números romanos I, II, III y IV. La confusión en la nomenclatura fué complicándose cada vez más por la designación de Arizona como un género distinto de Salmonella si bien KAUFFMANN (1960) la introduce dentro del subgénero III del género Salmonella debido a la identidad entre sus factores antigénicos.

Una simplificación del diagnóstico serológico del género Arizona se debe a KAUFFMANN y col. (1963c) clasificándolo dentro del Subgénero III del género Salmonella.

Según los caracteres bioquímicos y antigénicos de este género LE MINOR y col. (1970) subdividen el género Salmonella en 4 especies que se corresponden con los subgéneros de Kauffmann y son S. Kauffmannii, S. salamae, S. arizonae y S. houtenae. Ultimamente LE MINOR y cols. (1982) proponen una nueva nomenclatura d Salmonella según las prescripciones dadas por el Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias y que consiste en una especie tipo la Salmonella choleraesuis la cual queda dividida en las siguientes subespecies:

1) S. choleraesuis subespecie choleraesuis subes nov. compuesta por todas las cepas anteriormente designadas al subgénero I.

2) S. choleraesuis subesp. salamae subesp. nov. correspondiente al sub. II.

3) S. choleraesuis subesp. arizonae comb. nov. compuesta de los serovares monofásicos del sub. III

4) S. cholerae subesp. diarizonae subesp. nov. compuesta del anterior subgénero III.

5) S. choleraesuis subesp. houtenae subesp. nov. correspondiente al sub IV.

6) S. choleraesuis subesp. bongor subesp. nov. compuesta por las cepas fermentadoras del dulcitol, ONPG y KCN.

I.5.3. Características morfológicas y bioquímicas

Las salmonelas son bacilos gram-negativos. Poseen un diámetro de 0,7-1,5 micras y una longitud de 2,0-2,5 micras. Generalmente son móviles por flagelos perítricos. Pueden perder la movilidad por mutación y existe un tipo que es Salmonella gallinarum o S. pullorum que no posee flagelos.

El tamaño de las colonias es de 2-4 mm aunque existen ciertas salmonelas que ocasionalmente puede formar colonias pequeñas, de aproximadamente 1 mm (LE MINOR 1984)

Estas bacterias se tiñen con gran facilidad con los colorantes usuales como son el azul de metileno y la fuchsina y al microscopio podemos observar formas cocobacilares o bacilares sin una ordenación determinada. Los flagelos pueden observarse mediante la tinción de Leifson. Cuando estos microorganismos crecen sobre agar pueden aparecer dos tipos de colonias variantes lisas o rugosas. Las variantes lisas dan lugar a colonias convexas y brillantes mientras que las rugosas originan colonias granulosas.

La morfología de las colonias de Salmonella es muy variada. En agar común por ejemplo estas colonias poseen un tamaño de 2-3 mm si bien en el caso de S. abotus-equi, S. typhisuis o S. abortusovis las colonias en este agar tienen solo 1 mm de diámetro. A veces pueden aparecer colonias diminutas de S. typhi o de otras salmonelas que resultan ser menos tolerantes a la temperatura,

a valores de pH extremos o presentan ciertos requerimientos nutricionales como son cisteina u otros tipos de aminoácidos (STOKES y col. 1957). Esta morfologia se verá también afectada según procedan de cepas viejas o de sucesivos subcultivos (KNIGHT, 1936; BRAUN, 1948).

Las características bioquímicas de este grupo son las generales de la familia Enterobacteriaceae, es decir, bacilos anaerobios facultativos oxidasa negativos y catalasa positiva, reducen los nitratos a nitritos y utilizan la glucosa por via solo fermentativa (LE MINOR, 1984). Además de las características comunes de la familia poseen otra serie de propiedades bioquímicas que son idénticas en la mayoría de las especies que integran dicho género, pero que en algunos casos resultan útiles como complemento del análisis antigénico.

Estas propiedades incluyen además de las ya citadas la producción de sulfuro de hidrógeno sobre agar TSI. Utilizan el citrato como única fuente de carbono. Generalmente la reacción de la lisina y ornitina descarboxilasa es positiva. Son ureasa negativos y no desaminan el triptófano ni la fenilalanina por via oxidativa. Generalmente no fermentan la sacarosa, salicina, inositol y no producen lipasas ni desoxyribonucleasas (LE MINOR, 1984).

La mayoría de las salmonelas producen gas, sin embargo, S. typhi, es una importante excepción, nunca produce gas. El sulfuro de hidrógeno lo producen la mayoría de las salmonelas pero algunas cepas de S. choleraesuis, y la mayoría de S. paratyphi A no lo producen. Igualmente ocurre con el citrato que no utilizan ni S. typhi ni S. paratyphi A. El malonato solo es positivo para S. arizonae.

Por otro lado S. paratyphi A no descarboxila la lisina

como lo hace el resto de las especies e igual le ocurre a S. typhi con la ornitina (LE MINOR, 1984).

La mayoría de las especies del género Salmonella no fermentan la lactosa, aunque muchas cepas de S. arizonae la fermentan rápida o lentamente, en cuyo caso poseen actividad β-galactosidasa.

Un hecho que puede ser paradójico es el de la especie tipo del género, S. choleraesuis, la cual es bioquímicamente atípica ya que no fermenta la trealosa ni tampoco la arabinosa. Existen autores que consideran a S. gallinarum y S. pullorum como una única especie al poseer ambas los mismos determinantes antigénicos. TRABULSI y cols. (1962) mantienen sin embargo, la teoría de su diferenciación, ya que estos dos serotipos poseen características bioquímicas diferentes como son la rápida o tardía descarboxilación de la ornitina, así como la producción de ácidos de S. pullorum

Las pruebas bioquímicas utilizadas por KAUFFMANN (1965, 1966) para diferenciar los 4 subgéneros de Salmonella se basan en sus características metabólicas según las cuales se diferencia el subgénero I del resto debido a la proteolisis de la gelatina y la utilización del d-tartrato. El grupo Arizona queda incluido en el subgénero III y se diferencia de los otros subgéneros por la fermentación del dulcitol y la prueba del ONPG. Años más tarde, LE MINOR y cols. (1979) propone la fermentación del galacturonato con el fin de distinguir las salmonelas del subgénero I y III monofásico de las del subgénero II, III difásico y IV. Todas estas diferencias aparecen esquematizadas en la Tabla VIII, junto con las correspondientes a un nuevo subgénero V propuesto por Le Minor (LE MINOR, 1984). Este nuevo subgénero crece en presencia de KCN como le ocurre al subgénero IV; son lactosa, malonato y gelatina negativos; y dulcitol y mucato positivos como el subgénero I.

TABLA VIII.- CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LOS SUBGENEROS DEL GENERO SALMONELLA

	SUBGENEROS				
	I	II	III	IV	V
β-galactosidasa (Test ONPG)	-	+ ó x	+	-	+
Producción de ácidos desde:					
Lactosa	-	-	+ ó x	-	-
Dulcitol	+	+	-	-	+
Mucato	+	+	d	-	+
Galacturonato	-	+	d	+	+
Utilización de:					
Malonato	-	+	+	-	-
d-Tartrato	+	- ó x	- ó x	- ó x	-
Hidrólisis de la gelatina	-	+	+	+	-
Crecimiento en presencia de KCN	-	-	-	+	+
Habitat de la mayoría de cepas:					
Animales de sangre caliente	+	-	-	-	-
Animales de sangre fria y ambiente	-	+	+	+	+

+ Positivo para el 90% ó más de cepas en 1-2 dias

d Positivo para 11-89% de cepas en 1-2 dias

- Positivo para 0-10% de cepas en 1-2 dias

x Tardía e irregularmente positivas (3-7 dias)

TABLA IX .- CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LOS 6 SUBGENEROS O TAXONES EN QUE LE MINOR DIVIDE EL GRUPO SALMONELLA.

TAXON	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	T_6
Dulcitol	+	+	-	-	-	+
ONPG	-	-	+	+	-	+
Malonato	-	+	+	+	-	-
Gelatinasa	-	+	+	+	+	-
Crecim. en KCN	-	-	-	-	+	+
d y l-tartrato	+	-	-	-	-	-
Galacturonato	-	+	-	+	+	+
γ-glutamiltransferasa	+	+	-	+	+	+
β-glucuronidasa	d	d	-	+	-	-
Mucato	+	+	+	-(70%)	-	+
Salicina	-	-	-	-	+	-
Lactosa	-	-	-(75%)	+(75%)	-	-
Lisis por el fago OL	+	+	-	+	-	d

LE MINOR (1983) propone una división del género Salmonella en 6 subgéneros o taxones, los cuales poseen como especie tipo S. cholaraesuis. Las características bioquímicas vienen recogidas en la Tabla IX.

I.5.4. Cultivo y aislamiento

Los microorganismos que comprenden este género poseen en general pocas exigencias para su crecimiento y desarrollo. Pueden crecer rápidamente en los medios de cultivo usuales que contengan glucosa y sales amónicas como fuente de carbono y energía. Se conocen cepas que son más exigentes para su desarrollo al necesitar por ejemplo, triptófano. Las sales biliares facilitan su crecimiento y además presentan la ventaja de inhibir el de muchos otros microorganismos. Los márgenes de pH para el crecimiento de los microorganismos del género Salmonella son muy pequeños; están comprendidos entre 6-8 mientras que las temperaturas necesarias para su desarrollo oscilan entre los 15 y 43 ºC, situándose al parecer la temperatura óptima en torno a los 37 ºC.

A pesar de la gran cantidad de métodos ensayados en el aislamiento de salmonelas y de las pocas exigencias de este grupo de microorganismos, no ha sido posible aún desarrollar ningún método que permita garantizar la recuperación de todos los serotipos de Salmonella a partir de las aguas o de diferentes productos alimenticios sometidos a variadas condiciones de preparación y conservación (ICMSF, 1983).

Los métodos necesarios para el aislamiento e identificación de las salmonelas procedentes de aguas y alimentos pueden dividirse en seis etapas sucesivas, algunas de las cuales no suelen

utilizarse en muchos laboratorios, bien porque el tipo de muestra no lo requiera o porque existan casos en que no se considere necesario. Sin embargo, para la obtención de una información lo más satisfactoria posible, las etapas que se deben seguir son las siguientes: a) enriquecimiento de la muestra no selectivo, que se usará en aquellos alimentos que se hallan visto sometidos a tratamientos industriales o de almacenamiento en los cuales las salmonelas pueden estar dañadas; b) enriquecimiento selectivo cuyo fin consiste en favorecer el crecimiento de las salmonelas en un ambiente en el cual pueden competir favorablemente con otra serie de bacterias; c) siembra en placa de medios sólidos selectivos y diferenciales con el fin de observar las colonias sospechosas que deberán ser identificadas; d) identificación de las colonias sospechosas mediante pruebas bioquímicas; e) análisis antigénico y f) tipificación por medio de bacteriófagos. Estas dos últimas determinaciones presentan un gran interés epidemiológico (ICMSF, 1983).

El enriquecimiento no selectivo, tradicionalmente se ha realizado cultivando las muestras en caldo lactosado. Con posterioridad diversos investigadores han realizado estudios sobre la composición del medio de preenriquecimiento y han llegado a la conclusión de que su composición no es tan crítica como se pensaba. Así, por ejemplo, los laboratorios europeos normalmente utilizan agua de peptona tamponada en lugar de caldo lactosado, y según el tipo de muestra estudiada se han utilizado sucesivamente agua destilada, el caldo lactosado con un 1% de tergitol o agua de peptona tamponada con un 0,22% de tergitol también como medio de preenriquecimiento (ICMSF, 1983).

El preenriquecimiento en agua de peptona tamponada seguido de un enriquecimiento en caldo tetrationato ha ofrecido mejores

resultados que la siembra directa en caldo tetrationato con verde brillante (THOMASON y col., 1978).

D'AOUST (1978) ha confirmado la eficacia a 32 aditivos en la recuperación de Salmonella typhimurium dañadas por el calor en agar-levine.

La utilización de medios de enriquecimiento para el aislamiento de salmonelas data del siglo pasado en que Chantenesse y Widal en 1887 encontraron que la adición de fenol a un medio utilizado para el aislamiento de S. typhi aportaba propiedades selectivas lo cual, junto con el estudio de las temperaturas límites de crecimiento empleadas por Rodet en 1889 para S. typhi procedente de aguas contaminadas, hizo pensar en la necesidad de caldos y temperaturas límites de enriquecimiento para el aislamiento de salmonelas (HARVEY y col. 1979). Años más tarde se utilizó el caldo selenito para el aislamiento de Salmonella typhi debido a las propiedades inhibitorias que posee el selenito sódico, pero no fué aceptado de forma general hasta que Leifson probó varios medios con distintas concentraciones y aún hoy dia se considera como uno de los mejores caldos de enriquecimiento para el aislamiento de S. typhi (HARVEY y col. 1979). Este medio es aconsejado por la ICSMF (1983) como medio de aislamiento de microorganismos del género Salmonella y concretamente de S. typhi. Posteriormente MULLER (1923) descubrió un caldo de enriquecimiento con tetrationato sódico que años más tarde sería modificado por KAUFFMANN (1930 1935) mediante la adición de sales biliares y verde brillante con el fin de evitar el crecimiento de organismos competitivos tales como los coliformes, Proteus y Pseudomonas, cuya abundancia en el medio haría practicamente imposible el aislamiento de salmonelas. A veces, cuando en el estudio se estima oportuno, suele añadirse al medio noboviocina, antibiótico éste muy eficaz contra el crecimiento de Proteus (HARVEY y col. 1979).

Se sabe que bajo ciertas condiciones de deshidratación ciertos coliformes pueden morir mientras que Salmonella y Shigella permanecen viables. Esta propiedad la utilicó RAPPAPORT y cols. (1956) en la elaboración de un medio que lleva su nombre que aún no siendo útil para las especies S. typhi, S. pullorum y S. gallinarum resulta muy eficaz para el resto de salmonelas debido a su potente poder inhibidor. A parte de los medios ya descritos, la bibliografia recoge otra serie de medios como aquellos que utilizan sales de estroncio para el aislamiento de S. typhi o sulfito de bismuto para la recuperación de S. typhi de aguas residuales indicados por HARVEY y col. (1979) o bien el caldo GN de Hajna y el caldo E.E de Mossel (HARVEY y col. 1979).

Existen gran cantidad de trabajos en los que se estudia el caldo de enriquecimiento más idóneo tanto para los diferentes tipos de muestras así como para los distintos serotipos de Salmonella con el fin de restringir al máximo el número de variables de selección. La ICMSF (1983) recomienda el uso del caldo selenito-cistina y caldo tetrationato verde brillante ambos incubados a 43 ºC como medios idóneos para el aislamiento de salmonelas. El resto de los estudios realizados en los cuales se comparan varios tipos de medios sobre diferentes tipos de muestras tanto de aguas residuales como de alimentos asi como las temperaturas de incubación nos permiten concluir, en general, que el medio Rappaport es el de mayor capacidad inhibitoria y es aconsejado junto con el caldo de Muller Kauffmann o caldo tetrationato para el aislamiento de salmonelas en aguas residuales y el caldo selenito manitol en el aislamiento de S. typhi (HARVEY y col. 1980, 1981; VASSILIADIS y cols. 1974, 1976a, 1976b, 1978, 1979; XIROUCHAKY y cols. 1982, ANDERSON y col. 1965; EDGAR y col. 1979; SMITH 1977; NABBUT, 1973; CHUNG y col. 1970; VASSILIADIS, 1968; GRAU y col. 1972). Un estudio

comparativo que nos parece interesante destacar es el realizado por HARVEY y cols.(1979) para muestras de aguas residuales. Utilizan distintos medios comerciales y otros preparados en su laboratorio. Encuentran resultados mejores en las muestras enriquecidas con los medios preparados por ellos que con los comerciales.

Los medios de agar selectivos o medios de aislamiento selectivos, generalmente contienen sustancias inhibidoras que posibilitan la selección de los microorganismos que en ellos puedan crecer y, además, un sistema indicador que permite diferenciar determinados caracteres bioquímicos en las colonias que crecen en él. Los laboratorios tienen a menudo, preferencias hacia determinados medios diferenciales. Pruebas realizadas en coordinación con diferentes laboratorios confirmaron que los mejores resultados se obtuvieron con aquellos medios con los que se estaba más familiarizado, motivo por el cual la ICMSF (1983) recomienda que cada laboratorio emplee un medio diferencial de su elección, pero que de forma adicional utilice tambien agar sulfito de bismuto y agar verde brillante. Aparte de estos medios recomendados por la ICMSF existen otros como son el agar lactosa rojo fenol verde brillante, medio ampliamente utilizado en Europa, Agar Mac Conkey, agar citrato desoxicolato, medio Salmonella-Shigella (SS), agar Hektoen enteric (KING y col., 1968) y agar Wilson Blair. Todos estos medios se han estudiado de forma comparativa con el fin de determinar en cada uno de ellos su eficacia frente a los distintos tipos de muestras. En aguas residuales por ejemplo, el medio SS dió muy buenos resultados (LIVINGSTONE 1965) mientras que el agar ver brillante y agar Hektoen enteric en alimentos no ofreció marcadas diferencias (GOO y cols. 1973). Este hecho no ocurría cuando se utilizó el agar xilosa lisina verde brillante y el agar verde brillante sulfadiazina (HARRINGTON y col .1970) este último

modificado por WATSON y col. (1978) mediante la adición de sulfacetamida y ácido mandélico. La modificación del agar lisina hierro cistina por REAMER y cols. (1974) ofrece una clara diferenciación de las colonias correspondientes al género Salmonella.

Los medios de aislamiento de salmonelas han sido comparados en orden a su mayor eficacia. ANDREWS y cols. (1977) consiguen en muestras de ancas de rana importadas los mejores resultados con agar sulfito de bismuto previo enriquecimiento en caldo tetrationato y CASTILLO y cols.(1983) obtienen mejores resultados en muestras de heces con el medio Salmonella-Shigela (SS) siempre que las muestras se hayan enriquecido. CHAU y col. (1978) comparan ocho medios de aislamiento para observar la acción inhibitoria de estas sobre microorganismos (E. coli, Proteus, Klebsiella y Pseudomonas) y confirman que los agar SS, XLD y DC poseen gran capacidad inhibitoria sobre E. coli y no sobre Proteus spp, Klebsiella spp y Pseudomonas spp. La incorporación de novobiocina a los medios de aislamiento consigue la inhibición de microorganismos del género Proteus y favorece de esta forma el aislamiento de salmonelas (RESTAINO y cols. 1977) y HOATS (1978) emplea esta técnica para aislarlas de carne de vaca y pollo.

PRICE (1983) estudia la siembra múltiple para conseguir el mayor aislamiento de salmonelas, tanto en aguas naturales y residuales.

En la Tabla X se indican las características de las colonias aisladas en los medios más comúnmente utilizados asi como diferencias con respecto a otros microorganismos que generalmente crecen en dichos medios.

Métodos rápidos para la detección de salmonelas mediante el empleo de filtros de membrana han sido empleados para alimentos (ENTIS y cols.1982) y aguas (BLOCK y col.1979). Asimismo, métodos rápidos radiométricos se han empleado con el mismo fin en alimentos (STEWART y cols.1980) y MAFART y cols.(1978), mediante el empleo de lisina marcada con carbono-14, han aplicado esta técnica en

TABLA X .- CARACTERES MACROSCOPICOS DE LAS COLONIAS DE CIERTAS ENTEROBACTERIAS EN DIVERSOS MEDIOS DE AISLAMIENTO.

	ENDO	MAC CONKEY	E.M.B.	WILSON-BLAIR	AGAR CON VERDE BRILLANTE	S.S.
Salmonella	Colonias incoloras	Colonias incoloras	Colonias incoloras	Colonias húmedas negras para *S. typhi*, *S. paratyphi B* y *S. enteritidis*. Colonias planas verdosas para *S. paratyphi A* y *S. typhimurium*	Colonias rojas	Colonias incoloras con centro negro, para las Salmonellas productoras de H_2S.
Shigella	Colonias incoloras	Colonias incoloras	Colonias incoloras	Sin cultivo	Sin cultivo	Colonias incoloras
Escherichia	Colonias rojas	Colonias rojas con anillo periférico de bilis precipitada.	Colonias negras o con centro negro. Reflejo metálico para el *E. coli*; sin reflejo metálico para el *E. aerogenes*.	Sin cultivo o raras colonias pequeñas grises.	Colonias verdosas raras	Raras colonias rosas o de color rojo vivo
Proteus	Colonias invasoras	Colonias invasoras	Colonias invasoras	Colonias verdes no invasoras	A veces, muy raras col.	En ocasiones, muy raras col. incoloras.

alimentos líquidos para la detección de contaminaciones.

GIBBS y cols. (1979) comparan el método de anticuerpos fluorescentes y el método de cultivo standard para salmonelas y concluye que los resultados son similares, BARRELL y col. (1979), al utilizar esta misma técnica en alimentos animales y muestras ambientales encuentran que en carnes y derivados se obtienen muchos resultados falsos negativos. Un estudio comparativo de dos técnicas de obtención de anticuerpos por fluorescencia para la detección de salmonelas en alimentos ha sido realizado por SWAMINATHAN y cols. (1978).

Una confirmación rápida de salmonelas puede realizarse utilizando un sistema "minitek" juntamente con un test serológico según COX y col. (1976) y en seis horas pueden obtenerse los resultados. La prueba de lisina descarboxilasa fue utilizada para la detección y aislamiento de salmonelas en aguas residuales y aguas de desecho como técnica de "screening" con la ventaja de la reducción del tiempo de análisis (PHIRKE, 1977). Otro método, igualmente rápido es el descrito para alimentos de origen vegetal por HOBEN y cols. (1973) basado en el empleo de un caldo con lisina, hierro, cistina y rojo neutro y en 24 horas pueden ya eliminarse las muestras negativas.

Un método para la concentración de E. coli y salmonelas a partir de grandes volúmenes de agua de bebida es propuesto por GOYAL y col. (1980) basado en el técnica de adsorción-elución sobre membrana.

En las muestras en que el enriquecimiento ha sido negativo, la técnica de movilidad selectiva ha conseguido en algunos casos aumentar el número de aislamientos. SMELTZER y col.(1979) y VASSILIADIS y cols.(1981) lo utilizan en carnes y derivados. Sin previo enriquecimiento esta técnica fue utilizada para la determinación rápida de salmonelas en alimentos (huevos, pasteles, bombones)

por BANWART y col. (1969) y por ABRAHAMSSON y cols. (1968) en huevos, pescados y alimentos para animales.

Una modificación del procedimiento de enriquecimiento serológico para la detección de salmonelas en productos derivados de la soja se debe a SURDY y col. (1981) y consiguen reducir el tiempo del análisis. Asimismo, para la detección de salmonelas en alimentos y piensos el método de la cápsula de flujo regulado ha dado buenos resultados (SVEUM y col. 1977) y un estudio sobre las cantidades de muestra de alimentos que deben emplearse para la detección de salmonelas en alimentos desecados se debe a SILLIKER y col. (1973).

I.5.5. Características serológicas y fagotipia

La identificación definitiva del género *Salmonella* se basa hoy dia en la composición de la estructura antigénica de los diferentes serotipos. Sin embargo, la clasificación e identificación de estos microorganismos no debe apoyarse únicamente en esta prueba ya que en algunas ocasiones pueden producirse variaciones en sus propiedades antigénicas y bioquímicas (KAUFFMANN, 1975).

Los primeros estudios que se conocen sobre la existencia de antígenos se deben a Smith y Reach en 1903, los cuales se continuaron en 1918 por Weil y Felix quienes al utilizar cepas de *Proteus* establecen las diferencias existentes entre los antígenos somáticos y flagelares. Sin embargo, los trabajos realizados por estos autores no llegaron a conocerse hasta que White en 1925, y Kauffmann en 1930, ambos por separado, estudiaron también la estructura antigénica de las salmonelas (KAUFFMANN, 1975) . A partir de este momento y basándose en el estudio taxonómico realizado por Kauffmann en 1941 se reordenaron y ampliaron los trabajos de los primeros investigadores en este campo como Schütze, Bruce White y Scott entre otros y se desarrolló el esquema de Kauffmann-White usado actualmente para la clasificación del género *Salmonella* (KAUFFMANN, 1975). Este esquema ha servido para clasificar las especies entonces conocidas y para realizar la identificación antigénica de todas las cepas de *Salmonella* aisladas posteriormente cuyas identificaciones se han ido publicando, bien individualmente o por agrupación en subgéneros (KAUFFMANN, 1961, 1962a, b, 1963a, b, 1964).

Según el esquema de Kauffmann-White, los serotipos de *Salmonella* se agrupan en aproximadamente 65 grupos en base a la naturaleza de sus componentes antigénicos somáticos, cada uno

de los cuales acoge a un número variable de especies que difieren entre sí por los componentes antigénicos flagelares.Por tanto, las pruebas serológicas para la identificación definitiva de las cepas sospechosas como miembros del género Salmonella consisten en la utilización de antisueros polivalentes somáticos (O) y flagelares (H) según la técnica descrita por Edwards y Ewing en 1972,indicada y recomendada por la ICMSF (1983). Además de los antígenos somáticos y flagelares algunas salmonelas poseen un antígeno envolvente o antígeno capsular denominado antígeno K el cual también se encuentra en algunas enterobacterias además del género Salmonella. Concretamente se conocen tres de tales antígenos, el antígeno 5, el antígeno Vi y por último el antígeno M (KAUFFMANN, 1975). La presencia o ausencia de este antígeno mucoso M es importante ya que la existencia ocasiona la inaglutinabilidad de los antígenos O y H. Por tanto la variación M N es importante ya que supone el cambio de la forma M (fase mucoide) a la forma N (fase normal) (RAMOS CORMENZANA, 1979). El antígeno Vi es el que más ha aportado al conocimiento del género Salmonella ya que al encontrarse en S. typhi y S. paratyphi C han constribuido de manera importante a resolver el enigma sobre los problemas de aglutinación de los antígenos somáticos de ambos serotipos (KAUFFMANN, 1975). Según BAQUERO GIL (1972) existe un porcentaje del 10-15% de cepas llamadas cepas Vi puras, que no aglutinan con el antisuero somático, mientras que el 80% de las cepas, aunque poseen el antígeno Vi en mayor o menor proporción no se encuentran en cantidad suficiente como para enmascarar totalmente la aglutinación somática. Solo el 5-8% de S. typhi carecen de antígeno Vi.

El hecho de no basar la identificación de salmonelas en las características serológicas, se debe a que existen algunas enterobacterias que poseen determinados factores entigénicos comunes con los de las salmonelas. Así por ejemplo, el género Citrobacter no solo posee antígenos comunes con las salmonelas en general sino que también posee un antígeno Vi indistinguible del de S. typhi y S. paratyphi C (BAQUERO GIL, 1972).

Los antígenos flagelares pueden presentarse en dos fases alternativas, fases 1 y 2, originadas como consecuencia de un estado de mutación bifásica característica de estas especies. Esta mutación no la poseen todos los serotipos de Salmonella como por ejemplo, la S. typhi y S. paratyphi A que solo poseen el antígeno flagelar en fase 1. La mutación suele realizarse en el subcultivo de las especies y afecta a casi todas las colonias. Esta mutación es reversible y las salmonelas recién aisladas prácticamente se encuentran en la primera fase (BAQUERO GIL, 1972).

Para un buen diagnóstico de las especies de Salmonella hemos de tener en cuenta también los fenómenos de variación antigénica; esta variación es debida fundamentalmente a la existencia de cambios producidos por la alteración de ciertos antígenos por lo que el conocimiento de dichas variaciones es indispensable si se desean obtener resultados uniformes. Estos fenómenos de variación los agrupa KAUFFMANN (1975) en los siguientes tipos: Variación N-O producida por la pérdida del antígeno flagelar, el cual, es irreversible como ocurre en la S. gallinarum o S. pullorum; Variación S-T-R- debido a la pérdida del antígeno somático por transición de formas S a formas T ó R y por último la variación de las formas debida a variaciones en el antígeno somático y variaciones en el antígeno Vi también conocidas como variación V-W.

El procedimiento más útil para diferenciar las diferentes cepas de Salmonella dentro de un mismo serotipo es el que se obtiene mediante bacteriófagos utilizando la técnica de lisotipia (RUIZ

MERINO, 1969). Se han ideado diversos esquemas de fagotipificación para algunas de las especies de Salmonella más frecuentes como son además de S. typhi y S. paratyphi A y B, S. enteritidis, S. typhimurium y S. gallinarum entre otras (WILSON and MILES 1975). Estos fagotipos son característicos de cada región (BERROA DEL RIO y col 1975) o de un huesped animal y son especialmente útiles para rastrear con rapidez las fuentes de las infecciones humanas y animales, así como los contaminantes en alimentos, piensos y fertilizantes y la identificación de casos secundarios (TURNBULL, 1981). Esta tipificación por bacteriófagos es una ayuda muy interesante desde el punto de vista epidemiológico ya que nos permite conocer si ante cualquier brote, los enfermos afectados lo son únicamente debido a un fagotipo determinado en cuyo caso solo hay una fuente de infección, o, si por el contrario, la presencia de distintos fagotipos nos puede indicar sin lugar a dudas la presencia de distintas fuentes de infección (RUIZ MERINO, 1969).

La primera vez que se utilizó este tipo de tipaje fué en 1936 cuando Craigie y Brandon aislaron diversos bacteriófagos, cuya actividad sobre los cultivos de S. typhi estaba ligada a la presencia de antígeno Vi.

La producción de fagos de Salmonella está bajo control de la OMS, y aún no es posible la distribución internacional (ICMSF, 1983).

I.5.6. Aspectos genéticos del género Salmonella

La importancia clínica y bacteriológica de las salmonelas ha desencadenado desde hace tiempo la realización de estudios exhaustivos, que han alcanzado considerable altura en cuanto a conocimientos bioquímicos y genéticos. Todo ello ha conducido a la identificación de un número considerable de especies que en otras circunstancias, mas que considerarse como tales, serian probablemente englobadas dentro de una o a lo sumo unas pocas especies.

Recientemente, con el desarrollo de técnicas finas de análisis genéticos, se ha puesto claramente de manifiesto la necesidad de una nueva reorganización del género Salmonella a nivel taxonómico, más consistente con respecto a su estructura genómica e incluso filogénica (CROSA y cols. 1973; STOLERU y cols. 1976). El principal tipo de experimentos realizados se llevó a cabo por el grupo de Le Minor (LE MINOR y cols. 1982b) y consisten en un estudio sobre la homología entre las secuencias de ADN de cepas de Salmonella de especies diferentes mediante experiencias de hibridación.

En una primera parte de sus experimentos fue posible agrupar las cepas estudiadas en base a sus características nutricionales o bioquímicas en un total de siete grupos fenotípicos. Dichos grupos, correspondientes a una taxonomía de tipo numérico, fueron el resultado de una clasificación de tipo jerárquico ascendente sobre el estudio de la utilización como fuente de carbono de 90 tipos de sustratos, así como de otros 41 caracteres cualitativos y convencionales del esquema clásico.

Paralelamente a la reorganización en grupos fenotípicos de las cepas de Salmonella estudiadas, el grupo de investigadores mencionado procedió al estudio detallado de aquellas características genómicas que pudieran establecer determinados rasgos de parentesco entre dichas cepas. Dichos estudios, basados en experiencias de hibridación ADN-ADN permitieron diferenciar tales microorganismos en función de los porcentajes de hibridación y de los grados de divergencia.

Todas las cepas ensayadas se distinguían claramente de otras especies como C. freundii, E. coli ó P. mirabilis con una homología inferior al 30% a temperatura óptima de renaturalización; por el contrario, la homología hallada entre los cuatro subgéneros en los que clasifica Kauffmann a los microorganismos del género Salmonella, subgéneros I, II, III y IV, (KAUFFMANN, 1966) estuvo comprendida, en todos los casos, entre el 57 y el 99% de homología a igual temperatura óptima.

Los porcentajes observados de reacciones cruzadas y de divergencia permitieron subdividirlos en 5 grupos genómicos designados G1 a G5, los cuales se correspondían respectivamente con los subgéneros I (S. typhimurium), II (S. phoenix 147:b:1,5), subgénero III monofásico (S. arizonae 40:z_{36} :-), III difásico (S. arizonae 6,7:1, v:z_{53}) y subgénero IV (S. ochsenzoll 16:z_4 z_{23}:-). En cada caso, las tasas de reasociación fueron superiores al 76% tanto a la temperatura óptima como a la restrictiva de renaturalización. Las cepas restantes, representadas por S. bongor, podían englobarse en un nuevo grupo genómico, denominado G6, ya que presentaban homología entre ellos, superiores al 91 y 95% en ambas temperaturas, mientras que con respecto a los grupos anteriores no sobrepasaban en ningún caso el 54% de homología.

La correspondencia entre los 7 grupos fenotípicos designados P1 hasta P7 respectivamente, según el análisis numérico y los seis grupos de hibridación, resultaron ser aún más sorprendentes: los grupos fenotípicos P1 y P2 estaban incluidos en el grupo genómico G1, observándose claramente que las cepas P1, auxotrofas, no eran mas que el resultado de la adaptación al hospedador de otras cepas P2, mucho más ubicuas y de características prototróficas. Las cepas del grupo G2 se correspondían con el subgénero II de Kauffmann, las G3 y G4 con las del subgénero III monofásicas y difásicas respectivamente, diversidad genómica ya apuntada por CROSA y cols. (1973), las del G5 con el subgénero IV, mientras que el grupo G6 podía constituir un nuevo taxón representado por el grupo bongor.

En definitiva, los 7 grupos fenotípicos detectados, podrían perfectamente reagruparse en 6 grupos genómicos, donde los grupos P1 y P2 se incluirían como hemos visto en un grupo único G1 y en los cuales la correspondencia con los subgéneros de Kauffmann queda avalada de forma genómica, con solo crear un nuevo taxón para las cepas del grupo S. bongor de características bien definidas. La correspondencia entre los tres esquemas taxonómicos queda resumida en la Tabla XI .

Las conclusiones de estos trabajos son importantes. Se puede decir que las salmonelas constituyen una especie única que comprendería 6 subespecies y que a su vez pueden subdividirse en serovares. Ningún argumento objetivo permite en efecto, elevar dichos serovares al nivel de especie como se ha venido haciendo hasta la actualidad (LE MINOR y cols. 1982b).

TABLA XI.- CORRESPONDENCIA ENTRE LOS GRUPOS FENOTIPICOS Y GENOMICOS DE *SALMONELLA* SEGUN LE MINOR Y LOS SUBGENEROS DE KAUFFMANN

Grupo Fenotípico	Grupo Genómico	Subgénero de Kauffmann	Especie representativa
P1, P2	G1	I	*S. typhimurium*
P3	G2	II	*S. phoenix*
P4	G3	III monofásico	*S.* $40:z_{36}:-$
P5	G4	III difásico	*S.* $6,7:1,v:z_{53}$
P6	G5	IV	*S. ochsenzoll*
P7	G6	(grupo bongor)	*S. bongor*

I.5.7. Aspectos clínicos del género Salmonella

a) Concepto y clasificación

La salmonelosis constituye un grupo de enfermedades producidas por microorganismos del género Salmonella. Se originan por la ingestión de bacterias vivas las cuales pueden invadir los tejidos, multiplicarse y dar lugar en el huésped a una serie de síntomas típicos. Desde el punto de vista clínico este tipo de enfermedades se dividen en dos grupos: Salmonelosis gastroenteríticas cuya manifestación clínica es una gastroenteritis aguda y algunas veces pueden originar cuadros septicémicos o incluso localizaciones focales. Dentro de este grupo podemos incluir aquellas salmonelas que están fundamentalmente adaptadas a huéspedes animales específicos y que pueden producir enfermedades clínicas en el hombre o, salmonelas denominadas no adaptadas que constituyen la mayoría de los serotipos de Salmonella, pero que no tienen preferencia por ningún huesped en particular (TURNBULL, 1981). El segundo grupo está constituido por las salmonelosis tifoídicas, originan un cuadro clínico denominado fiebre tifoidea y paratifoidea e incluyen tres serotipos, S. typhi, S. paratyphi A, S. paratyphi B y S. paratyhphi C cuyo reservorio es exclusivamente humano aunque a veces, en el caso de S. paratyphi B, si bien primariamente está adaptado al hombre, de vez en cuanto también se aisla en huéspedes secundarios (TURNBULL, 1981; ALCANTARA CHACON, 1981).

b) Patogenia

El desarrollo de la enfermedad después de la ingestión

de salmonelas depende del número de microorganismos, de su virulencia y de otros muchos factores del huésped. La susceptibilidad a la infección por Salmonella no es igual en todas las personas. Por ejemplo los niños de corta edad, los ancianos, las personas debilitadas, los subalimentados y en general aquellas personas que se encuentran afectadas o convalecientes de otras dolencias suelen ser más susceptibles a la infección siendo el número de microorganismos necesarios para producir sintomatología muy inferior al de personas adultas sanas cuyos valores se encuentran comprendidos entre 10^5 -10^9 microorganismos según el serotipo y la cepa ingerida (FOOTE, y col.1979). Sin embargo aunque existe bastante acuerdo en cuanto a la dosis infectiva, este tema no puede ser aislado de otros factores que afectan a la gravedad de la infección tales como la virulencia del microorganismo, la edad del huésped, su estado de inmunidad, enfermedades subyacentes debilitadoras o factores de "stress" del huésped así como el estado fisiológico del intestino en el momento de penetración de los microorganismos y el medio en el que se ingieren estos (TURNBULL, 1981).

En la actualidad se conoce poco sobre las diferencias respecto a la virulencia de los distintos serotipos y cepas ya que frecuentemente, cepas diferentes dentro de un determinado serotipo pueden tener grados distintos de virulencia. Hay incluso autores que consideran que la virulencia está asociada probablemente con la capacidad del microorganismo para superar la barrera físicoquímica que constituye las microvellosidades del epitelio intestinal, e incluso quien la asocia a las características de producción de determinados enzimas genéticamente estables (TURNBULL, 1981).

Existe otro factor como es la edad del huésped que influye

de manera notable en la resistencia o sensibilidad a la infección. Una de las causas que motivan este fenómeno es el establecimiento en las personas adultas de una flora normal que desempeña cierta función en la defensa del huésped produciendo una competición de sustratos, elaboración de sustancias antimicrobianas y del sistema inmunitario intestinal (DUCLUZEAU y col. 1983). La acidez gástrica es otro fenómeno que actúa impidiendo la penetración de las salmonelas al duodeno ya que, los valores de pH inferiores a 4,5 producen la destrucción del gérmen (RODRIGO MORENO, 1983). El peristaltismo intestinal actúa también en contra de la colonización bacteriana, de ahí que el uso de frenadores del mismo, utilizados en las diarreas infecciosas, puedan agravar consecuentemente el curso de la infección (RODRIGO MORENO, 1983). Otro factor anticontaminante del huésped es el moco epitelial que junto con la flora bacteriana intestinal provoca un obstáculo mecánico e impide la penetración de las bacterias exógenas (RODRIGO MORENO, 1983). Entre los factores que actúan favoreciendo la infección por salmonelas con respecto al "stress", se ha comprobado que animales de experimentación expuestos a condiciones de inanición o de exposición al frio daban lugar a la sintomatología por ingestión de salmonelas con mucha más facilidad (TURNBULL, 1981). Existen alimentos que por su composición en nutrientes y por su estado de conservación favorecen la multiplicación de salmonelas con lo cual su ingestión supone un mayor riesgo (TURNBULL, 1981). Los anticuerpos elaborados por las células inmunocompetentes de la lámina propia, pueden ser importantes, si bien parece que existe una escasa relación entre la infectividad y los anticuerpos circulantes siendo la relación más evidente con los copro-anticuerpos. Estos anticuerpos junto con la respuesta inflamatoria y la fagocitosis luminal contribuyen de manera importante impidiendo o parali-

zando el desarrollo de la infección (RODRIGO MORENO, 1983). Por el contrario, los mecanismos inmunes celulares y humorales de circulación no desempeñan ninguna acción protectora de la enterocolitis por Salmonella (TURNBULL, 1981) si bien, solo en el caso de la fiebre entérica, la inmunidad celular parece que ejerce un papel importante (MANDAL, 1981).

El estudio sobre el mecanismo patógeno del género Salmonella como agente causal de trastornos gastroentéricos se ha desarrollado muy lentamente con respecto a otros aspectos relacionados con este microorganismo.

Para que se produzca la patogenia de la diarrea por salmonelas es necesario que los microorganismos lleguen al intestino delgado en un número suficiente (MARTINEZ SAURA, 1979). Existen a veces infecciones que dan lugar a deposiciones sanguinolentas e hipersensibilidad del colon, actuando por tanto estos microorganismos no solo en el intestino delgado sino también en el colon (TURNBULL, 1981). Estas bacterias posteriormente se absorben sobre las microvellosidades de las células intestinales, penetran en la célula y vacuolas y a través de estas células emigran a la región de la lámina propia estimulando la respuesta inflamatoria y produciendo una inflamación de la mucosa intestinal. Esta respuesta inflamatoria es polimorfonuclear en el caso de la gastroenteritis mientras que en la fibre entérica es de tipo monocítica. En el caso de la salmonelosis, estos microorganismos quedan confinados en la pared intestinal, si bien S. typhi y S. paratyphi al permanecer viables en los macrófagos pueden ser transportados a las células del retículo endotelial y tener lugar la multiplicación celular (HORNICK, 1980). Estos procesos inflamatorios inducen la síntesis de prostaglandinas con la consecuente activación de la enzima adenilciclasa la cual origina un aumento de AMPc que junto con

el ión calcio inhiben la entrada acoplada de iones sodio y cloruro en el enterocito. De igual forma, en las criptas intestinales el AMPc y el calcio actúan facilitando la permeabilidad del epitelio intestinal al ión cloruro produciendo una estimulación de la secreción de dichas glándulas (RODRIGO MORENO, 1983).

Existen pruebas de que salmonelas como S. enteritidis y S. typhimurium producen proteinas enterotóxicas similares a las de E. coli y V. cholerae y que al parecer intervienen en la patogenia de la gastroenteritis por medio del sistema adenilatociclasa-AMPc (MARTINEZ SAURA y col. 1979; HORNICK, 1980).

En el caso de la fiebre tifoidea y paratifoidea las salmonelas pasan desde la submucosa intestinal por medio de los vasos linfáticos hasta los ganglios mesentéricos donde después de multiplicarse durante un breve período de tiempo se distribuyen por la circulación hasta el hígado, bazo u otros tejidos del sistema reticuloendotelial. Después de un período de proliferación silenciosa los organismos entran de nuevo en el torrente circulatorio en cantidades masivas y provocan la manifestación clínica de la enfermedad (MANDAL, 1981).

c) Sintomatología

La infección por salmonelas puede presentarse bajo tres formas clínicas. En primer lugar la forma gastroentérica, más frecuente, donde el período de incubación es habitualmente corto (12 a 48 horas) dependiendo de la dosis infectante, incluso a veces puede ser más prolongado. El síndrome principal, más constante es la diarrea, cuya iniciación suele ser brusca. Las heces son abundantes y fétidas, más o menos acuosas, en ocasiones coleriformes y a

veces de forma disenteriforme. En ciertos casos la diarrea va acompañada de vómitos y náuseas que pueden ser sanguinolentos pero esto solo ocurre en niños pequeños y rara vez en adultos. Otro de los síntomas de este tipo de infecciones es la fiebre con escalofrios y suele ser de 38-39 ºC. Se produce al principio de la infección. El dolor abdominal es difuso o localizado en el epigastrio. La insuficiencia renal aguda solo se produce en raras ocasiones por deshidratación o hipotensión intensa (MARTINEZ SAURA y col. 1979).

La segunda de las formas clínicas que puede presentarse es la febril. Las especies que más comúnmente la originan son S. cholerasuis, S. typhimurium y S. enteritidis. Este síndrome febril suele ser prolongado y a veces cursa sin episodio diarréico. Con respecto a la forma focal se produce después de una fase bacteriémica, en ocasiones es muy fugaz y pasajera, e incluso a veces, puede dar lugar a focos en forma de abscesos, en cualquier parte del organismo y causar endocarditis, meningitis, colecistitis y osteomielitis entre otros. S. choleraesuis es el serotipo más frecuente en la etiología de estos cuadros, que suelen ser más bien excepcionales (ALCANTARA CHACON, 1981; MARTINEZ SAURA y col. 1979).

El tercero de los cuadros clínicos es el causado por la fiebre tifoidea y paratifoidea cuyo período de incubación es superior, concretamente del orden de 10 a 20 días y con límites de 3 a 56 días, pero al igual que ocurre en el caso de la salmonelosis dicho período de incubación varía según la dosis infectiva. Las características clínicas tanto de la fiebre tifoidea como paratifoidea B se indican en la Tabla XII (ALCANTARA CHACON, 1981).

Las complicaciones de este tipo de infección eran muy frecuentes en la era preantibiótica, debido a que al ser una enfermedad septicémica los microorganismos pueden localizarse prácti-

camente en todos los órganos del paciente. Actualmente, estas complicaciones, aunque son de escasa frecuencia, sin embargo deben vigilarse con especial antención. En la Tabla XIII recogemos las complicaciones más frecuentes en la fiebre tifoidea.

d) Diagnóstico

Ante la presencia de un síndrome gastroenterítico o febril el diagnóstico puede realizarse mediante el conocimiento del período de incubación, el cuadro clínico, la fórmula hemática, el coprocultivo y eventualmente el hemocultivo (ALCANTARA CHACON, 1981). La utilización del cuadro clínico para el diagnóstico de una gastroenteritis por Salmonella ofrece ciertas dificultades ya que solo en casos determinados permite distinguir una afección de otra e igual ocurre con la fórmula hemática que solamente sería orientadora cuando se presentan formas clásicas (ALCANTARA CHACON, 1981). El diagnóstico definitivo de la gastroenteritis salmonelósica se realizará por medio del coprocultivo, el cual es necesario efectuarlo en varios medios específicos con objeto de descartar otros posibles agentes etiológicos (KRUGMAN y col. 1974).

El diagnóstico de la fiebre tifoidea y paratifoidea se realiza en función de la clínica y del laboratorio. No obstante como ocurre en el caso de la gastroenteritis salmonelósica, el diagnóstico de laboratorio será el único definitivo mientras que el diagnóstico clínico será orientador al existir enfermedades con cuadros seudotíficos que pueden inducir a error. No obstante existen una serie de datos clínicos característicos cuyo hallazgo y valoración es fundamental para el diagnóstico clínico que se recogen en la Tabla XII.

TABLA XII .- DATOS CLINICOS EN EL DIAGNOSTICO DE LA FIEBRE TIFOIDEA Y PARATIFOIDEA

FIEBRE TIFOIDEA	FIEBRE PARATIFOIDEA B
Ambiente epidémico-endémico	Período de incubación más corto
Pródromos	Comienzo más agudo
Fiebre	Vómitos más intensos
Lengua saburral y fuligo	Diarrea predominante
Bradicardia relativa	Fiebre más breve (2 a 12 dias)
Estupor	Roséola muy evidente
Meteorismo y dolor en fosa ilíaca derecha	
Roséola	
Esplenomegalia	
Hepatomegalia	
Diarrea	

TABLA XIII.- COMPLICACIONES DE LA FIEBRE TIFOIDEA

Enterorragia

Perforación intestinal

Colapso y shock

Colecistitis

Flebotrombitis

Osteitis

Espondilitis

Neumonias

Meningitis

Encelopatia delirante

El diagnóstico de laboratorio en caso de septicemia se realizará en sangre y cuando se trate de infecciones localizadas los bacilos pueden cultivarse a partir de pus, exudados, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, etc. (KRUGMAN y col. 1974).

No obstante el diagnóstico de laboratorio de la fiebre tifoidea y paratifoidea se suele realizar mediante hemocultivo y seroaglutinaciones, y en algunas ocasiones con el coprocultivo. Esta última técnica no suele emplearse habitualmente como método de diagnóstico pero si es de gran utilidad epidemiológica ya que permite detectar los posibles portadores crónicos (ALCANTARA CHACON, 1981). El hemocultivo es preceptivo efectuarlo en cualquier momento de la evolución antes del tratamiento con antibióticos; en estos casos los cultivos suelen ser positivos en un 80%. Sin duda, el hemocultivo da con mayor frecuencia resultados positivos en la primera semana, aproximadamente en un 89%, pero es normal localizar cultivos positivos en la 2ª y 3ª semana, incluso en la 4ª se obtienen positividades en un 38 % (MANDAL, 1981; ALCANTARA CHACON 1981).

El diagnóstico serológico debe realizarse en cualquier momento de la evolución de la infección, ya que, como se desprende de los resultados obtenidos en el Hospital General Ntra. Sra. del Mar de Barcelona, en la 1ª semana son positivos en un 71%, en la 2ª semana alcanzan el 90% y en la 4ª y 5ª el 94%. La presencia de aglutinaciones séricas de los antígenos O y H se efectúan mediante la reacción de Widal tanto para la S. typhi como para las Salmonelas paratíficas A, B y C. La valoración de los títulos de anticuerpos presenta a veces dificultades ya que según algunos autores cada tifoideo posee su propia curva de aglutinación. No obstante, en personas no inmunizadas un O positivo de 1/80 en regiones no endémicas y de 1/160 en las área endémicas, se

considera significativa (MANDAL, 1981).

Durante estos últimos años, aparecen cada vez un mayor número de datos respecto a las limitaciones de la prueba de Widal, ya que a veces, el alto título de anticuerpos O puede deberse a la infección por otras salmonelas que comparten antígenos somáticos comunes o con ciertas formas de tuberculosis (MANDAL, 1981). Además, la inoculación previa de vacuna TAB hace que la prueba resulte más difícil de interpretar debido al gran aumento de anticuerpos.

Las aglutininas anti-O son más precoces pero menos elevadas, presentando una disminución más rápida que las anti-H con lo cual el anticuerpo somático puede indicarnos una infección aguda, mientras que, el flagelar representa una infección más bien crónica (MANDAL, 1981).

e) Tratamiento

El tratamiento recomendado para las gastroenteritis salmonelósicas es de tipo sintomático consistente en la administración de líquidos con el fin de poder corregir la deshidratación y el desequilibrio electrolítico (TURNBULL, 1981; ALCANTARA CHACON, 1981). Este tratamiento puede acompañarse de fármacos antidiarréicos como los preparados de bismuto, los polvos de opio, el láudano, etc. (ALCANTARA CHACON, 1981), si bien, su utilización tampoco es aconsejada por ciertos autores como HORNICK (1980).

Los pacientes adultos que se recuperan de la infección suelen excretar el microorganismo durante un período de 4-8 semanas e incluso durante períodos mayores. En el caso de los niños sin embargo, su excreción suele ser mucho más prolongada (TURNBULL, 1981).

El tratamiento antimicrobiano está contraindicado en estos tipos de afecciones, ya que no solo no se reduce el tiempo de duración de la diarrea sino que incluso se alarga el período de portador más tiempo que con el tratamiento sintomático. ALCANTARA CHACON (1981) cita numerosos trabajos en los que el tratamiento con antibióticos nunca resultó más eficaz que el sintomático a pesar de que en ancianos o niños, o bien en casos de bacteriemia y otras complicaciones, la utilización de antibióticos como el cloranfenicol, ampicilina, amoxicilina y cotrimosaxol resulta aconsejable (TURNBULL, 1981).

Otro hecho por el que no se recomienda la utilización de antibióticos en las gastroenteritis salmonelósicas es debido a que el uso indicriminado en prácticas hospitalarias y veterinarias conduce hacia un notable incremento de las resistencias de determinados serotipos a los fármacos antimicrobianos, como por ejemplo S.typhimurium de la cual se han aislado en los últimos años numerosas cepas de origen clínico, en las que se han detectado plásmidos responsables de la resistencia a un elevado número de antibióticos; dichas cepas poseen al parecer mayor virulencia, capacidad de producir brotes infecciosos de caracter epidémico asi como una mayor tendencia a la producción de septicemias (TURNbull, 1981; PALOMARES y cols.1983).

En cuanto al tratamiento de la fiebre tifoidea y paratifoidea la utilización de antibióticos suele ser necesaria. Esta enfermedad que se consideró durante mucho tiempo de riesgo vital y de una gran duración, con una mortalidad del 20%, después del descubrimiento del cloranfenicol pasó a ser solamente del 1% (MANDAL, 1981). Sin embargo, el cloranfenicol que hasta ahora ha sido el fármaco de elección para el tratamiento de las fiebres entéricas posee ciertos inconvenientes tales como son la ineficacia

frente a la infección biliar y por tanto sobre los portadores, un gran riesgo de toxicidad medular, asi como su posible toxicidad en lactantes y mujeres embarazadas o la elevada tasa de recidivas que produce. Además, la aparición a gran escala de cepas de S. typhi con resistencias mediadas por plásmidos R frente al cloranfenicol, tras su localización por primera vez en Gran Bretaña en 1950,ha ido en incremento en numerosos paises debido principalmente a la utilización masiva de este tipo de antibiótico, lo cual ha motivado la búsqueda necesaria de otras alternativas más adecuadas para el tratamiento de la fiebre entérica (ALCANTARA CHACON, 1981; MANDAL, 1981). En principio se empezó a utilizar la ampicilina si bien su acción es menos eficaz que la del cloranfenicol ya que la fiebre dura hasta 12 dias. Actualmente la amoxicilina, derivado penicilínico, está desplazando a la ampicilina debido a su mayor eficacia. La duración media de la fiebre es de 6-8 dias y los pacientes tratados con este antibiótico no sufren recidivas, no posee los efectos de toxicidad del cloranfenicol y la tasa de portadores es bastante menor. Los preparados parenterales poseen un alto coste y en el caso de que la infección curse con vómitos es aconsejable la administración de ampicilina cuando el cloranfenicol está contraindicado (ALCANTARA CHACON, 1981; MANDAL, 1981).

Otro antibiótico que se está empezando a utilizar es el cotrimixasol, antibiótico que posee una gran eficacia ya que disminuye los casos de recidivas y de portadores si bien, presenta inconvenientes que no posee la amoxicilina (ALCANTARA CHACON, 1981). Este fármaco se ha convertido en el más prometedor de todos los antibióticos en el tratamiento de la fiebre tifoidea, resistente a medicamentos, más económico que la ampicilina y amoxicilina, resulta efectivo contra las cepas resistentes a la primera y puede

ser tambien administrado por via parenteral.

A veces, en casos muy graves, la administración de antibiótico va acompañada de la utilización de corticoides, que debe ser muy controlada además de la regulación hidroelectrolítica como en el caso de la gastroenteritis salmonelósica.

Actualmente no se conocen vacunas para el hombre contra salmonelas distintas de S. typhi y S. paratyphi A y B. La vacuna TAB se ha utilizado durante muchas décadas llegando a conseguirse preparados que protejen incluso al 70-90% de la población. Sin embargo, aunque estas vacunas suelen ser muy utilizadas existen pocas pruebas de que su componente paratifoideo sea realmente efectivo (KRUGMAN y col. 1974; TURNBULL, 1981). Esta vacunación debe por tanto limitarse a S. typhi en razón del predominio de este serotipo y de la gravedad de la fiebre tifoidea, además de las dudas que presenta con respecto a su eficacia sobre S. paratyphi A (LE MINOR, 1983).

La vacunación frente a la fiebre tifoidea se encuentra entre las primeras medidas profilácticas empleadas en el hombre. Sin embargo, ninguna de las vacunas disponibles en la actualidad para la prevención de la infección es plenamente satisfactoria (GERMANIER, 1983).

Las vacunas se pueden administrar bien por via parenteral u oral. Las vacunas administradas por via parenteral preparadas a partir de células completas o inactivadas poseen una eficacia que oscila entre el 50 y el 90% según el método de inactivación empleado. Este nivel de eficacia se puede considerar satisfactorio.

Sin embargo, estas vacunas tienen tendencia a originar efectos colaterales (GERMANIER, 1983)

Las vacunas de administración oral preparadas a partir de organismos muertos se encuentran en el mercado desde hace 50 años. Estas vacunas se introdujeron por la sencillez de administración, ausencia de efectos secundarios, facilidad de elaboración y ausencia de riegos. No obstante, solo existen algunos estudios sobre su eficacia pero estos no nos dan demasiada información.

La primera vacuna viva oral empleada y estudiada en el hombre se componía de bacterias S. typhi, dependientes de la estreptomicina. Esta vacuna se mostró inocua en los estudios con voluntarios, pero en su presentación final, no fué capaz de inducir protección clínica. Posteriormente se ha desarrollado la cepa S. typhi, mutante Ty 21a, que carece de enzima VDP-4-galactosaepimerasa cuya característica fundamental es que los lipopolisacáridos de la pared celular, responsables de la virulencia, y que parecen ser esenciales para conferir la protección, son sintetizados únicamente bajo condiciones que inducen la autodestrucción de la bacteria.

Los resultados obtenidos respecto a su eficacia en tres estudios experimentales fueron del 86%, 55% y 87%. Esta vacuna es inocua, estable y eficaz frente a la fiebre fitoidea durante al menos 3 años (GERMANIER, 1983).

La vacunación frente a la fiebre tifoidea posee cierto interés. De una parte, en los paises con elevada probabilidad de contaminación fecal y de otra en aquellos con buenas condiciones de higiene en los que la vacunación sería aconsejada al personal de laboratorios de bacteriologia que puedan manipular S. typhi, personal de servicios hospitalarios en posible contacto con tifoideos, militares y otros profesionales tales como arqueólogos,

etnólogos, etc. que puedan en algún momento formar parte de expediciones a regiones con una fuerte endemicidad. Sin embargo, la vacunación a personal de cocinas y manipuladores de alimentos sería inutil ya que ésta no parece tener ninguna incidencia eficaz sobre el estado de portador y podría dar lugar a una falsa seguridad (LE MINOR, 1983).

f) Resistencia a antibióticos y plásmidos R en Salmonella

Las especies de Salmonella parecen estar especialmente adaptadas para la producción de brotes epidémicos, originados en ocasiones por organismos con resistencia múltiple a los antibióticos. Desde el descubrimiento de estos agentes antibacterianos y sobre todo desde su utilización masiva se ha detectado un considerable aumento del número de cepas resistentes no solo entre las Enterobacteriaceae, sino también en practicamente todas las bacterias expuestas en mayor o menor medida al contacto de los antibióticos (BELL y cols. 1981; RYDER y cols. 1980 ; CHERUBIN, 1981). Las causas de esta gran proliferación de cepas multirresistentes solo se han podido comprender desde el descubrimiento acerca de la frecuente asociación de los determinantes genéticos de estas resistencias con plásmidos de ácido desoxirribonucleico.

En todas las Enterobacteriaceae además de las salmonelas se han descrito estos plásmidos de resistencia o plásmidos R con la propiedad de autocontrolar su propia transferencia desde la cepa huesped a otra receptora bien de la misma especie o de alguna relacionada. Esta transferencia puede tener lugar en el mismo intestino humano o animal y contribuir de este modo a la proliferación de microorganismos resistentes, que puedan diseminarse a

través de las cadenas normales. Posteriormente con el descubrimiento de los elementos genéticos transponibles (transposones), portadores también de determinantes génicos de resistencias se ha obtenido la base para poder explicar la acumulación de resistencias en una misma cepa o de su rápida diseminación.

En los últimos años se han realizado numerosos trabajos de interés epidemiológico, acerca de la presencia de plásmidos R en las salmonelas que normalmente se aislan en aguas residuales, de consumo público y en alimentos humanos y de animales (Mc CONNELL y col. 1979). En algunos estudios realizados en corrientes de rios de ciertas zonas de EE.UU. y Canadá se han llegado a detectar coliformes fecales resistentes a tres o más antibióticos en una proporción de más del 10% de la población. Más del 50% de estas resistencias resultaron ser transferibles por conjugación y algunas cepas llegaron a poseer resistencias al menos a 12 antibióticos (BELL y cols.1981). Con respecto a las salmonelas, dentro de la misma línea de trabajo, el 18% de las aisladas de aguas de rios resultaron ser resistentes a uno o más antibióticos, siendo igualmente la mayoría de estas resistencias autotransferibles (BELL y cols.1980).

Dado el interés de las resistencias a los agentes antimicrobianos en el género Salmonella se han realizado algunos estudios más detallados sobre ciertos aspectos genéticos relacionados con su transmisión que pueden presentar una gran importancia de tipo epidemiológico. Asi, por ejemplo, basándose en determinadas características genéticas de los plásmidos como su capacidad de autotransferencia, determinantes de resistencias o incompatibilidad plasmídica, se ha podido seguir la evolución de los plásmidos R en salmonelas y de este modo las de los propios microorganismos hospedadores a través de la cadena de alimentos hasta llegar al

hombre. La evidencia de los resultados nos indica la existencia de una cierta relación entre los plásmidos R de salmonelas aisladas en dicha cadena desde los alimentos propios de animales de consumo humano, los aislados en estos animales generalmente de granja y los que normalmente se localizan en el hombre (BENZASON y cols. 1981).

La identificación de los plásmidos de estas cepas apoyan fuertemente la hipótesis de que ciertos plásmidos de resistencia tienen posiblemente un origen ancestral común. A todo lo largo de la cadena, podríamos decir que existe "pool" de plásmidos R en cada nivel, que sería sin lugar a dudas el responsable de la alta incidencia de los microorganismos resistentes aislados. Dentro de esta comunidad de plásmidos, los transposones asi como otros cuentos genéticos originarían la alta variabilidad obtenida en cuanto a los fenotipos de resistencia. (MAC CONNEL y col. 1979; LINTON y cols. 1981).

Como vemos, la importancia de los plásmidos R en los estudios epidemiológicos, no solo de salmonelas, ha experimentado un gran avance en los últimos años. Hasta ahora, la mayoría de los estudios han estado dirigidos únicamente a la determinación y descripción de la sensibilidad de los microorganismos resistentes, de los factores responsables de dicha resistencia, (RYDER y cols. 1980; ADAMS y col. 1968; SANTINI y cols. 1978; CHERUBIN, 1981; LAMANNA y cols. 1977) o bien de la utilización de los plásmidos y de sus características, como marcadores epidemiológicos en determinados brotes epidémicos (PEREZ LOPEZ y cols. 1983 y 1984).

Solamente estudios más amplios y complejos que no se centren únicamente en lo inmediato podrán permitir en breve espacio de tiempo conocer la clave de la epidemiologia de las resistencias y poder detener o al menos paliar el grave perjuicio que actualmente ocasionan.

g) Epidemiologia

Actualmente la salmonelosis humana es una de las enfermedades infecciosas más importantes, especialmente en las regiones más desarrolladas. El número de brotes epidémicos y de casos individuales crece constantemente en gran número de paises, a pesar de las medidas preventivas adoptadas desde que se conoció la enorme incidencia de este microorganismo y sus vias de infección (TURNBULL, 1981). Los datos aportados por el "Center for Disease Control" (CDC) referentes a Norteamérica indican que las salmonelas afectan a más de dos millones de norteamericanos, lo que provoca una hospitalización de medio millón de casos con miles de defunciones y supone un coste anual de 1,5 billones de dólares, solo en gastos médicos (TURNBULL, 1981). En paises subdesarrollados donde predominan las carencias graves de alimentos, inanición y enfermedades de otras etiologias como cólera, tifus, malaria y demás infecciones parasitarias, la importancia de la toxiinfección por Salmonella, si realmente se dispusiera de tiempo y recursos para su cuantificación, se podria considerar desde un ámbito distinto del aplicado en Europa y América del Norte (TURNBULL, 1981). En España, el microorganismo responsable del mayor número de casos de intoxicaciones alimentarias, pertenece al género Salmonella (GUDIOL 1981). Este hecho podemos observarlo en el estudio realizado por ALES REINLEIN (1983) sobre 14.200 muestras de heces desde el año 1960 hasta 1982 en las que investiga varios microorganismos como Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia, Edwarsiella y Plexiomona encontrando que el número de enteropatógenos aislados en las 14.200 muestras llegó a ser de 1.009 es decir, un 7,1 % de casos positivos de los cuales 691, el 68,5%, se correspondian con especies del género Salmonella.

No obstante, los casos de infección por Salmonella y su frecuencia están sometidos a grandes variaciones que dependían entre otros factores del lugar geográfico, época del año, la edad y el sexo. Con relación al lugar geográfico podemos decir que en Gran Bretaña el número de casos notificados cada año de fiebre tifoidea es de 250, de los que el 90% de los afectados la contraen en el extranjero, generalmente en el continente índico. De igual forma, en Francia, el número de casos recibidos en el Centro Nacional oscila entre 350 y 600 cuyo origen es, en la mayoría de los casos, el consumo de mariscos o bien contaminaciones producidas tambien en el extranjero. En el caso de las fiebres paratifoideas A, practicamente todos los casos se observan en personas extranjeras, particularmente del Norte de Africa, trasladadas a Francia durante el período de incubación (LE MINOR, 1983).

El período estacional es otro de los factores que parece incidir en el aumento o disminución de las infecciones por Salmonella. En Estados Unidos durante los años 1966-1974 según los programas de vigilancia de Salmonella, los meses de verano y principio de otoño, son las épocas en que el número de personas afectadas era mayor coincidiendo dichos resultados en todos los años anteriormente citados (JAY, 1978). Estos resultados coinciden con los observados por Le Minor en Francia durante los años 1977-1979 en los que las cifras mayores de incidencia de salmonelas aparecen en los meses de septiembre y octubre (LE MINOR, 1983). Estos resultados coinciden con los del Departamento de Microbiologia de la Fundación Jimenez Diaz de Madrid, realizados en los años 1980-1982 si bien los picos no son tan evidentes como en los casos anteriores (ALES REINLEIN, 1983) o con los obtenidos en estudios epidemiológicos realizados con aguas residuales (PARVERY y cols. 1972; PARVERY y cols. 1974; SANCHEZ BUENAVENTURA y col. 1977).

El sexo es otro de los factores que inciden en esta variabilidad. En los 20 primeros años la infección predomina en varones, mientras que a partir de esta edad la infección predomina en las mujeres. Aunque no se conoce la razón de esta diferencia, uno de los factores podría ser el mayor riesgo profesional al que se encuentran sometidas las mujeres maduras que manejan más que el hombre los diversos productos alimenticios (KRUGMAN y col. 1974). Todas las edades son sensibles para padecer infección por Salmonella si bien, los niños con edades comprendidas entre 1 y 5 años son los más afectados, seguidos en importancia en cuanto al número los menores de un año (ALES REINLEIN, 1983; FOOTE y HOOK, 1979 ; KRUGMAN y col., 1974).

Los serotipos conocidos de salmonelas sobrepasa los 2000 aunque solo un pequeño porcentaje de los mismos son los causantes de la inmensa mayoría de enfermedades humanas y animales procedentes de muestras clínicas, alimentos y aguas, recogidos para controles sistemáticos (TURNBULL, 1981).

Si agrupamos los distintos serogrupos según la clasificación de Le Minor en grupos taxonómicos, como se observa en la Tabla XIV , la gran mayoría de cepas aisladas en el hombre o animales de sangre caliente pertenecen al grupo I y tan solo algunas de las cepas al grupo IV. El resto de las cepas proceden de animales de sangre fria o del medio ambiente, siendo su caracter patógeno bastante dudoso (LE MINOR, 1983).

Si bien los órdenes de preponderancia cambian constatemente entre los distintos serotipos de un año a otro y según sea el centro informante, en general, dentro del conjunto mundial, los serotipos pueden dividirse en tres grupos: aquellos de aislamiento frecuente como son S. typhimurium, S. enteritidis, S. infantis, etc. que comprenden del 3-5% de todos los serotipos conocidos; un

TABLA XIV .- *REPARTO DE LOS SEROTIPOS DE SALMONELLA EN LOS DISTINTOS FENONES, SEGUN LA CLASIFICACION DE LE MINOR.*

I.	*(= S.G.I.)*	1267
II.	*(= S.G.II.)*	377
III.	*(= S.G.III mono)*	91
IV.	*(= S.G.III difásicos)*	285
V.	*(= S.G.IV)*	46
VI.	*(= grupo bongor)*	6

segundo grupo correspondiente a los que aparecen en las cifras anuales de la mayoría de los centros y representan un 5% aproximadamente y, por último, un 90% que solo se localiza de forma intermitente en una u otra parte del mundo (TURNBULL, 1981). En España según los boletines epidemiológicos correspondientes a los años 1980-1983 el número de serotipos aislados en 1981 fue de 54 , de los cuales S. typhimurium y S. enteritidis eran los responsables del mayor número de casos seguidos de S. heidelberg, S. blockey, S. infantis, S. agona, S. newport, S. ohio y S. bovismorbificans como más importantes. En el año 1982-83 el serotipo predominante en las intoxicaciones alimentarias en España fue S. enteritidis seguida de S. typhimurium.

En el estudio realizado por ALES REINLEIN (1983) desde el año 1960 a 1982 la evolución de las dos especies responsables del mayor número de intoxicaciones alimentarias fueron S. typhimurium y S. enteritidis. Sin embargo, a partir de 1980 en que ambas se mantuvieron en una proporción similar, S. typhimurium disminuyó en los años 1981 y 1982 predominando S. enteritidis. Los datos aportados por el CDC en cuanto a los serotipos de Salmonella más frecuentes aislados en el hombre desde 1971-1975 situan a S. typhimurium en primer lugar seguida en todos los años de S. newport y S. enteritidis. En el caso de los serotipos aislados de fuentes no humanas en los años 1969-1973 S. typhimurium está situada en primer lugar si bien, el resto sufren grandes variaciones según el periodo (BANWART, 1982). En el estudio sobre serotipos más frecuentes en aguas residuales y de origen humano realizado por SANCHEZ-BUENAVENTURA y col.(1977) en Valencia los serotipos predominantes en ambos tipos de muestras resultaron ser S. paratyphi B, S. enteritidis y S. paratyphi C.

Un estudio epidemiológico realizado en el Hospital General

Provincial "Bufalini" en Casena (Italia) durante todo el año 1975 confirma que el número de salmonelas aisladas fue en los meses de Septiembre y Octubre en las que los serotipos predominantes fueron Salmonella enteritidis y S. typhimurium (CIPOLLONI y col. 1977). En Verona (Italia), los resultados obtenidos por MIGLIARESE y cols. (1975) durante los año 1966 a 1974 confirman el aislamiento en el último año de serotipos de salmonela muy poco frecuentes en su medio: S. takoradi y S. saint-paul. En un estudio similar realizado por ROSSETTI (1976) en Pescia (Italia) entre los años 1973-1975 encuentra que el número de salmonelas aisladas el año 1975 en tres veces superior al de 1973 y el mayor número de casos se produjo en los meses de Septiembre y Octubre. Los serotipos más frecuentes fueron S. panamá seguido de S. typhimurium. CASADEI y cols. (1977) aislan de coprocultivo humano un serotipo infrecuente en Prato (Italia) identificado por vez primera por Le Minor en 1965.

CAMPOS MARTIN y cols. (1983) en un estudio epidemiológico de los casos declarados de fiebre tifoidea en la provincia de Granada durante el año 1981 y primeros meses de 1982, pretenden relacionar la influencia de ciertos factores sociales y ambientales en la transmisión del agente causal.

La preponderancia elevada de S. typhimurium en muchas partes del mundo y la frecuencia de aislamiento en el hombre, animales, alimentos y medio ambiente, es un fenómeno comprobado. Este microorganismo no suele aislarse en los piensos para animales, lo que sugiere que estos no suelen participar en el ciclo de infección cuando se trata de este serotipo (TURNBULL, 1981).

Actualmente encontramos una proliferación de serotipos desconocidos hasta hace algunos años en Europa Occidental y que están ocasionando casos de intoxicaciones alimentarias. Por ejemplo

S. panamá nunca se había aislado en Gran Bretaña antes de la Segunda Guerra Mundial, mientras que después de ésta se localizó en huevos en polvo importados de América que servían de pienso para cerdos siendo a partir de entonces el serotipo responsable de frecuentes brotes de toxiinfecciones alimentarias. *S. agona* fue introducida al parecer en Europa desde Chile en preparados a base de pescado (LE MINOR, 1983; TURNBULL, 1981). Otro caso interesante puede observarse en el hecho de que a veces encontramos ciertas fluctuaciones en el predominio de determinados serotipos y que está influenciado por las medidas adoptadas con el propósito de disminuir la salmonelosis. *S. java*, *S. lichfield* y *S. urbana*, son los tres principales serotipos asociados con las tortugas. Después de la promulgación de un decreto que se prohibía la importación de estos animales en Canadá, los tres serotipos desaparecieron (TURNBULL, 1981).

El género *Salmonella* está muy extendido no solo en diferentes paises del mundo sino que su distribución es amplísima. Puede encontrarse en el suelo, aire, agua, aguas residuales, animales, alimentos, heces de animales de sangre caliente y en productos vegetales principalmente (BANWART, 1982). Según los datos publicados por la CDC en el año 1973, los piensos son el principal vehículo de transporte de salmonelas; el 32,6 % de ellas se aislan de los piensos. El segundo lugar lo ocupa el ganado vacuno, cerdos y sus productos, con un porcentaje del 14,9 % seguido de las aves de corral y sus derivados con un 8,2 %. Por último, hacen referencia a un grupo que comprende salmonelas procedentes de fuentes diversas a las que se les atribuye un porcentaje solo del 4,3 % (BANWART, 1982). Los datos correspondientes a los años 1980, 1981 en Inglaterra y Gales, Escocia y Francia respecto a los alimentos responsables del mayor número de intoxicaciones alimentarias situa a las aves como las responsables del mayor número de casos seguidos de carnes

sobre todo de cerdo y de leche (BES, 1982b).

Los principales alimentos vehiculizadores de salmonelas son por tanto los alimentos de origen animal. Debido a la gran importancia de los piensos en la transmisión de salmonelas, ciertos paises como Dinamarca, al realizar un tratamiento térmico de los piensos han encontrado que S. typhimurium puede reducirse de modo manifiesto en el ganado de cerda y en la volateria (TURNBULL, 1981). La implicación de la carne y productos cárnicos en la transmisión de Salmonella parece haber aumentado en los últimos 15 años (BANWART, 1982). La contaminación por este tipo de alimento puede producirse por consumo directo o bien a través de la contaminación de utensilios o mesas en las fábricas de elaboración, mercados al por mayor y al por menor asi como en las cocinas, con lo cual dichas carnes contaminan a alimentos que por si no portaban estos microorganismos (JAY, 1978; Mc KINLEY y cols. 1980; PATTERSON, 1969; DEL BAGLIVI y cols. 1981; ANDREWS y cols.1979; BANKS y col. 1983; BLANKENSHIP, 1978; AL-HINDAWI y col.1979; VANDERPOST Y COL. 1977). Las carnes de aves son de los alimentos más contaminados por salmonelas aunque ello depende de varias condiciones. Se sabe que más del 30% de las aves preparadas pueden contener bacterias del género Salmonella aunque probablemente estas no estén contaminadas antes de su preparación y solo al ser manipuladas en malas condiciones en los mataderos industriales por el equipo o las manos de los operadores, puede producirse una disminución en la canal de las aves que originalmente no estaba afectada (JAY, 1978; THOMAS y col. 1981; DEL BAGLIVI y cols.1981; AL-HINDAWI y col. 1979; HOADLEY y col .1974). Antiguamente los brotes de salmonelosis estaban relacionados con los huevos y los derivados. Sin embargo, desde que estos alimentos antes de su utilización se someten a procesos de pasteurización presentan menos problemas sobre todo si nos referimos a huevos congelados,

o deshidratados ya que los preparados a base de mahonesas, etc. siguen ocasionando gran cantidad de brotes según los datos aportados por los diferentes Boletines Epidemiológicos semanales de España. De igual forma, la leche y sus productos derivados, debido a los procesos de esterilización han disminuido considerablemente, aunque siguen produciendo problemas en bastantes ocasiones (BANWART, 1982).

Los mariscos y pescados han sido los responsables de numerosos brotes a lo largo de todos los años, sobre todo en aquellos lugares como Japón donde dichos productos son la base de su alimentación y al hecho de que muchos de ellos se consumen preferentemente en estado crudo (JAY, 1978; HOOD y col. 1983; SHRIVASTAVA, 1978).

Los alimentos vegetales pueden ser potencialmente responsables de la producción de intoxicaciones alimentarias. Este hecho estará en función de los sistemas de riego y cultivo de tales alimentos asi como de los sistemas de procesado, preparación de ensaladas, verduras congeladas y en general platos preparados a base de este tipo de alimentos que en algunos casos pueden realizarse con maquinarias o con el concurso de manipuladores que puedan portar estos microorganismos. Existen, además, gran cantidad de ensaladas vegetales congeladas y frescas en los cuales se ha detectado la presencia de salmonelas (CHRISTIANSEN y col. 1971; UBEDA RUIZ, 1979; ERCOLANI, 1976; TAMMINGA y cols.1978; VELAUDAPILLAI y cols.1969; SPLITTSTOESSER y col. 1970; GELDREICH y col. 1971; CONEJO Y cols.1978; HOLTZAPFFEL y col. 1968).

Es interesante señalar que todos los alimentos pueden en algún momento ser portadores de salmonelas aunque como se dijo anteriormente, los alimentos animales son los mayores responsables de este tipo de intoxicaciones alimentarias.

RAYMAN y cols. (1981), por ejemplo , encontraron que las pastas fabricadas en Canadá y las elaboradas en los hogares poseían

en algún caso salmonelas al igual que en cereales, vitaminas y enzimas (THOMASON y cols. 1977; ANDREWS y cols. 1979) y en zumos de manzana y sidra (GOVERD y cols.1979).

Los medicamentos pueden ser en algunos casos responsables de brotes de intoxicaciones alimentarias. Según el informe publicado por el Departamento de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos un número sorprendente de medicamentos de origen animal están contaminados por diferentes serotipos de salmonelas. Estos medicamentos son entre otros, polvo y comprimidos de tiroides, hormona pancreática, polvo de hígado, etc. (KRUGMAN y col. 1974).

Las aguas residuales procedentes de desechos humanos y animales asi como las de rios y lagos vehiculizan gran cantidad de salmonelas y pueden ser las responsables de la contaminación de los cultivos, del medio ambiente si no están protegidos y de la contaminación en los lugares de procesado de los alimentos si se utilizan para el lavado o elaboración de determinados productos. (PARVERY y cols. 1972; SANCHEZ-BUENAVENTURA y col. 1977; CHERRY y cols.1972; PARVERY y cols.1974; SMITH y cols.1978; HARVEY y cols. 1969; TELTSCH y cols. 1980; LANGELAND, 1982; WILEY y col. 1969; NARDI y col. 1977; GOYAl y cols.1977; DONDERO y cols. 1977; JONES y cols.1980).

Las aguas de mar son tambien en algunas ocasiones portadoras de salmonelas. La contaminación directa por esta via no es usual, si bien, esta contaminación de las aguas del mar puede tener una gran incidencia en el pescado y mariscos como transmisores de microorganismos del género Salmonella. La contaminación típica de los moluscos por las salmonelas se debe principalmente a la situación donde se encuentran los criaderos (DELIA y cols. 1979; REALI y cols.1975).

AYANWALE y cols. (1980) han realizado un estudio de la contaminación de salmonelas en piensos ensilados cuyos cultivos habian sido regados con aguas residuales y la incidencia de la contaminación de esos alimentos. ANDREWS y cols. (1975) determinan salmonelas en caracoles importados de Marruecos. El número de aislamientos fue del 31,1 %. Sin embargo, JIWA y cols. (1981) después de amplio estudio basado en el aislamiento de bacterias enterotoxigénicos en aguas y alimentos en una comunidad de Etiopía no encuentran salmonelas ni shigelas.

La persistencia de S. havana y coliformes fecales la confirma CHANDLER y cols. (1981) en pocilgas (Australia) significando que los coliformes fecales decrecen durante los primeros meses de otoño hasta la primavera. GRAU y cols. (1969) estudian la ingestión de alimentos contaminados con E. coli y salmonelas y su contenido en heces de oveja. Asimismo, en el ambiente de la zona costera del oeste de Australia, PARKER y col. (1982) y TEMPLE y cols. (1980) en heces enterradas en el estado de Montana hacen un estudio de la supervivencia de salmonelas y coliformes fecales.

Un estudio sobre la supervivencia de S. tennessee en el suelo y otros indicadores de contaminación fue realizado por BERGNER (1956) en Israel y observa que el número de Salmonelas disminuye antes que los demás indicadores. DRION y col. (1977) investiga la presencia de salmonelas y otros microorganismos en 6.830 alimentos de origen vegetal y animal y RODRIGUEZ REBOLLO (1964) lo hace en verduras y aguas de riego. THOMAS y col. (1971) relacionan la presencia de salmonelas y E. coli en almejas.

Los animales domésticos que cohabitan con familias pueden ser también una fuente de transmisión de salmonelas (TURNBULL. 1981).

Los manipuladores de alimentos son portadores de salmonelas, bien porque hayan padecido la enfermedad o porque al estar en contacto con alimentos contaminados se hayan hecho portadores asintomáticos. Ellos son una de las fuentes primordiales que han de ser tenidas en cuenta para evitar la proliferación de este tipo de infecciones (KRUGMAN y col. 1974).

Por último, aunque los alimentos y el agua son las principales fuentes de infección de salmonelas, no podemos olvidar la infección persona a persona, la cual ha originado gran cantidad de brotes en instituciones de internado, asilos, hospitales, etc. (TURNBULL, 1981).

h) Control de la infección

Actualmente no se conoce ningún método que elimine completamente la posibilidad de infección por Salmonella en el hombre. Existen métodos con los cuales se puede mejorar las condiciones higiénicas y de esta forma conseguir que la incidencia sea menor e incluso eliminar algunas de las causas de esta enfermedad. El control de los portadores tanto humano como animal asi como de los convalecientes y enfermos y el control sanitario e higiénico de los alimentos, son medidas eficaces para evitar la infección. En el caso de la fiebre entérica las medidas principales de que se dispone son el saneamiento y la inmunización (MANDAL, 1981). La incidencia de la fiebre entérica se ha reducido mediante la inmunización masiva que disminuye el riesgo de la enfermedad de modo considerable. Los programas de mejora sanitaria están dando en la actualidad resultados similares, el efecto es más duradero y a la larga se convertirán en el sistema más efectivo de lucha

(MANDAL, 1981). La disminución de la fiebre tifoidea tras la protección y cloración de las aguas y de los suministros es un claro ejemplo (BANWART, 1982).

El control de las salmonelas en los alimentos se basa principalmente en la utilización de materias primas no contaminadas para la elaboración de los productos y del tratamiento, almacenamiento y distribución en condiciones que impidan el desarrollo de los microorganismos del género Salmonella.

Las medidas de profilaxis general se basan en los siguientes puntos: a) evitar la contaminación; b) evitar el crecimiento y c) destruir los microorganismos (PIEDROLA y col. 1983).

Para evitar la contaminación es necesario extremar las precauciones sanitarias en mataderos y vigilar la producción y almacenamiento de los principales alimentos portadores de Salmonella como son las carnes, aves y huevos, asi como la vigilancia sanitaria de las personas dedicadas a la elaboración y al comercio de los alimentos. De igual forma, la limpieza cotidiana de las instalaciones de procesado reduce la diseminación de salmonelas (TURNBULL, 1981). Otro punto sería evitar el crecimiento de estos microorganismos conservando los alimentos a temperatura entre 4-5 ºC asi como la adición de ácidos a los piensos, principales portadores de salmonelas, con el fin de impedir el crecimiento (BANWART 1982). De modo general, las salmonelas a temperaturas inferiores a 12 ºC no se desarrollan aunque determinados serotipos pueden crecer como Salmonella heidelberg que lo hizo después de 19 dias de incubación a 5,3 ºC (MATCHES y col. 1968). No obstante, la destrucción de los microorganismos es la mejor forma de asegurar que no hay peligro para la salud. Esta destrucción es preferible que se realice en la fase final del envasado, con el fin de evitar la recontaminación del producto. El tratamiento térmico es el mejor método que

se conoce siempre que este se realice en condiciones adecuadas. Por ejemplo, en Dinamarca se ha utilizado este tratamiento para la reducción de salmonelas en piensos (TURNBULL, 1981).

La resistencia al calor de las salmonelas aisladas de leche en polvo se ha puesto de manifiesto por READ y cols. (1968) y confirma la supervivencia de determinados serotipos a las temperaturas de pasteurización de la leche. De otra parte, el efecto de la actividad del agua en la resistencia o sensibilidad al calor de las salmonelas frente a la resistencia al calor simplemente, se ha estudiado por BAIRD-PARKER y cols. (1970) y se observa que esta resistencia al calor no está relacionada con una actividad de agua baja. Resistencias comparativas del efecto del calor y de la radiación gamma en Salmonella typhimurium se han estudiado por CORRY y cols. (1969) llegando a la conclusión que la recuperación de las salmonelas dañadas es similar en todos los medios utilizados por ellos con excelentes resultados. Otros métodos consisten en la utilización del óxido de propileno para carnes y harinas, la fumigación de los piensos, cloración de las aguas, radiación de los alimentos, etc. Incluso, la cocción de los alimentos es un método eficaz para la destrucción de tales microorganismos.

Los efectos del pH y los niveles de materia orgánica en la muestra de salmonelas en pollos escaldados se han puesto de manifiesto confirmando que Salmonella typhimurium en agua caliente a pH 5,9-6,0, la muerte era independiente de los niveles de materia orgánica (HUMPHREY, 1981). La interacción del pH, NaCl y temperatura sobre el crecimiento y supervivencia de salmonelas ha sido estudiada por ALFORD y col. (1969).

La inactivación de salmonelas por radiaciones ionizantes se ha estudiado por BRANDON y cols. (1977) en Salmonella enteritidis en lodos de aguas residuales y confirman su inactivación en el

mismo rango de radiación que otras especies de salmonelas. GARY y col. (1981) estudian la supervivencia y crecimiento de bacterias asi como los efectos de la humedad en lodos de aguas residuales.

Un amplio estudio sobre supervivencia de salmonelas en diferentes alimentos se debe a MOSSEL (1963) en relación con la humedad, acidez, temperatura, radiaciones ionizantes, sustancias bactericidas, almacenamiento y otros factores antimicrobianos.

El efecto de la pasteurización sobre el contenido total de huevos salados se ha estudado por NG y col. (1979) en muestras conteniendo salmonelas y arizonas y recomienda la temperatura de 63,3 ºC y 3,5 minutos.

En huesos de carne procedentes de Argentina y Líbano se ha investigado por HARVEY y cols. (1978) los serotipos aislados en ambas muestras asi como los fagos de Salmonella typhimurium.

La supervivencia de salmonelas en aguas residuales asi como virus, Ascaris lumbricoides y Candida albicans ha sido estudiada por WILEY y col. (1969) y confirma la destrucción de estas patógenos indicadores cuando una temperatura de 60-70 ºC sea mantenida durante tres dias. En los mismos medios, YAZIZ y col. (1979) hacen un estudio de la supervivencia de salmonelas en los distintos tratamientos a que son sometidas las aguas residuales. Asimismo S dublin fue investigada en fermentaciones aerobias y en desechos de cerdo a una temperatura de 55 ºC en autoclave. En ambos casos se confirma un decrecimiento de los niveles de contaminación (GINNIVAN y cols. 1980).

I.6. NORMATIVA Y LIMITES MICROBIOLOGICOS EN ALIMENTOS

En el año 1959 los Estados miembros de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), estimaron conveniente el establecimiento de una serie de acuerdos internacionales con el fin de resolver las dificultades que surgían entre la aplicación de las distintas leyes alimentarias nacionales a la vez que se dictaban normas comunes a los diferentes Estados para proteger la salud de los consumidores. De esta forma se creó un organismo llamado "Codex Alimentarius Europeaus" y años más tarde apareció el "Codex Alimentarius", de obligado cumplimiento, al menos, para los Estados Europeos componentes de la Comisión (VALENZUELA GARCIA, 1981).

En virtud de las recomendaciones de la OMS, de la FAO y de la Comisión de Industrias Agrícolas y Alimentarias (CIIA), el Gobierno Español, por orden de 29 de marzo de 1960, creó una subcomisión de expertos, dentro de la Comisión Interministerial Tecnicosanitaria, con el fin de redactar un proyecto de Código Alimentario Español. Por decreto de 8 de agosto de 1974 entra en vigor este código estableciendo en el Decreto que continuarían teniendo vigencia las normas o reglamentaciones especiales alimentarias vigentes en ese momento mientras no fueran expresamente modificadas por otras dictadas en ejecución del Código, realidad que subsiste en el dia de hoy.

VALERIOLA, en su obra sobre Tratado de Policia de 1805 cita una referencia respecto al control de las frutas y legumbres e indica que "deben visitarse todos los dias y en todos los tiempos las frutas y legumbres que llegan y se exponen en venta en los mercados y plazas públicas. Si se encuentran corrompidos o gastados,

tomarles y castigar a los vendedores". "No permitir que se estercole ninguna tierra con estiércoles de cerdo para plantar o sembrar cosas dependientes al jardin o huerto, y en caso de contravención hacerlos arar o labrar, cortar lo que se encuentre y castigar al contraventor; y lo mismo debe entenderse en las tierras destinadas para legumbres.

Según las Ordenanzas de Granada de 1552, folio 234, Num. 3, se impone que "ningún hortelano ni persona alguna no sea osado de lavar fruta ni otra hortaliza en el rio de Darro el sucio, sino en agua limpia, so pena de perder la fruta y más de 50 maravedis".

El Código Alimentario Español, dedica su capítulo XXI a regular las hortalizas, verduras y legumbres, como productos hortícolas estableciendo en el Artículo 3.21.12 las condiciones generales para las hortalizas de consumo fresco, para las desecadas o deshidratadas y para las congeladas o derivados de conservas. Estas condiciones generales son:

a) Estarán recien recolectadas o en perfectas condiciones de conservación, desprovistas de humedad exterior anormal y sin olor ni sabor extraños.
b) Estarán exentas de lesiones o traumatismos de origen físico o mecánico que afecten a su presentación o apariencia.
c) Deberán estar exentos de artrópodos, gusanos, moluscos, y de partes o excrementos de cualquiera de ellos.
d) Estar exentos de enfermedades criptogámicas.
e) Estar libres de partes marchitas y de materias extrañas adheridas a su superficie.
f) Estar exentas de agentes microbianos patógenos.
g) No tener impurezas de pesticidas, en proporción superior a los límites de tolerancia que el Código establece.

Respecto a límites microbiológicos de control de verduras

y hortalizas la Legislación Alimentaria Española no establece nada. No obstante indica que se siga la normativa seguida por el Centro Nacional de Nutrición y Alimentación.

En general, un standard microbiológico, se puede definir como la parte de una ley o reglamento administrativo que determina el número máximo aceptable de microorganismos o de tipos específicos de microorganismos de acuerdo con los métodos prescritos, en cualquier alimento producido, empaquetado o importado en la zona de jurisdicción de la agencia ejecutiva (BANWART, 1982).

El gran problema con que nos encontramos en España es que solamente 6 ó 7 alimentos poseen una situación legal suficientemente clara. No existe una base legal para que el microbiólogo pueda emitir un informe con arreglo a unos parámetros mensurables quedando todo sujeto al buen saber del analista, por lo que puede dar lugar a una falta de valor en sus informes. Los criterios seguidos en los distintos laboratorios españoles se basan en recomendaciones emitidas por el Laboratorio del Centro de Alimentación y Nutrición (ORTIN, 1982). Estas recomendaciones poseen limitaciones. Por ejemplo, en el caso de las verduras y hortalizas frescas, al no existir ninguna recomendación que establezca límites microbiológicos permitidos para su consumo, sería necesario el establecimiento de una normativa que alcanzase a los diferentes grupos de alimentos.

El laboratorio del Centro de Alimentación y Nutrición (Majadahonda, Madrid), sin embargo, emite recomendaciones para las conservas y semiconservas de verduras y hortalizas tal como se recoge en la Tabla XV . En general, en conservas con esterilidad comercial se exige la ausencia de microorganismos que puedan crecer y multiplicarse originando la alteración del producto envasado, así como de gérmenes patógenos o sus toxinas.

TABLA XV .- CRITERIOS MICROBIOLOGICOS DE CONSERVAS Y SEMICONSERVAS VEGETALES

A. *Conservas vegetales*

- *Ausencia de microorganismos que crezcan y se multipliquen previas las pruebas de preincubación, durante 30 dias a 30ºC y los 10 dias a 44ºC.*
- *Flora esporulada: máximo 10 esporas/g de Bacillaceae termoestables no patógenos, no toxigénicos e incapaces de alterar la conserva.*
- *Ausencia de toxina botulinica en todo el contenido del envase.*

B. *Semiconservas vegetales*

	Semiconservas pasteurizadas (Trat. térmico y sal)	*Tratamiento con sal y/o aceite*	*Tratamiento con sal y/o ahumado*
Recuento total de aerobias revivificables	*Máx. 1 x 10^4/g*	*Máx. 1 x 10^5/g*	*Máx. 1 x 10^5/g*
Enterobacteriaceae	*Ausencia/g*	*Máx. 1 x 10/g*	*Máx. 1 x 10/g*
Escherichia coli	*Ausencia/g*	*Ausencia/g*	*Ausencia/g*
Salmonella-Shigella	*Ausencia/25g*	*Ausencia/25g*	*Ausencia/25g*
St. aureus enterotox.	*Ausencia/g*	*Ausencia/g*	*Ausencia/g*
Clostridium sulf-red	*Ausencia/g*	*Ausencia/g*	*Ausencia/g*

Los límites microbiológicos establecidos por diferentes autores y organismos internacionales respecto a verduras y hortalizas son los siguientes. ELLIOTT (1961) en una revisión de normas microbiológicas para alimentos congelados indica que las verduras pueden poseer un mínimo de 50.000 y un máximo de 500.000 microorganismos aerobios totales por gramo, no deben poseer coliformes en 0,1 g de alimento y ausencia absoluta de estafilococos, salmonelas, shigelas y enterococos. La ICMSF (1982) para este mismo tipo de alimentos congelados establece los siguientes límites: un mínimo de 10^4 y un máximo de 10^6 microorganismos aerobios, unos límites de coliformes comprendidos entre 10 y 10^3 coliformes por gramo.

La NAS (1974) indica que para hortalizas frescas, el contenido microbiano por gramo debe estar comprendido entre 50.000 y 500.000. Para las verduras en salsa la ICMSF (1981) establece para microorganismos aerobios valores de 10^5 -10^6 , coliformes 10^2 -10^4 , E. coli menor de 3-10^2 y ausencia de Salmonella. En cuanto a las verduras desecadas esta misma Comisión establece los valores de E. coli menor de 3 y máximo de 10^2 por gramo y ausencia tambien de Salmonella.

Para hortalizas congeladas, FRAZIER (1972) dice que al entrar estos alimentos en los congeladores no deben contener más de 50.000 bact./g en el caso de los guisantes; 60.000 en el maiz, y no más de 100.000 en las judias verdes. Indica a su vez que la mayoría de los investigadores están de acuerdo que las hortalizas congeladas no deben poseer más de 100.000 bacterias/g.

Por otro lado existen las opiniones de determinados autores como PEDERSON (1947) quien considera que los recuentos en vegetales congelados deben oscilar entre 10^4 -10^5 bact./g y que recuentos superiores a 10^6 indican un mal manejo de la materia

prima HOBBS (1953) estima que los recuentos superiores a 10^6 pueden dar lugar a intoxicaciones alimentarias.

I.7.NORMATIVA LEGAL DE AGUAS RESIDUALES

La contaminación de las aguas es un concepto que posee una notoria ambigüedad asi como una cierta falta de precisión. En 1961, la Organización Mundial de la Salud define que "unas aguas están contaminadas cuando su composición o su estado están alterados de tal modo que ya no reúnan las condiciones de una u otro, o el conjunto de utilizaciones a las que se hubiere destinado en su estado natural". En este concepto se incluyen las modificaciones de las propiedades químicas, biológicas y físicas del agua que hacen de unas aguas aptas o no para su consumo público (ROCA Y VALENZUELA, 1981). Por todo ello, el concepto de contaminación no puede basarse en categorizaciones absolutas. Se trata más bien de una idea relativa que parte de modificaciones no admisibles de las características del agua (ROCA Y VALENZUELA, 1981).

En nuestro derecho positivo el término de la contaminación de las aguas aparece por primera vez en el Reglamento de Actividades Molestas, Insalubres, Nocivas y Peligrosas aprobado por Decreto de 30 de Noviembre de 1961 y posteriormente, la O.M. de 23 de Diciembre de 1971 estableció cuales eran los elementos contaminantes.

Las aguas residuales están constituidas por vertidos urbanos, industriales y agrícolas. Los vertidos urbanos son los procedentes de los residuos domésticos los cuales están en constan-

te aumento debido al crecimiento de la población y a la elevación del nivel de vida (OMS, 1967). El control de estas aguas es de una gran importancia ya que en ellas se vehiculizan cantidades de microorganismos patógenos responsables de la producción de epidemias. Dentro de estas aguas urbanas merecen especial atención las procedentes de hospitales y centros sanitarios que generalmente están enclavados en núcleos urbanos y que vierten sus residuos a la red cloacal. A estos hospitales es preciso exigirles el establecimiento de unos servicios de depuración rigurosos antes de verter en los alcantarillados, cosa que generalmente no sucede. El control de estas aguas es importante ya que esos centros sanitarios que producen gran cantidad de microorganismos patógenos desaguan en aguas que regularmente sirven de riego a los cultivos situados aguas abajo de las poblaciones favoreciendo con ello la contaminación de dichos campos y la posibilidad de que el ser humano contraiga infecciones por el consumo de estos tipos de alimentos altamente contaminados (ROCA Y VALENZUELA, 1981).

En este sentido el Reglamento de Sanidad Municipal aprobado por el Real Decreto de 9 de Febrero de 1925, y las Instrucciones técnico-sanitarias para pequeños municipios (Orden de 3 de enero de 1923), establecen que, como norma general, por ser peligroso para la salud pública se prohiba: 1) Emplear las materias excrementicias brutas para el abono de terrenos que no sean de alto cultivo, a no ser que se encuentren a más de doscientos metros de algún poblado y de que sean cubiertas dichas materias de una capa de tierra. 2) Utilizar los líquidos efluentes de los pozos sépticos, etc. para el riego de terrenos en los que se cultiven a ras de tierra legumbres o productos destinados al consumo crudo, como tomates, lechugas, repollos, etc. 3) Cultivar dichas hortalizas,

legumbres, etc., en los campos de irrigación agrícola o, en general, en los que se reciban aguas residuales para su depuración, a menos de establecer dichos riegos en las debidas condiciones que impidan la propagación de los gérmenes productores de infecciones intestinales.

Por todo lo cual, el Decreto de 25 de Junio de 1954 establece las normas para la concesión de nuevas autorizaciones y ampliaciones en relación con las aguas residuales de las industrias y minas las cuales serán "efectiva y eficazmente depuradas antes de ser vertidas directa o indirectamente en los cauces públicos" (Art. 1) y la orden de 4 de septiembre de 1959 "prohibe el vertido directo o indirecto" de aguas residuales cuya composición química o bacteriológica puedan producir daño para la salud pública. Los órganos competentes de la Administración del Estado son las Comisarías de Aguas para conocer los asuntos referentes a esta materia, en especial al vertido de estas aguas (Orden de 23 de Marzo de 1.960). Normas complementarias para el vertido de aguas residuales referidos a extremos como corriente de agua en la que ha de realizarse el vertido, volúmenes medio y máximo y velocidad de las mismas, etc., se establecen en la Orden de 9 de Octubre de 1962.

El Decreto de 19 de Diciembre de 1970 se refiere a los requisitos mínimos de establecimientos hoteleros que han de cumplir para el tratamiento y evacuación de aguas residuales y la Orden de 29 de Abril de 1977 ratifica, amplia y da nueva redacción a la de 23 de Abril de 1969, por la que fueron aprobadas las "Normas provisionales para el proyecto de instalaciones depuradoras y de vertido de aguas residuales al mar en las costas españolas". Estas Normas regulan además el vertido al mar desde tierra, de las aguas residuales a través de emisarios submarinos.

Finalmente, la Orden de 14 de Abril de 1980 contiene las medidas para corregir la contaminación por el vertido de aguas residuales en aplicación del Reglamento de Policía de Aguas y sus Cauces.

MATERIAL Y METODOS

II. MATERIAL

II.1. Muestras de aguas de riego

En aguas procedentes de la Acequia Gorda y del rio Genil en su confluencia con el rio Darro se investigaron los siguientes parámetros:

- Recuento total de bacterias aerobias
- Recuento de coliformes totales
- Recuento de Escherichia coli
- Recuento de Estreptococos fecales
- Recuento de Clostridios sulfito reductores.

De forma simultánea se ha realizado la investigación de microorganismos del género Salmonella.

La recogida de muestras se efectuó durante un periodo de dos años, desde Marzo de 1981 a Febrero de 1983. Las tomas se practicaron en dos puntos del cauce de las aguas a su paso por la Vega de Granada; el primer punto intermedio y el segundo a la entrada de las aguas en las fincas seleccionadas para el estudio, con una periodicidad de dos muestras recogidas cada mes. El total de muestras fue de 96 en la Acequia Gorda y de 85 en el rio Genil.

A continuación se exponen los puntos elegidos para la toma de muestras que puede también observarse en la figura 2.

Punto A: Compuerta en el Rio Genil para la entrada en el Pago.

Punto B: Entrada en la finca "Huerta de Salmerón".

Punto C: Acequia Gorda a la altura de la Cruz de los Carniceros

Punto D: Entrada a las fincas en el Callejón de la Garnatilla

II.2. Muestras de verduras y hortalizas

La recogida de muestras de verduras se realizó de acuerdo con la siguiente distribución: a) muestras procedentes de fincas de la Vega de Granada, b) mercado central, c) supermercados y d) establecimientos pequeños.

En cada una de las muestras se estudiaron:

- Recuento total de bacterias aerobias
- Recuento de coliformes totales
- Recuento de *Escherichia coli*
- Investigación de salmonelas.

La recogida de muestras se hizo como en las aguas, durante dos años consecutivos que abarcaron las mismas fechas. El número total de muestras analizadas fue de 849.

II.2.1. Muestras procedentes de fincas de la Vega de Granada

Las fincas elegidas para este estudio fueron tres, dos de ellas regadas por aguas de la Acequia Gorda y la tercera por aguas del rio Genil en su confluencia con el rio Darro.

El total de muestras analizadas fueron 107. Las especies de verduras y hortalizas, asi como el número de ellas viene indicado en la Tabla XVI.

II.2.2. Muestras procedentes del Mercado Central

El número de muestras recogidas en el Mercado Central fué de 117 correspondientes a 27 especies que aparecen indicadas en la Tabla XVII.

TABLA XVI.- NUMERO DE ESPECIES DE VERDURAS, HORTALIZAS Y OTROS PRODUCTOS HORTICOLAS RECOGIDAS EN FINCAS DE LA VEGA DE GRANADA PARA SU ANALISIS MICROBIOLOGICO.

NOMBRE GENERALIZADO	NOMBRE CIENTIFICO	Muestras anal. Nº
Bulbos		
Ajo	*Allium sativum*, L.	2
Cebolla	*Allium cepa*, L.	5
Cebolleta	*Allium fistulosum*, L.	5
Puerro	*Allium porrum*, L.	3
Coles		
Repollo	*Brassica rubra oleracea*, L. var. *capitata*, D.C.	4
Frutos		
Pimiento	*Capsicum annuum*, L. var. *grosum*, Bailey	3
Hojas y tallos tiernos		
Acelga	*Beta vulgaris*, L. var. *cycla*, L.	12
Escarola	*Cichorium endivia*, L.	6
Espinaca	*Spinacia oleracea*, L.	12
Lechuga	*Lactuca sativa*, L.	33

TABLA XVI .- (continuación)

NOMBRE GENERALIZADO	NOMBRE CIENTIFICO	Muestras anal. Nº
Legumbres verdes		
Habas	Vicia faba, L. var. mayor, L.	7
Peponides		
Calabacin	Cucurbita pepo, L. var. medullusa, Alef.	1
Pepino	Cucumis sativus, L.	5
Raices		
Rábano	Raphanus sativus, L. var. alba	2
Remolacha de mesa	Raphanus sativus, L. var. cruenta, L.	2
Tallos jóvenes		
Apio	Apium graveolens, L.	2
Tubérculos		
Patata	Solanum tuberosum, L.	3
TOTAL ESPECIES		107

Nota: La clasificación y denominación corresponde al C.A.E.

TABLA XVII.- NUMERO DE ESPECIES DE VERDURAS, HORTALIZAS Y OTROS PRODUCTOS HORTICOLAS RECOGIDOS EN EL MERCADO CENTRAL PARA SU ANALISIS MICROBIOLOGICO.

NOMBRE GENERALIZADO	NOMBRE CIENTIFICO	Muestras anal. Nº
Bulbos		
Ajo	Allium sativum, L.	1
Cebolla	Allium cepa, L.	7
Cebolleta	Allium fistulosum, L.	2
Puerro	Allium porrum, L.	4
Coles		
Coliflor	Brassica oleracea, L., var. botrytis F cauliflora, Duch.	3
Repollo	Brassica rubla oleracea, L., var. capitata f. alba, D.C.	6
Frutos		
Berenjena	Solanum melongena, L.	7
Pimiento	Capsicum annuum, L., var. grosum, Bailey,	8
Hojas y tallos tiernos		
Acelga	Beta vulgaris, L., var. cycla, L.	8
Escarola	Cichorium endivia, L.	4
Espinaca	Spinacia oleracea, L.	4
Lechuga	Lactuca sativa, L.	7
Legumbres verdes		
Habas	Vicia faba, L., var. mayor, L.	2
Judia	Phaseolus vulgaris, Savi	7

TABLA XVII .- (continuación)

NOMBRE GENERALIZADO	NOMBRE CIENTIFICO	Muestras anal. Nº
Peponides		
Calabacin	Cucurbita pepo, L., var. medullusa ,Alef.	4
Calabaza	Cucurbita pepo, L.	5
Pepino	Cucumis sativus, L.	5
Raices		
Nabo	Brassica napus, L., var. sculenta	2
Rábano	Raphanus sativus, L., var. alba	2
Remolacha de mesa	Raphanus sativus, L., var. cruenta. L.	2
Zanahoria	Dacus carota, L., var. sativa, D.C.	5
Tallos jóvenes		
Apio	Apium graveolens, L.	1
Espárrago	Asparagus officinalis, L.	2
Tubérculos		
Patata	Solanum tuberosum , L.	3
Boniato	Ipomea batata, L.	2
Frutas		
Tomate	Solanum lycopersicum, Mill	7
Hongos comestibles		
Champiñón	Psalióta campestris Fr.	1
TOTAL MUESTRAS		117

Nota: La clasificación y denominación corresponde al C.A.E.

II.2.3. Muestras procedentes de Supermercados

Se han recogido para su estudio un total de 277 muestras de verduras y hortalizas procedentes de supermercados de Granada capital. La localización de los supermercados donde se efectuó la recogida se indica en la figura 3 y las diferentes especies analizadas en la Tabla XVIII.

II.2.4. Muestras procedentes de Establecimientos pequeños

348 muestras de verduras y hortalizas se recogieron de establecimientos comerciales cuya localización se indica en la figura 3. En la Tabla XIX se representa el número y tipo de muestras recogidas en dichos establecimientos.

II.2.5. Muestras de verduras tratadas con aliño

Para el estudio de la incidencia del aliñado en la contaminación se obtuvieron un total de 97 muestras, de ellas 49 de tomate y 48 de lechuga procedentes de un mismo establecimiento. Los análisis realizados con estas muestras fueron:

- *Recuento total de bacterias aerobias*
- *Recuento de coliformes totales*
- *Recuento de <u>Escherichia coli</u>*

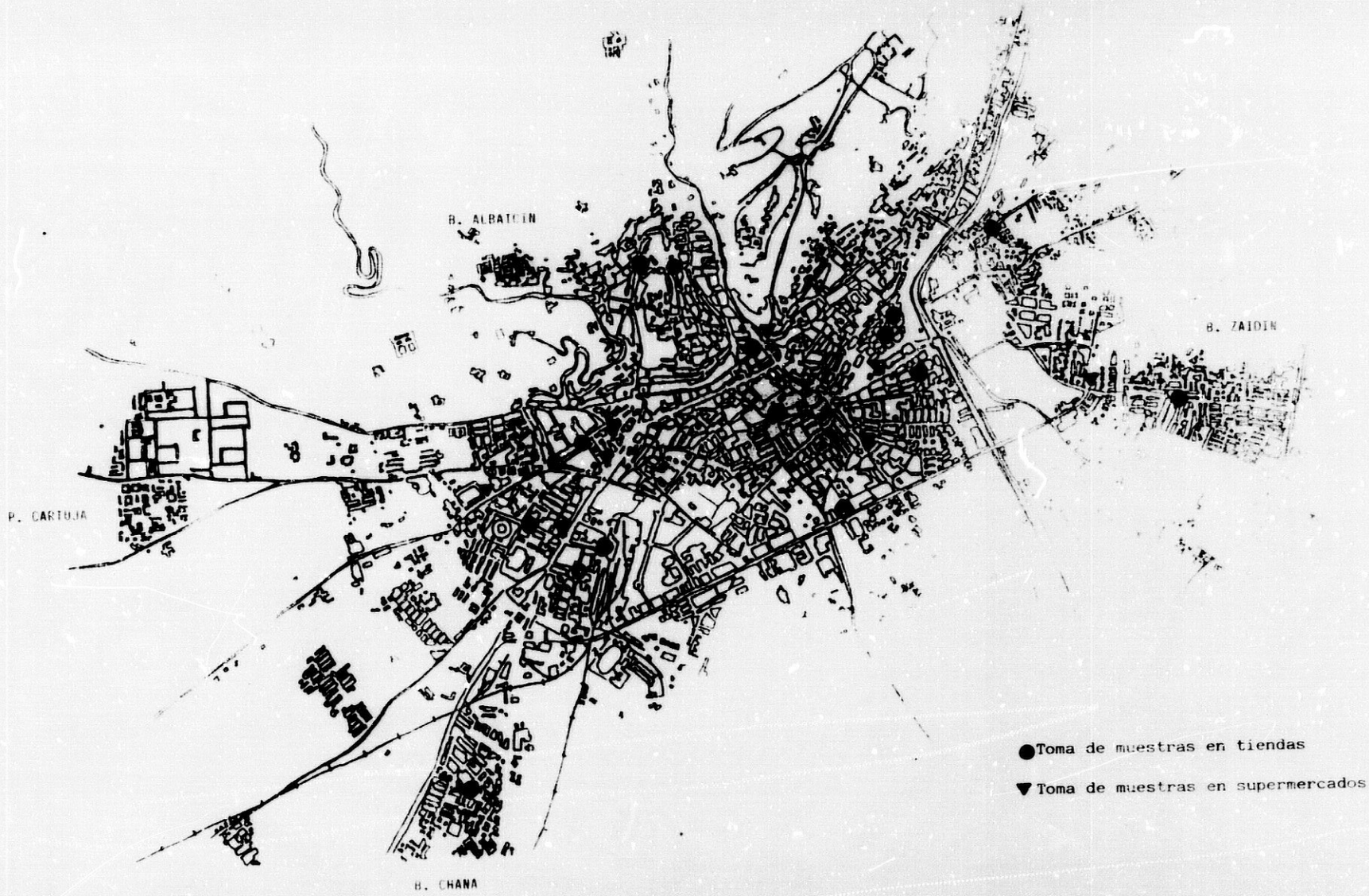


FIGURA 3.- ***DISTRIBUCION ESPACIAL DE LOS LUGARES DE RECOGIDA DE MUESTRAS***

(Tiendas y Supermercados)

TABLA XVIII.-NUMERO DE ESPECIES DE VERDURAS, HORTALIZAS Y OTROS PRODUCTOS HORTICOLAS RECOGIDAS EN SUPERMERCADOS PARA SU ANALISIS MICROBIOLOGICO.

NOMBRE GENERALIZADO	NOMBRE CIENTIFICO	Muestras anal. Nº
Bulbos		
Ajo	*Allium sativum*, L.	2
Cebolla	*Allium cepa*, L.	13
Cebolleta	*Allium fistulosum*, L.	6
Puerro	*Allium porrum*, L.	10
Coles		
Coles de Bruselas	*Brassica oleracea*, L., var. *gemmifera*, Zenker	1
Coliflor	*Brassica oleracea*, L., var. *botrytis* F. *cauliflora*, Duch.	10
Repollo	*Brassica rubla oleracea*, L., var. *capitata*, D.C.	14
Frutas		
Tomate	*Solanum lycopersicum*, Mill	15
Frutos		
Berenjena	*Solanum melongena*, L.	11
Pimiento	*Capsicum annuum*, L. var., *grosum*, Bailey.	23
Hojas y tallos tiernos A		
Acelga	*Beta vulgaris*, L., var. *cycla*, L.	14
Cardo	*Cynara cardunculus*, L.	2
Endibia	*Cichorium intybus*, L.	1
Escarola	*Cichorium endivia*, L.	8
Espinaca	*Spinacia oleracea*. L.	11
Lechuga	*Lactuca sativa*, L.	16

TABLA XVIII.- (Continuación)

NOMBRE GENERALIZADO	NOMBRE CIENTIFICO	Muestras anal. Nº
Inflorescencia		
Alcachofa	*Cynaria scolymus*, L.	9
Legumbres verdes		
Haba	*Vicia faba*, L., var. *mayor*, L.	7
Judia	*Phaseolus vulgaris*, Savi	18
Peponides		
Calabacin	*Cucurbita pepo*, L., var. *medullusa*, Alef.	12
Calabaza	*Cucurbita pepo*, L.	3
Pepino	*Cucumis sativus*, L.	11
Raices		
Rábano	*Raphanus sativus*, L., var. *alba*	1
Zanahoria	*Dacus carota*, L., var. *sativa*, D.C.	
Tallos jóvenes		
Apio	*Apium graveolens*, L.	12
Espárrago	*Asparagus officinalis*, L.	2
Tuberculos		
Boniato	*Ipomea batata*, L.	2
Patata	*Solanum tuberosum*, L.	11
Hongos comestibles		
Champiñón	*Psaliota campestris* Fr.	5
Condimentos aromaticos		
Perejil	*Petroselinum sativum*, L.	10
TOTAL ESPECIES		277

Nota: La clasificación y denominación corresponde al C.A.E.

TABLA XIX .- NUMERO DE ESPECIES DE VERDURAS, HORTALIZAS Y OTROS PRODUCTOS HORTICOLAS RECOGIDAS EN ESTABLECIMIENTOS PEQUEÑOS PARA SU ANALISIS BROMATOLOGICO

NOMBRE GENERALIZADO	NOMBRE CIENTIFICO	Muestras anal. Nº
Bulbos		
Ajo	*Allium sativum*, L.	3
Cebolla	*Allium cepa*, L.	20
Cebolleta	*Allium fistulosum*, L.	9
Puerro	*Allium porrum*, L.	12
Coles		
Coles de Bruselas	*Brassica oleracea*, L. var. *gemmifera*. Zenker	1
Coliflor	*Brassica oleracea*, L. var. *botrytis* F. *cauliflora* , Duch	10
Repollo	*Brassica rubla oleracea*, L. ,var. *capitata* D.C.	17
Frutas		
Tomate	*Solanum lycopersicum*, Mill	24
Frutos		
Berenjena	*Solanum melongena*, L.	17
Pimiento	*Capsicum annuum*, L. var. ,*grosum*. Bailey	35

TABLA XIX.- (continuación)

NOMBRE GENERALIZADO	NOMBRE CIENTIFICO	Muestras anal. Nº
Hojas y tallos tiernos		
Acelga	*Beta vulgaris*, L., var. *cycla*, L.	18
Cardo	*Cynara cardunculus*, L.	2
Escarola	*Cichorium endivia*, L.	9
Espinaca	*Spinacia oleracea*, L.	11
Lechuga	*Lactuca sativa*, L.	24
Inflorescencia		
Alcachofa	*Cynaria scolymus*, L.	14
Legumbres verdes		
Haba	*Vicia faba*, L., var. *mayor*	6
Judia	*Phaseolus vulgaris*, Savi	23
Peponides		
Calabacin	*Cucurbita pepo*, L. var., *medullusa*, Alef.	18
Calabaza	*Cucurbita pepo*, L.	2
Pepino	*Cucumis sativus*, L.	14

TABLA XIX .- (continuación)

NOMBRE GENERALIZADO	NOMBRE CIENTIFICO	Muestras anal. Nº
Raices		
Rábano	Raphanus sativus, L.,var. alba	2
Zanahoria	Dacus carota, L. var.,sativa , D.C.	22
Remolacha	Raphanus sativus, L.,var. cruenta, L.	1
Tallos jóvenes		
Apio	Apium graveolens, L.	7
Espárrago	Asparagus officinalis, L.	1
Tubérculos		
Boniato	Ipomea Batata, L.	1
Patata	Solanum tuberosum, L.	14
Hongos comestibles		
Champiñón	Psaliota campestris Fr.	2
Condimentos aromaticos		
Perejil	Petroselinum sativum, L.	9
	TOTAL ESPECIES	348

Nota: La clasificación y denominación corresponde al C.A.E.

II.3. Supervivencia de salmonelas en lechugas cultivadas

Para comprobar la supervivencia de salmonelas en lechugas en el entorno natural, se procedió a la contaminación con dicho microorganismo de forma artificial en una serie de muestras sembradas con este fin.

II.4. Salmonelas de referencia

Simultáneamente a nuestro estudio se han identificado las distintas Salmonelas aisladas en pacientes de la provincia de Granada durante los años 1979 a 1983 con el propósito de comprobar la posible concordancia entre datos del medio ambiente y el de los enfermos.

II.5. Medios de cultivo e identificación

-Agua de peptona: 1 g de Polypectone Peptone (BBL), 8,5 g de cloruro sódico (Panreac), 1000 ml de agua destilada.
-Solución de PBS: fosfato disódico (Merck) 5,48 g; fosfato monosódico monohidratado (Merck) 1,575 g; cloruro sódico (Panreac) 42,5 g y agua destilada 1000 ml. Diluir 1/4 con agua destilada.
-Agar recuento. Plate count agar (Difco)
-Caldo Mc Conkey. Mc Conkey Broth (BBL)
-Agar EMB. Levine eosin methylen blue agar (BBL)
-Caldo azida con azul de bromotimol. Azide dextrose broth (BBL) con azul de bromotimol (Merck) 34 mg/l.

- Caldo de Listky. Ethyl violet azide broth (BBL)
- Agar Wilson-Blair. TSN agar (BBL)
- Agar Mueller Hinton (Pronadisa)
- Caldo LBT: Bacto Tryptone (Oxoid) 10 g; Extracto de levadura (Difco) 5 g; Cloruro sódico (Probus) 5 g; Timina (Sigma) 0,08 g; Agua destilada 1000 ml.
- Caldo tetrationato-Kauffmann

  Composición:

Polypectone pectone (BBL)	50 g/l
Sales biliares	10 g/l
Carbonato cálcico	100 g/l
Tiosulfato sódico	300 g/l
Solución de iodine:	
(Iodo (Panreac) 6 g; IK (Panreac) 5 g y agua destilada 20 ml)	190 ml/l
Solución verde brillante:	
(Verde brillante (Merck) 0,1 g; agua 100 ml)	95 ml/l
Novobiocina (Sigma) (40 mcg/ml)	10 ml/l

- Caldo Rappaport modificado R25

  <u>Solución A</u>

Bactotriptona (Difco)	5 g/l
Cloruro sódico (Panreac)	8 g/l
Bifosfato potásico (Merck)	1,6 g/l

  <u>Solución B</u>

Cloruro magnésico hexahidratado (Sigma)	400 g/l

  <u>Solución C</u>

Oxalato de verde malaquita (Merck)	0,4 g
Agua destilada	100 ml

El medio está compuesto por 1000 ml de la solución A, 100 ml de la solución B y 10 ml de la solución C. La mezcla se conservó en frio hasta su utilización. Antes del uso se añadió novobiocina a una concentración de 40 mg/l.

- Agar Salmonella-Shigella. SS agar (BBL)

  Medio de Craigie. Motility GI Medium (Difco)

Para la identificación bioquímica de Salmonella y Escherichia coli se utilizaron:

- Medio de Kliger hierro (Pronadisa)
- Caldo Indol: Bactotriptona (Difco) 30 g/l y Cloruro sódico (Panreac) 10 g/l.
- Caldo Lisina: Decarboxilasa base Moeller (Difco) 10 g/l y L-lisine (Sigma) 10 g/l.
- Caldo malonato. Malonate Broth (Difco)
- Discos de ONPG (BBL)
- Urea Broth (Difco)
- Agar fenilalanina. Phenilalanine agar (Difco)
- Agar citrato. Simmons Citrate Agar (Pfizer)
- Sueros para la identificación del género Salmonella
- Frueba del tartrato: Peptona (BBL) 10 g; Azul de bromotimol (Merck) al 0,2 % 12 ml; tartrato sódico potásico (Panreac) 10 g y agua destilada 1000 ml

II.6. Antibióticos

Se utilizaron los discos de antibióticos suministrados comercialmente por los laboratorios Difco y BBL para la obtención de la sensibilidad de las salmonelas a los antibióticos y quimioterápicos de uso más frecuente en el antibiograma. En la Tabla

XX se indican los discos utilizados en el antibiograma asi como el código de identificación y la carga correspondiente del mismo en mcg.

En la preparación de los medios Tetrationato-Kauffmann y Rappaport, la novobiocina añadida para la inhibición de los microorganismos del género Proteus se obtuvo tambien de forma comercial de los laboratorios Sigma.

TABLA XX .- DISCOS DE ANTIBIOTICOS UTILIZADOS EN LOS ANTIBIOGRAMAS

ANTIBIOTICO Y QUIMIOTERAPICO	CODIGO	CARGA DEL DISCO en mcg.
Amikacina	AN10	10
Aminosidina	GB30	30
Ampicilina	AM10	10
Carbenicilina	CB50	50
Cefalotina	CF30	30
Cefamandol	MA30	30
Cefoxitina	FOX30	30
Cloranfenicol	C30	30
Colimicina	CL10	10
DKB	DKB30	30
Fosfomicina	FO50	50
Gentamicina	GM10	10
Kanamicina	K30	30
Neomicina	N10	10
Nalidixico	NA10	10
Paromomicina	Par	30
Rifampicina	RA50	50
Sisomicina	Sis	30
Tetraciclina	Te30	30
Triple sulfa	SSS	250
Tobramicina	NN10	10

III. METODOS

III.1. Recogida de muestras

III.1.1. Aguas de riego

La recogida de muestras se llevó a cabo mediante el uso de recipientes de vidrio de un litro de capacidad con tapones de cierre hermético y previamente esterilizados. El volumen de agua recogida fué de 1 litro y la toma se realizó a 10-20 cm de profundidad y a contracorriente. El traslado de las muestras al laboratorio se hizo con la máxima rapidez y la siembra se practicó, en todos los casos, antes de que transcurrieran dos horas. Dada la proximidad de la zona de muestreo al laboratorio no se creyó necesario el traslado de las muestras a temperatura de refrigeración.

III.1.2. Verduras y Hortalizas

Las muestras se recogieron en los diferentes establecimientos según sus características normales de venta. Se introdujeron individualmente en bolsas de plástico previamente esterilizadas y se trasladaron al laboratorio con la máxima brevedad. Hasta la siembra, las muestras se guardaron a temperatura de refrigeración sin que este tiempo fuese nunca superior a tres horas. La recogida de muestras del campo fue similar a la descrita anteriormente.

III.2. Preparación de las muestras

III.2.1. Aguas de riego

Debido a la gran contaminación de este tipo de muestras, antes de proceder al análisis se realizaron diversas diluciones para lograr resultados más precisos. Diluyente: solución de cloruro sódico al 8,5 % y según el análisis, las diluciones abarcaron desde 10^{-1} a 10^{-7}.

III.2.2. Verduras y Hortalizas

Se procedió de la forma siguiente antes de realizar la siembra de las diferentes muestras:

a) Pesada de las muestras.- En condiciones de máxima asepsia, se pesaron 100 gramos de cada una de las verduras.

b) Lavado de las muestras.- El vegetal pesado se troceaba en pequeñas porciones y se introducía en recipientes de plástico de 500 ml de capacidad previamente esterilizados. A continuación se añadían 250 ml de agua de peptona (II.1.5.) y se mantenía en agitación durante una hora.

c) Revitalización.- La solución de lavado de las muestras se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas con el fin de revitalizar los microorganismos existentes. En el caso de los vegetales ácidos como el tomate se neutralizó con disolución de fosfato sódico al 5% hasta conseguir un pH comprendido entre 6-7.

d) Dilución de las muestras.- Una vez revitalizadas se añadió agua de peptona estéril hasta alcanzar las diluciones 10^{-1} a 10^{-4}

para el recuento de bacterias aerobias.

III.2.3. Verduras y hortalizas tratadas con aliño

Para la realización de esta experiencia se seleccionaron dos tipos de muestras, tomate y lechuga por considerar a estos como los vegetales de mayor consumo al estado fresco en ensaladas.

El aliñado y la preparación de la muestra para su análisis se hizo del modo siguiente:

a) Pesada de las muestras.- Se partió de aquellas que tuvieran un peso mínimo por unidad de 175 gramos. Para el análisis se emplearon 150 g de lechuga y 125 g de tomate.

De los 150 g de lechuga se separan 25 g de las hojas externas, 25 g de las internas y después de lavar con agua del grifo los 100 g restantes se separaron 25 g y el resto se aliñó con 2 ml de aceite de oliva, 2 ml de vinagre y la cantidad de sal habitual.

Del tomate se separó un trozo de 25 g y el resto fué lavado con agua del grifo. Después de separar otros 25 g, el resto se aliñó como ya se ha indicado.

Las muestras fueron aliñadas en placas de petri estériles de 14 cm de diámetro.

b) Lavado de muestras.- Una vez troceadas se introdujeron en recipientes de plástico de 500 ml de capacidad previamente esterilizados y se añadieron 225 ml de agua de peptona. En el caso de las muestras aliñadas, el lavado se realizó después de diferentes tiempos de contacto con el aliño (15', 30' y 4h). El lavado de todas las muestras se realizó en agitación

durante una hora. Antes del lavado las muestras se neutralizaron con fosfato sódico hasta alcanzar un pH = 7.

c) Revitalización.- Se realizó en la forma indicada en II.2.2.c.

d) Dilución.- Se practicaron diluciones del agua de lavado desde 10^{-1} a 10^{-4}.

Las figuras 4 y 5 representan esquemáticamente las experiencias realizadas.

III.2.4. Cultivo y contaminación de lechugas

a) Cultivo.- Una serie de semillas de lechuga germinadas, se sembraron de forma aislada en tiestos de barro de 35 cm de diámetro y se dejaron para su crecimiento en la forma habitual de cultivo de la vega de Granada. El riego periódico se realizó con agua potable y el tiempo de crecimiento duró un mes aproximadamente, hasta alcanzar el tamaño normal de recolección.

b) Contaminación.- Una vez crecidas las lechugas se procedió a la contaminación mediante un cultivo de salmonelas en fase exponencial de crecimiento correspondiente a la cepa de Salmonella Kapemba AR-74A cuyas características y marcadores se indican en la Tabla XXI.

El agua para el riego fue tratada con disolución de tiosulfato sódico al 10‰ para reducir al cloro libre y después de una hora de reposo se contaminó con salmonelas hasta una concentración de 2×10^6 bacterias/ml. En cada uno de los riegos se emplearon 500 ml de agua contaminada.

Las lechugas se contaminaron dos veces con un intervalo de 3 dias. La recogida de las muestras se realizó al sexto y treceavo dia de su contaminación.

Figura 4 .- ESQUEMA DEL TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE LECHUGAS TRATADAS CON ALIÑO.

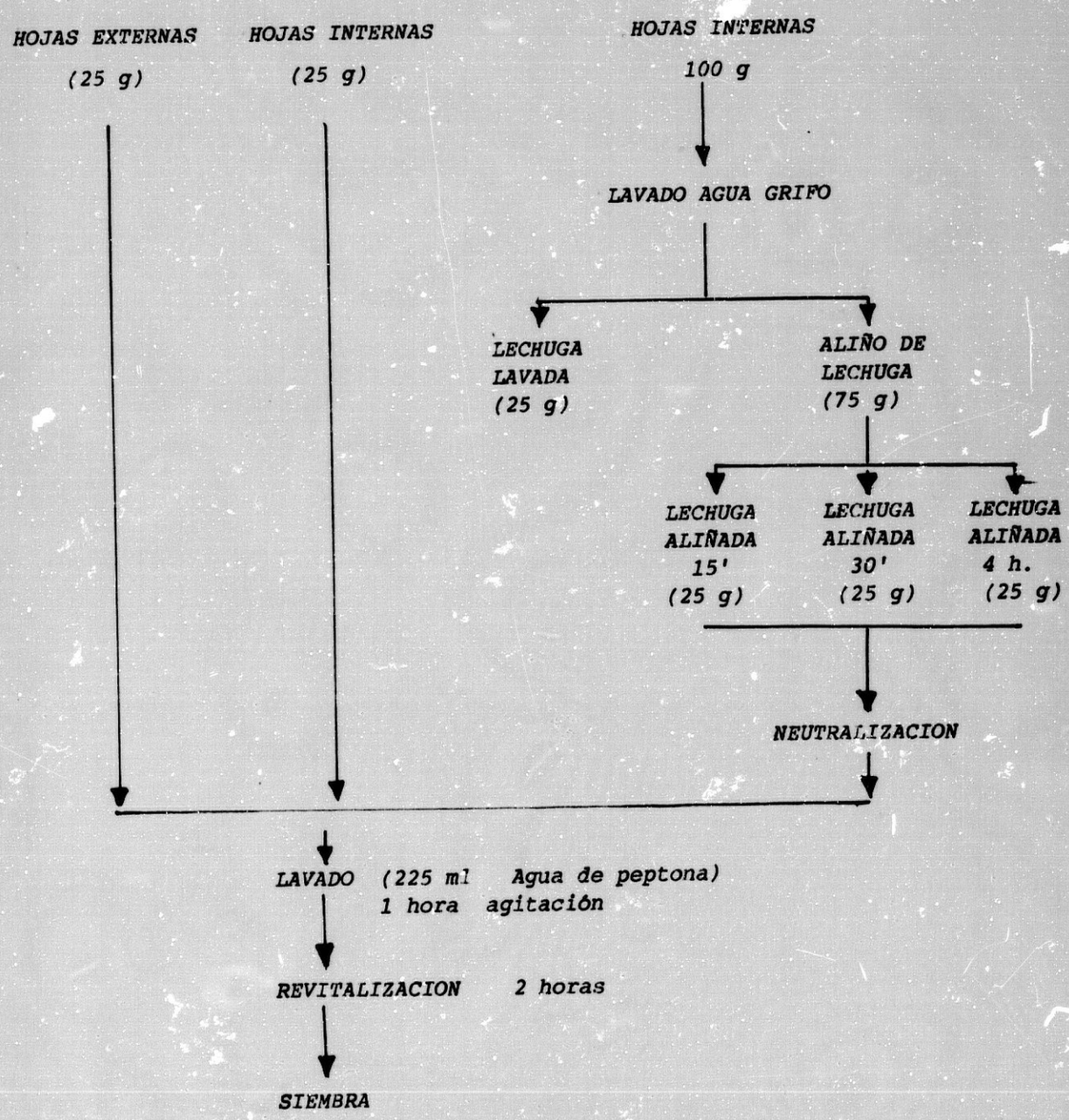


Figura 5 .- ESQUEMA DE TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE TOMATE TRATADAS CON ALIÑO.

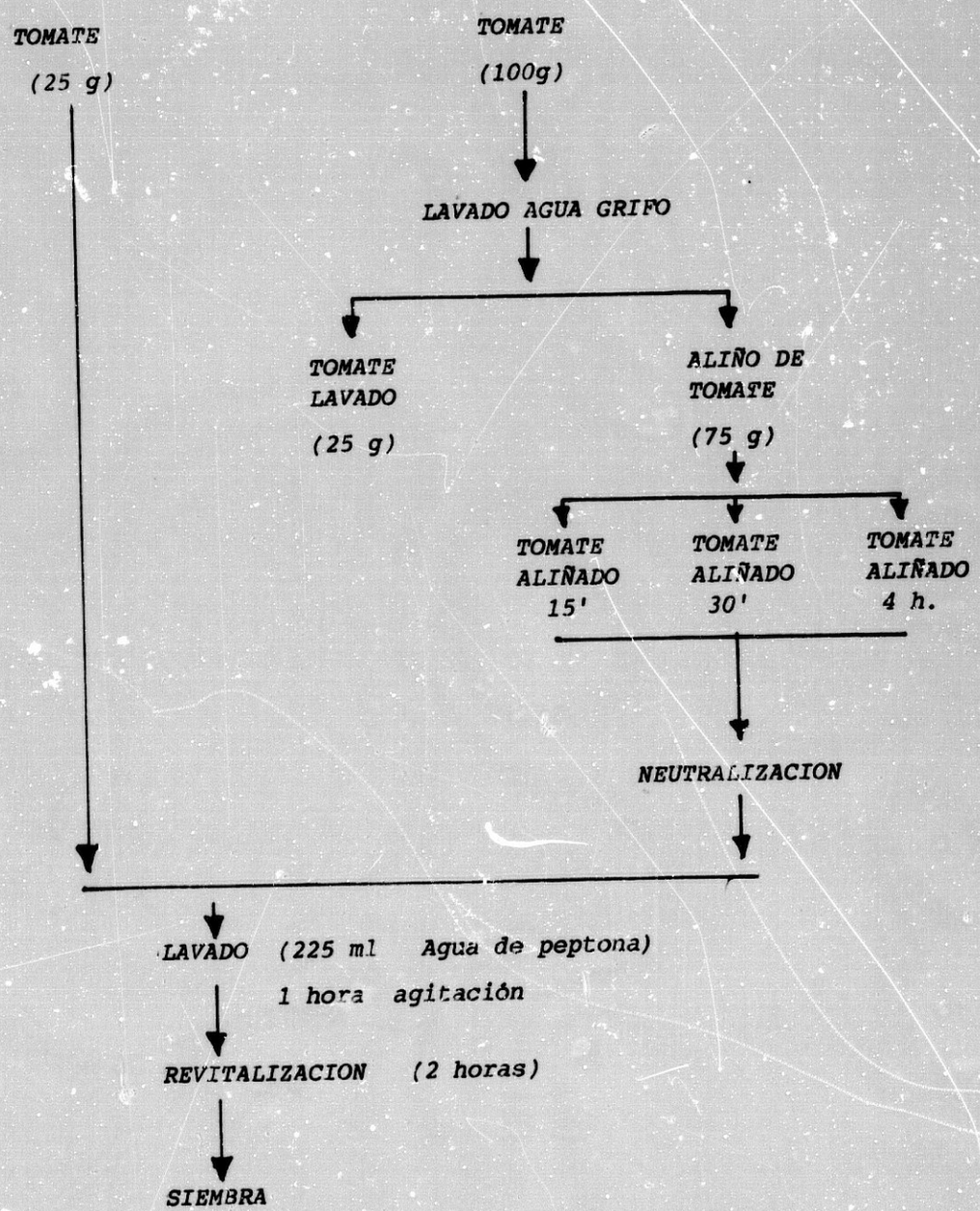


TABLA XXI.- CEPA DE REFERENCIA UTILIZADA EN LA CONTAMINACION ARTIFICIAL DE LAS LECHUGAS CULTIVADAS.

CEPA	ORIGEN	LUGAR DE AISLAMIENTO	MARCADORES FENOTIPICOS *
S. Kapemba	Agua de Riego	Acequia Gorda	AM, C, CB, CF, GB, FO K, N, P, S, Te, ClTe.

* .- Se indican las resistencias a los antibióticos presentes en la cepa.

AM= Ampicilina; C= Cloranfenicol; CB= Carbenicilina CF= Cefalosporina; ClTe= Clortetraciclina; FO= Fosfomicina; GB= Aminosidina; K= Kanamicina; N= Neomicina; P= Penicilina; S= Estreptomicina; Te= Tetraciclina.

c) *Tratamiento.- Con el total de las muestras contaminadas se hicieron cuatro lotes de cuatro lechugas cada uno, tres de ellas contaminadas y una cuarta como control.*

- Lote 1: Al sexto dia de su primera contaminación se recogieron cuatro lechugas, tres contaminadas y una sin contaminar. Ese mismo dia se analizaron microbiológicamente la lechuga control y una de las contaminadas. Las otras dos se introdujeron en cámara frigorífica analizándose una a los cinco dias y la última al décimo dia.

- Lote 2: Se procedió de igual forma que con el lote 1 pero la recogida de muestras se hizo, a los trece dias de la primera contaminación.

-Lote 3: La recogida se realizó al sexto dia de la primera contaminación. Después de mantener a temperatura ambiente, cada muestra fué analizada con un intervalo de dos dias.

- Lote 4: De igual forma que con el lote 1 y 3, la recogida se practicó al sexto dia. De las cuatro lechugas, la de control y otra contaminada se analizaron el primer dia. Las dos restantes permanecieron a temperatura de congelación diez y veinte dias respectivamente hasta el análisis.

Un esquema de cuanto antecede se representa en la figura 6.

d) *Preparación de las muestras para su análisis.- Se realizó de acuerdo con lo descrito en III.2.2. con la salvedad de que en este caso se analizó la lechuga completa cuyos pesos unitarios estaban comprendidos entre 60 y 120 gramos y para el lavado se emplearon 600 ml de agua de peptona.*

FIGURA 6 .- ESQUEMA DE TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE LECHUGA CONTAMINADA.

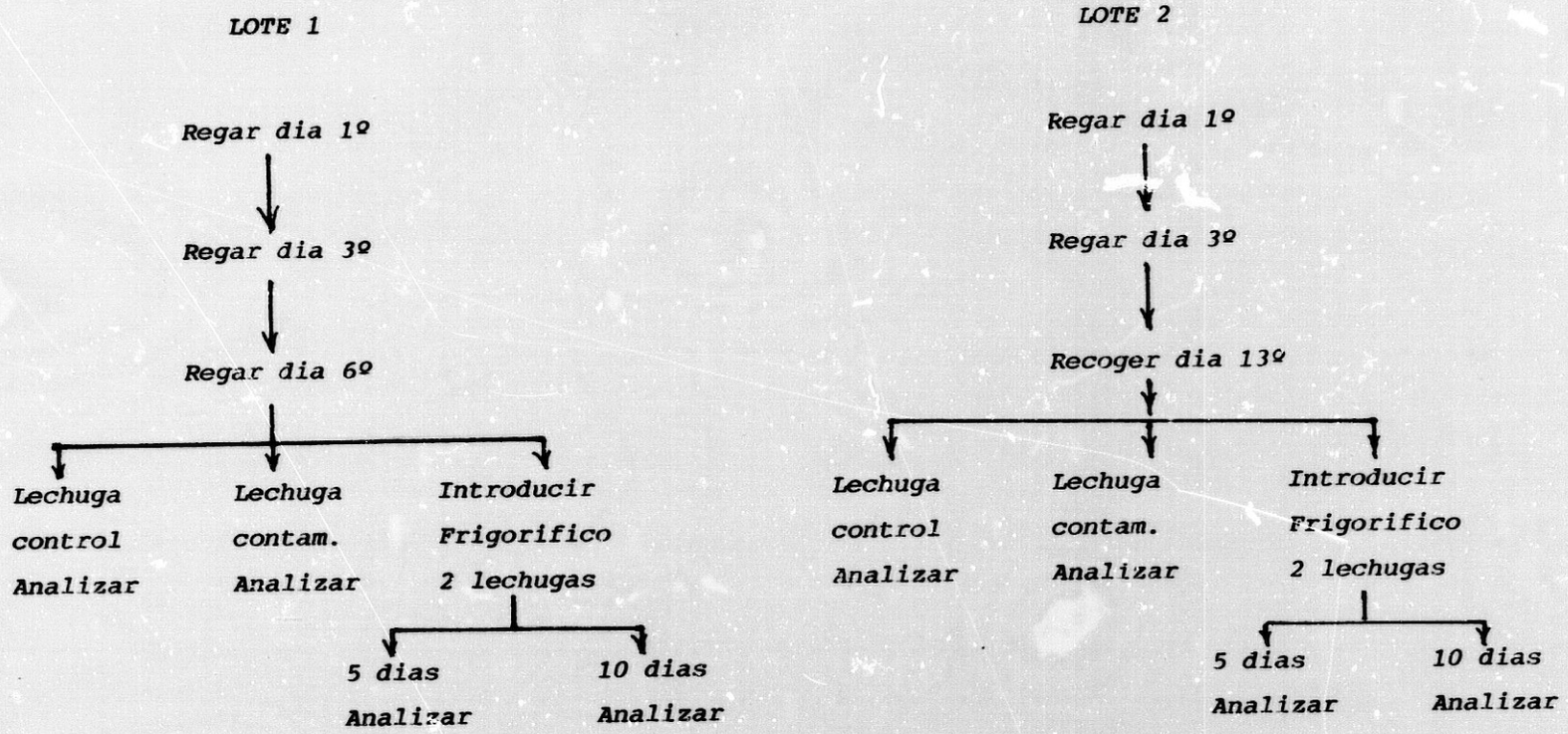
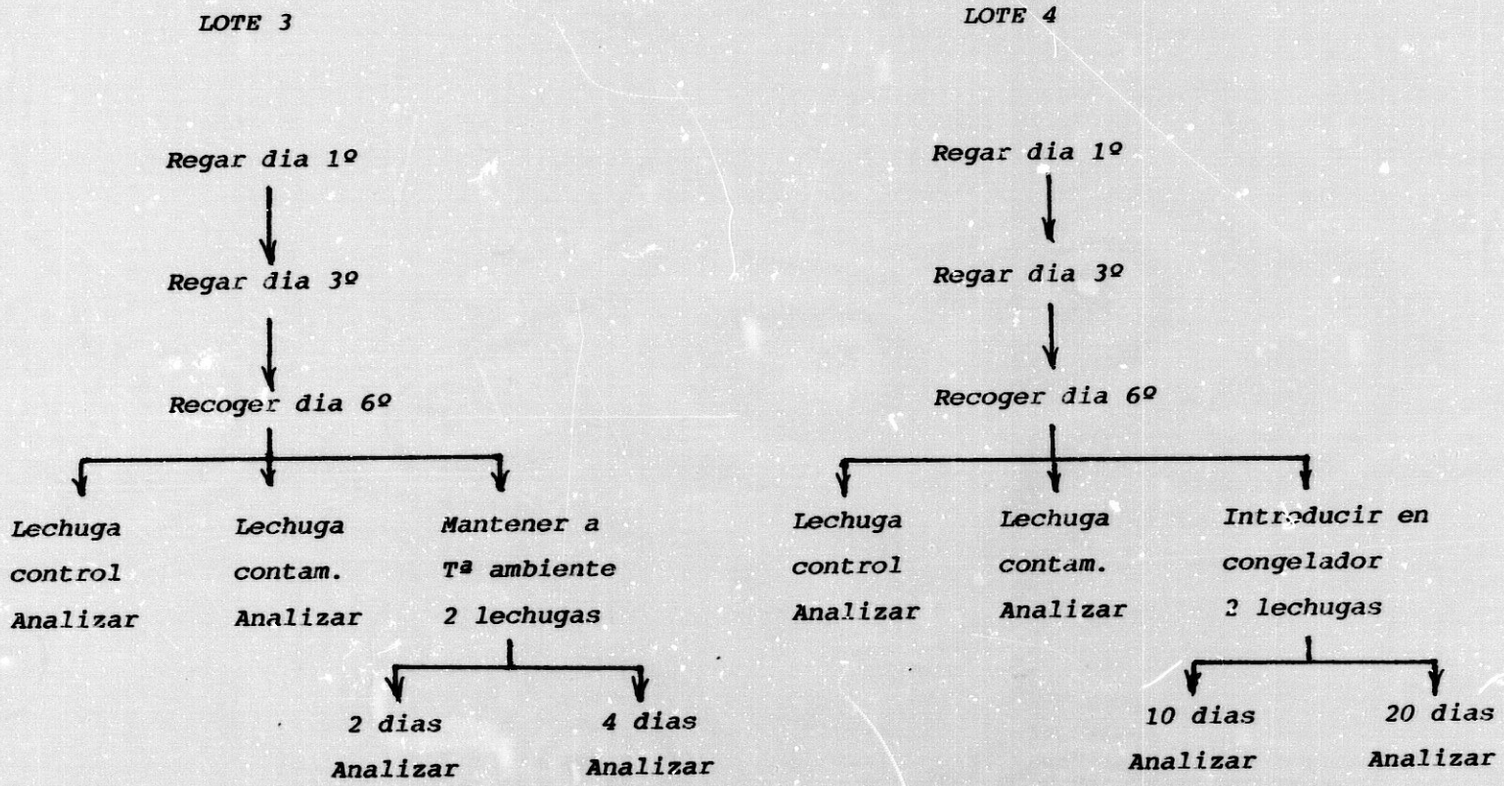


FIGURA 6.- *(Continuación)*



III.3. Siembra de muestras

A continuación se describe el método de siembra de las muestras indicando en cada uno de los apartado las posibles diferencias según se trate de aguas de riego o de verduras y hortalizas.

III.3.1. Recuento total de bacterias aerobias (agua, verduras y hortalizas).

Esta técnica se realizó de forma similar para ambos tipos de muestras. De cada una de las muestras diluidas según se indicó anteriormente (III.2.1. y III.2.2.d.) se sembraron 1 y 0,1 ml en placas de petri de 9 cm de diámetro, se añadieron 15 ml de agar recuento (II.1.5.) mantenido a 45 ºC y con agitación suave y circular para asegurar la distribución homogénea. Una vez solidificado, se incubaron las placas a 37 ºC durante 48 horas hasta la lectura. El recuento se realizó con un contador de colonias en aquellas placas que tuvieran un máximo de 300 colonias.

III.3.2. Recuento de coliformes totales (agua, verduras y hortalizas).

Al igual que en el caso anterior se aplicó la misma técnica para los dos tipos de muestras estudiadas. El método empleado fué el de "tubos múltiples" (RUIZ MERINO, 1974). Se utilizaron una serie de nueve tubos. Tres de ellos contenían 10 ml de caldo lactosado concentrado y los seis restantes 10 ml del mismo medio diluido. En cada uno de los tubos se introdujo una campana de

fermentación o campana de Durhans para observar la producción de gases. A los tres tubos con el medio concentrado se les añadieron 10 ml de la muestra (agua o caldo de lavado) y de los seis restantes, a tres se les añadieron 1 ml de muestra y a los otros tres 0,1 ml. En las muestras de agua se realizaron diluciones como se indica en III.2.1. y en las muestras de verduras solo se hicieron diluciones en aquellas que fueron aliñadas. Los tubos fueron incubados a 37 ºC y la lectura se realizó a las 48 horas. Se consideraron positivos aquellos que fermentaban la lactosa con producción de ácidos y gases. El recuento de coliformes totales se realizó según el índice del número más probable (NMP) propuesto por Swaroop y normalizado recientemente (B.O.E. de 12 de agosto de 1983), Tabla XXII. La figura 7 representa un esquema de lo expuesto.

III.3.3. Recuento de Escherichia coli (aguas, verduras y hortalizas).

El recuento de Escherichia coli se realizó a partir de aquellos tubos que dieron positivos la prueba de coliformes totales (RUIZ MERINO, 1974). Cada uno de los tubos positivos previa agitación se sembraron en placas de agar Teague Levine y se incuban a 37 ºC durante 24 horas. La aparición de colonias planas coloreadas en violeta oscuro con un brillo verde metálico característico, indica la posible presencia de E. coli cuya confirmación se realizó mediante pruebas bioquímicas. Los resultados se expresaron como en el caso anterior (Tabla XXII). El esquema de la técnica se expone en la figura 7.

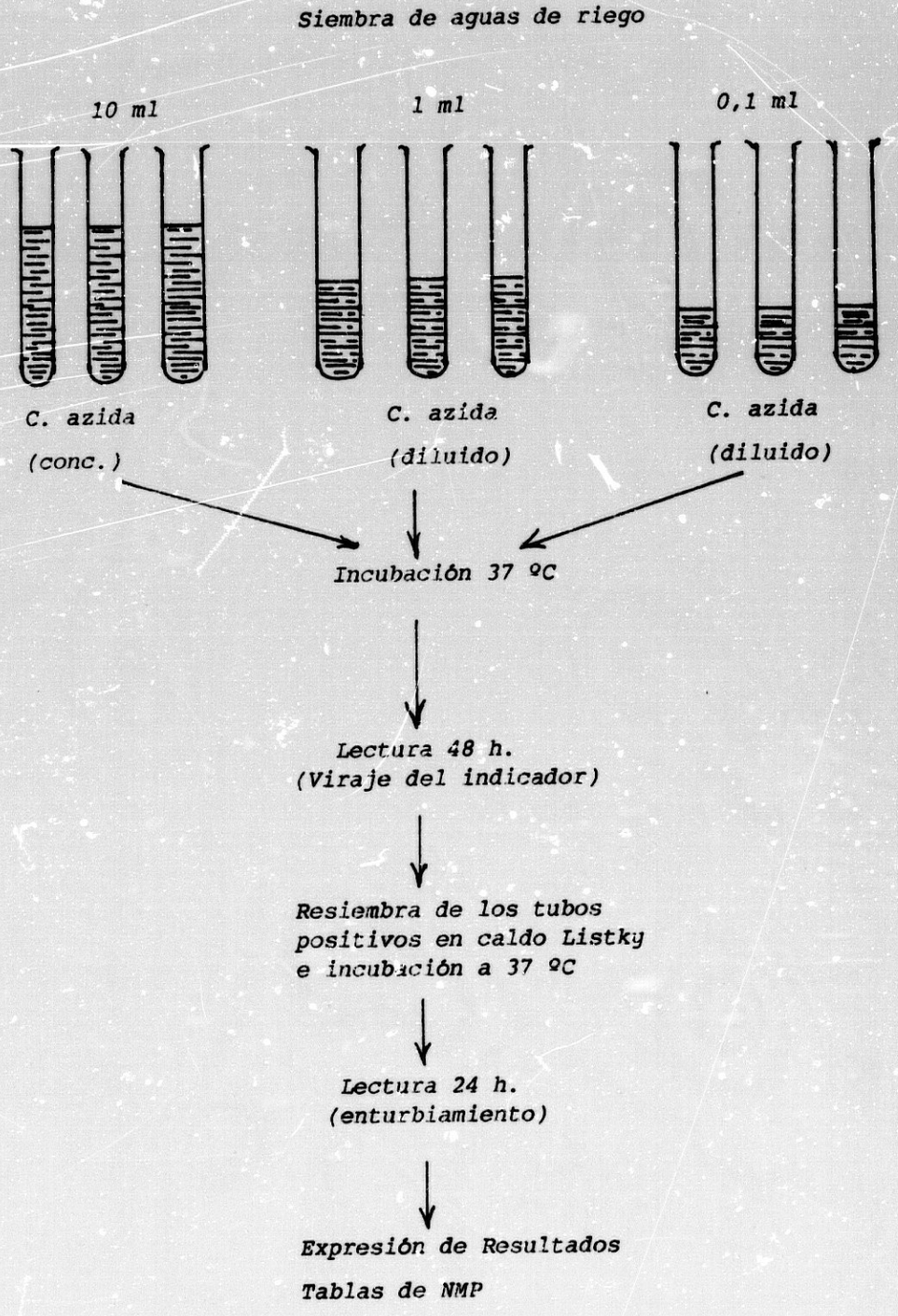
TABLA XXII.- NMP Y LIMITES DE CONFIANZA DEL 95% entre los cuales puede variar las diversas combinaciones de resultados.

Nº de tubos que dan reacción positiva entre			Indice N.M.P.	Límites de confianza con 95%	
3 tubos 10 ml	3 tubos 1 ml	3 tubos 0,1 ml		Límite inferior	Límite superior
0	0	0		0	
0	0	1	3	0,9	9.-
0	0	2	6	1,8	23,7
0	0	3	9	2,8	35,5
0	1	0	3	0,085	13,-
0	1	1	6,1	1,9	24,1
0	1	2	9,2	2,8	36,3
0	1	3	12	3,7	47,4
0	2	0	6,2	1,9	24,5
0	2	1	9,3	2,8	36,7
0	2	2	12	3,7	47,4
0	2	3	16	4,9	63,2
0	3	0	9,4	2,9	37,1
0	3	1	13	4,03	51,4
0	3	2	16	4,96	63,2
0	3	3	19	5,9	75,1
1	0	0	3,6	0,085	20,-
1	0	1	7,2	0,87	21,-
1	0	2	11	3,4	43,5
1	0	3	15	4,7	59,3
1	1	0	7,3	0,88	23,-
1	1	1	11	3.4	43,5
1	1	2	15	4,7	59,3
1	1	3	19	5,9	75,1
1	2	0	11	3,4	43,5
1	2	1	15	2,7	36,-
1	2	2	20	6,2	79,-
1	2	3	24	7,4	94,8
1	3	0	16	4,96	63,2
1	3	1	20	6,2	79,-

TABLA XXII .- (Continuación)

Nº de tubos que dan reacción positiva entre			Indice N.M.P.	Límites de confianza con 95%	
3 tubos 10 ml	3 tubos 1 ml	3 tubos 0,1 ml		Límite inferior	Límite superior
1	3	2	24	7,4	94,8
1	3	3	29	8,29	114,5
2	0	0	9,1	1,0	36,-
2	0	1	14	2,7	37,-
2	0	2	20	6,2	79,-
2	0	3	26	8,1	102,7
2	1	0	15	2,8	44,-
2	1	1	20	6,2	79,-
2	1	2	27	8,4	106,7
2	1	3	34	10,5	134,3
2	2	0	21	3,5	47,-
2	2	1	28	8,7	110,6
2	2	2	35	10,9	138,2
2	2	3	42	13,1	165,9
2	3	0	29	8,99	114,6
2	3	1	36	11,2	142,2
2	3	2	44	13,6	173,8
2	3	3	53	16,4	209,4
3	0	0	23	3,5	120,-
3	0	1	39	6,9	130,-
3	0	2	64	19,8	252,8
3	0	3	95	29,5	375,3
3	1	0	43	7,1	210,-
3	1	1	75	14,-	230,-
3	1	2	120	30,-	380,-
3	1	3	160	49,6	632,-
3	2	0	93	15,-	380,-
3	2	1	150	30,-	440,-
3	2	2	210	35,-	470,-
3	2	3	290	89,9	1145,5
3	3	0	240	36,-	1300,-
3	3	1	460	71,-	2400,-
3	3	2	1100	150,-	4800,-
3	3	3	1483	460	5857,8

FIGURA 7 .- ESQUEMA DE LA TECNICA DE RECUENTO DE ESTREPTOCOCOS FECALES EN AGUAS.



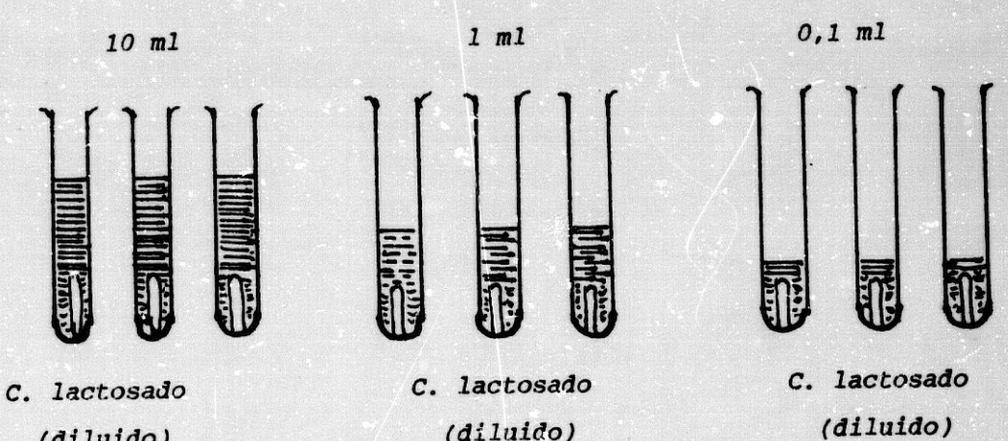
III.3.4. Recuento de Estreptococos fecales (aguas de riego)

La técnica utilizada fue la propuesta por RUIZ MERINO (1974) de tubos múltiples y comprende dos fases: una primera de presunción y otra segunda de confirmación.

a) Prueba presuntiva: Se parte de 9 tubos de caldo azida con 10 ml cada uno, 3 contienen medio concentrado y 6 diluido. Los tubos con caldo concentrado se sembraron con 10 ml de agua y los 6 restantes, 3 con 1 ml y 3 con 0,1 ml. En la siembra se emplearon tantas series de tubos como diluciones de agua se habían realizado. Después de incubar a 37 ºC la lectura se realizó a las 48 horas. Todos aquellos tubos que después de la incubación produjeron virajes del indicador al fermentar la glucosa con producción de ácidos se consideraron sospechosos de poder contener estreptococo fecal. Posteriormente se procedió a la prueba confirmativa.

b) Prueba confirmativa: Esta prueba se funda en la utilización del etil-violeta como selectivo para los estreptococos. El medio utilizado fue el de Litsky repartido en tubos con 10 ml de medio. Los tubos sospechosos en la prueba presuntiva, una vez agitados convenientemente, se sembraron con asa de cultivo en el medio etil-violeta y se incubaron a 37 ºC durante 24 ó 48 horas. La aparición de enturbiamiento microbiano confirmó la presencia del estreptococo fecal. Los resultados se expresaron como ya se dijo (Tabla XXII). El esquema de trabajo se representa en la figura 8.

Figura 8 .- *ESQUEMA DE LA TECNICA DE RECUENTO DE COLIFORMES EN ACUAS, VERDURAS Y HORTALIZAS.*



III.3.5. Recuento de Clostridios sulfito-reductores (aguas)

La presencia de Clostridios sulfito-reductores en un agua indica una contaminación antigua al poseer las esporas una resistencia considerable a los medios naturales. El medio utilizado es el Wilson-Blair, el cual se distribuye en tubos con 20 ml en cada uno. La técnica seguida fue la de RUIZ MERINO (1974). 25 ml de agua tanto sin diluir o diluida al 1/10, 1/100 y 1/1000 se repartieron en tubos y después de calentar en baño maria a 80ºC durante 5 minutos, se enfriaron rápidamente, de modo que las formas vegetativas quedaron destruidas. De cada una de las muestras se sembraron 4 tubos (5 ml de muestra por tubo) en agar Wilson-Blair mantenido a 55 ºC. La muestra se añadió de forma que se evitara en lo posible la mezcla con aire y los tubos, una vez enfriados, se incubaron a 37 ºC durante 24 y 48 horas hasta la lectura. La presencia de Clostridios sulfito-reductores se observó por la aparición de una aureola negra alrededor de la colonia.

III.3.6. Aislamiento de Salmonelas (agua, verduras y supervivencia de Salmonellas)

Una vez realizada la siembra de muestras para el estudio de indicadores microbiológicos, se procedió al aislamiento de salmonelas.

En primer lugar se enriquecieron las muestras en caldo tetrationato-Kauffmann (II.5.) al que se añadió novobiocina con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de Proteus. El volumen de agua sembrado fué de 750 ml en 250 ml de medio. Inicialmen-

te se utilizaron dos tipos de medios, medio tetrationato-Kauffmann, ya indicado, y el caldo Rappaport modificado adicionado de novobiocina, cuya preparación se expresó en II.5. Las ventajas que posee el medio de Rappaport, y por ello se intentó utilizar, es el gran poder inhibidor; sin embargo, la experiencia nuestra demostró que no siempre era mejor que el medio Kauffmann por lo que se decidió dejar de usarlo aunque como ya veremos posteriormente se empleó como medio de enriquecimiento en la experiencia de supervivencia de salmonelas.

Las muestras una vez sembradas se incubaron a 37 ºC y se realizaron aislamientos durante tres dias consecutivos. El medio de aislamiento utilizado fue el agar SS, y el número de colonias estudiadas por placa nunca fue inferior a 5.

Con las muestras de verduras se procedió de igual forma con la diferencia de que la cantidad de agua de lavado era de 150 ml y la del medio de 75 ml. (Figura 9)

III.4. Identificación de microorganismos

III.4.1. Identificación de Escherichia coli

La identificación de las colonias sospechosas de E. coli aparecidas en el medio de Teague Levine se realizó atendiendo a sus caracteristicas bioquímicas (MAC FADDIN 1980; COWAN y col. 1974). Las pruebas de identificación seleccionadas fueron las propuestas por RUIZ MERINO (1974): siembra de las colonias sospechosas del agar Teague Levine en medio Kligler, formación de indol, utilización del citrato y producción de ureasa. Los medios utilizados para la realización de estas pruebas vienen indicados en II.5.

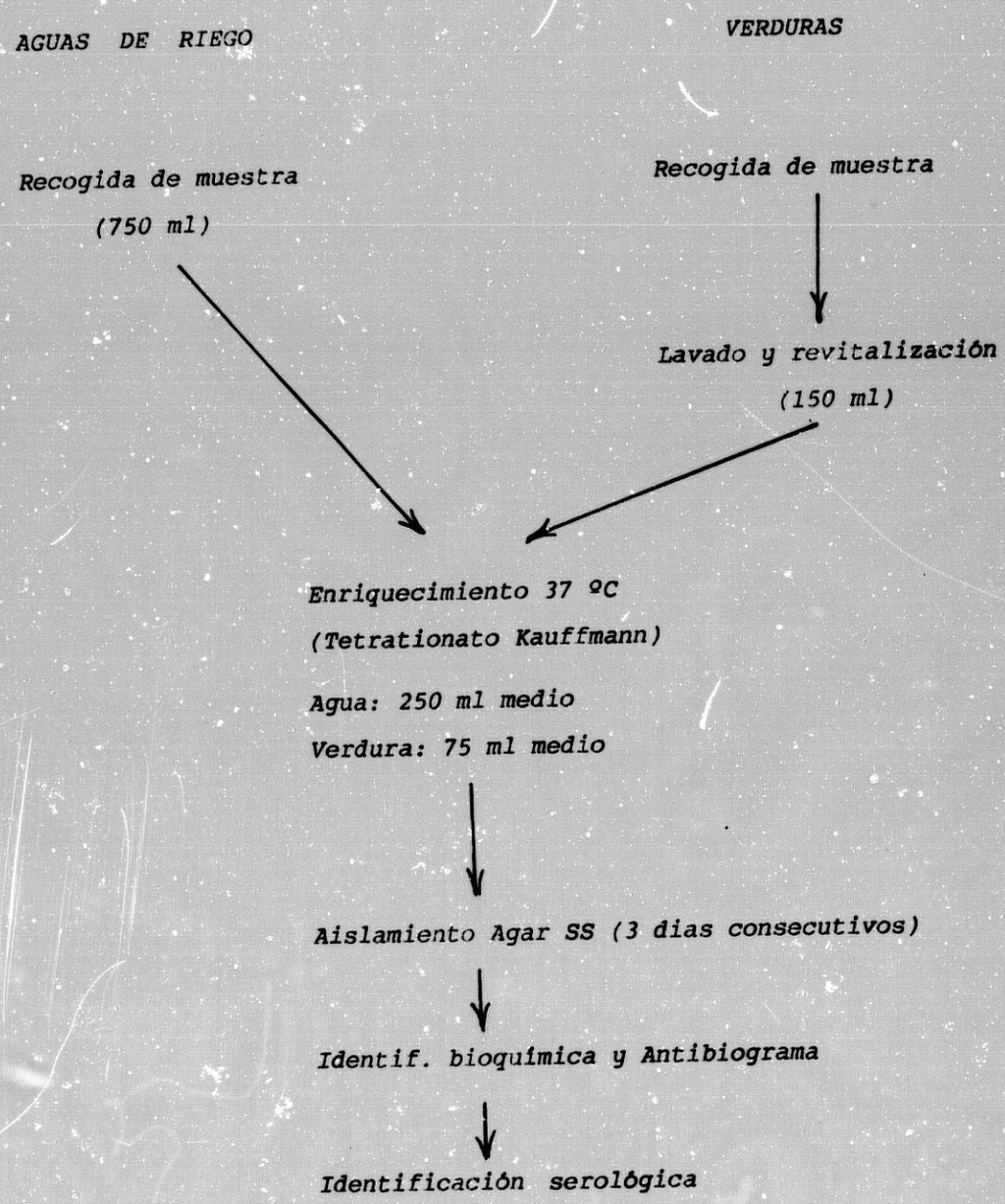


Figura 9: AISLAMIENTO DE SALMONELAS EN AGUAS Y VERDURAS

III.4.2. Identificación bioquímica de Salmonella

Las colonias crecidas en los medios selectivos utilizados no fermentadoras de la lactosa se identificaron tanto bioquímicamente (MAC FADDIN 1980; COWAN y col. 1974) como serológicamente (KAUFFMANN 1975). Las pruebas bioquímicas utilizadas fueron: siembra en Kligler, producción de indol, prueba de la lisina, malonato, urea, producción de beta-galactosidasa y desaminación de la fenilalanina y la prueba del d-tartrato para la diferenciación de S. paratyphi B y S. java. Los medios utilizados se indican en II.5.

III.4.3. Identificación serológica de Salmonella

La identificación definitiva de los serotipos de Salmonella procedentes de aguas de riego, verduras, hortalizas y patógenos humanos se realizó en el Laboratorio de Salmonelas del Centro de Microbiologia, Virologia e Inmunologia Sanitarias de Majadahonda.

La serotipia se hizo mediante una microtécnica propuesta por SHIPP y col. (1980) con algunas modificaciones.

La técnica seguida consta de las siguientes partes:

a) Siembra de las cepas de Salmonella (en total 80) en dos tubos de caldo BHI. Uno para la aglutinación de los antígenos somáticos y otro para los flagelares.
   Se incuban a 37 ºC durante 24 horas.

b) Los tubos en los que se va a investigar los antígenos flagelares se les añade 1 ml de solución PBS con formol al 1% y se agitan. En los tubos en que se va a estudiar los antígenos somáticos se introducen en baño hasta ebullición durante 30 minutos y a continuación se les añade 1 ml de solución PBS y se agita.

c) Posteriormente se realiza el llenado de 1 placa con 3 ml de suero flagelar por columna. Esta placa contiene 12 columnas. En las 11 primeras columnas depositamos los siguientes sueros:

Columna 1: pool de sueros HA que incluyen los sueros b, i, a, d, z_{10}, z_{29}.

Columna 2: pool de sueros HC compuesto por los sueros 1v, 1w, r, k, v, w, y.

Columna 3: pool denominado 1-7 que incluye el 1,2 - 1,5 - 1,6 1,7.

Columna 4: sueros eh, enx, enz_{15}.

Columna 5: m, s, t, p.

Columna 6: 1v, 1w.

Columna 7: suero b

Columna 8: suero i

Columna 9: suero r

Columna 10: suero k

Columna 11: suero 2

Por último en la columna 12 denominada columna control añadimos 3 ml de solución PBS.

Para el llenado de la placa con sueros somáticos se procede de igual forma que en el caso anterior. Las distintas columnas incluyen los siguientes sueros:

Columna 1: posee el pool OA que incluye los sueros somáticos 1, 4, 5, 12.

Columna 2: pool OB, posee los sueros 6,7 y 6,8

Columna 3: sueros 1, 4, 5, 12

Columna 4: sueros 6,7

Columna 5: sueros 6,8

Columna 6: 1, 9, 12.

Columna 7: suero 4

Columna 8: suero 5
Columna 9: suero 7
Columna 10: suero 8
Columna 11: suero 9
Columna 12: control.

De la misma forma en que se ha realizado el reparto de los sueros, las diferentes cepas de Salmonella se repartirán en placas y por columnas.

d) Llenado de las placas de microtiter. Este proceso se realizó tanto para los antígenos como para los sueros con un repartidor multicanal automático (96-channel Automatic Pipetter de Dynatech Laboratories Ltd.).
Una vez llenadas las placas se agitan muy suavemente con el fin de mezclar bien los sueros con los antígenos.

e) Las placas se incuban en baño maria a 50 ºC. Los flagelares durante 1 hora y 30 minutos y los somáticos 2 horas.

f) Se realiza la lectura de los flagelares y los somáticos se guardan en frigorífico durante 24 horas hasta su lectura.

En aquellos casos en que fue necesario el cambio de fase se procedió de la siguiente forma:

1) Se funden los tubos que contienen el medio de Caigie y se mantienen a 50 ºC.

2) A continuación se les añade solución PBS con tioglicolato y el suero correspondiente y se dejan solidificar.

3) Se siembra la cepa en el interior de un pequeño tubo hueco que lleva incorporado el medio y se incuban a 37 ºC.
4) Cada dia se observan los tubos y cuando el microorganismo haya crecido hasta la superficie exterior se siembra en caldo BHI y se procede de igual forma a la técnica descrita para la aglutinación de los antigenos flagelares.

III.5. Estudio de la sensibilidad de las Salmonelas aisladas a antibióticos y quimiterápicos.

La determinación de la sensibilidad a los antibióticos y quimiterápicos de las cepas de Salmonella aislada, se realizó según el método de difusión disco placa descrito por CUETO y cols. (1979). La valoración de los halos de inhibición se hizo según las indicaciones de la casa comercial de cada uno de los antibióticos.

III.6. METODO ESTADISTICO

El método estadístico seguido para correlacionar y comprobar el grado de significación de los diferentes indicadores microbiológicos utilizados en el estudio de las aguas de riego, verduras y hortalizas y verduras aliñadas fué el siguiente:

III.6.1. Análisis de la varianza de dos vías (método mixto)

Este análisis se realizó en los parámetros estudiados en las muestras de verduras y hortalizas procedentes de huertas de la vega de Granada, mercado central, supermercados y establecimientos pequeños, las cuales se dividieron en cuatro grupos (A, B, C y D) por su localización en la tierra de cultivo y por su morfología, y según la época del año en que fueron recogidas se dividieron en cuatro períodos que corresponden a las cuatro estaciones del año. En este análisis a los grupos estudiados se les da la designación de filas y a las estaciones de muestreo la de columnas.

De igual modo que en el caso anterior, con el fin de comprobar los efectos del lavado y aliñado sobre la lechuga y el tomate, se realizó una experiencia como se indica en el apartado III.2.3. en el que las filas corresponden a las muestras estudiadas y las columnas a los diferentes tratamientos a que se sometieron.

Sean r los grupos de verduras (filas) y t las estaciones (columnas), x_{ij} (i=1,----,r; j=1,----,t) será el resultado obtenido en la estación número j del grupo número i, en el caso de las verduras recogidas de los lugares anteriormente indicados.

Con respecto a la experiencia de aliñado r se corresponde con las muestras bien de tomate o lechuga (filas) y t con los tratamientos realizados (columnas) y x_{ij} $(i=1,----,r;\ j=1,----,t)$ *el resultado obtenido en el tratamiento número j de la muestra número i. Bajo la hipótesis de los modelos citados (variables normales y homogeneidad de varianzas) el análisis global de los datos suele presentarse de la siguiente forma:*

Tabla de análisis de la varianza

Fuente	gl	S.C.	m.c.	F_{exp}
Entre filas	r-1	$S.C.F.=\Sigma_i x_{i.}^2/t - R$	$S_F^2=S.C.F./r-1$	S_F^2/S_E^2
Entre columnas	t-1	$S.C.C.=\Sigma_j x_{.j}^2/r - R$	$S_C^2=S.C.F./t-1$	S_C^2/S_E^2
Error	(r-1)(t-1)	$S.C.E.=S.C.T.-S.C.F.-S.C.C.$	$S_E^2=\frac{S.C.E.}{(r-1)(t-1)}$	—
Total	rt - 1	$S.C.T.=\Sigma x_{ij}^2-R$	$R=(\Sigma_{ij} x_{ij}/r.t)$	—

en dónde x_i *y* x_j *son la suma de observaciones de la fila Nº i y de la columna Nº j respectivamente. Las dos* F_{exp} *obtenidas, comparadas de modo usual con la correspondiente* F_α *de Snedecor, indican si hay diferencias entre las medias de filas y las de columnas respectivamente, esta última válida solo si no hay interacciones.*

III.6.2. Comparaciones múltiples entre medias de filas tras un análisis de la varianza de dos vias (modelo mixto)

Realizado el análisis señalado en el apartado anterior puede plantearse la búsqueda de qué medias de filas son iguales y cuales son distintas. Notemos por $\bar{x}_i$ a la media de cada fila ($\bar{x}_i = \Sigma x_{ij}/t$).

A. Cuando se trate de realizar todas las comparaciones posibles entre dos parejas de medias $\bar{x}_1, \bar{x}_2, \text{----}, \bar{x}_r$, el procedimiento adecuado es el Newman-Keuls consistente, en:

a) Ordenar las r medias de menor a mayor.

b) Comparar la más grande las K=r medias con la más pequeña. Tomar los dos grupos de K=r-1 medias consecutivas y comparar las dos medias extremas de cada uno de ellos. Dentro de cada uno de los dos grupos anteriores hay otros dos grupos de K=r-2 medias; comparar sus extremos, etc. ...

c) Cuando dos medias no son significativas, todo su grupo es declarado igual, no interviniendo en los pasos posteriores y si en caso contrario.

d) Para efectuar las comparaciones señaladas en b), se compara

$$t_{exp} = \frac{|\bar{x}_i - \bar{x}_j|}{\sqrt{\frac{2\,S_E^2}{t}}}$$

con una t_α (f=(r-1)(t-1) ; K) de Tukey. Si $t_{exp} > t_\alpha$ las medias son distintas.

III.6.3. Análisis de la varianza de tres vias.

Para los indicadores microbiológicos estudiados en las muestras de aguas de riego en las que se pretende comprobar las posibles diferencias entre los dos cauces (Rio Genil y Acequia Gorda), entre los diferentes puntos de toma de muestra (A, B, C y D) y entre los meses que duró el estudio se realiza un análisis de la varianza de tres vias de efectos fijos (SNEDECOR Y COCHRAN, 1972).

III.6.4. Comparación de dos medias de muestras independientes.

Con el fin de comprobar las diferencias entre los valores medios de los indicadores de contaminación de las aguas de riego y de verduras de las muestras en que se aislaron salmonelas de las que el aislamiento fué negativo se realiza un test de Student como se indica a continuación:

Dadas dos muestras x_{1i} y x_{2j} ($i=1,----,n_1$; $j=1,----,n_2$) de dos variables normales de medias μ_1 y μ_2 desconocidas, para constrastar si son iguales o no, se calcula en primer lugar las medias ($\bar{x}_1$ y $\bar{x}_2$) y varianzas (S_1^2 y S_2^2) de ambas muestras y la cantidad $F_{exp} = S_1^2 / S_2^2$, con $S_1^2 > S_2^2$, cantidad que es comparada con una $F_{10\%}\ (n_1-2\ ;n_2-2)$ de la distribución de Snedecor.

Si $F_{exp} < F_{10\%}$, calcular:

$$S^2 = \frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$t_{exp} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{S^2 \frac{n_1+n_2}{n_1 n_2}}}$$

y compararla con una t_α $(n_1 + n_2 - 2)$ *de la distribución de Student.*

Si $F_{exp} > F_{10\%}$, *calcular:*

$$t_{exp} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

y compararla con una t_α (f) *de la distribución de Student, en dónde:*

$$f = \frac{\left[\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right]^2}{\frac{(S_1^2/n_1)^2}{n_1 - 1} + \frac{(S_2^2/n_2)^2}{n_2 - 1}}$$

En cualquiera de los casos, si $t_{exp} > t_\alpha$ *se acepta que las dos medias son distintas para un error* α. *Aquí, al igual que en lo que sigue el error P es el mínimo error* α *al cual se puede rechazar la hipótesis nula (en nuestro caso,* $H_0 \equiv \mu_1 = \mu_2$, *es decir que las dos medias son iguales).*

III.6.5. Test χ^2 para comparación de muestras cualitativas.

Este test se aplica en las especies de verduras en que se aislaron salmonelas y en las muestras de verduras según sus procedencias.

Se basa en la comparación de las frecuencias observadas y esperadas, obtenidas estas últimas mediante la expresión $E_{ij} = \frac{F_i C_j}{T}$, dónde F_i es el total de fila, C_j el total de columna y T el total general.

La cantidad experimental:

$$\chi^2_{exp} = \sum\sum \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} = \sum\sum \frac{O_{ij}^2}{E_{ij}} - T$$

frente a la cantidad teórica correspondiente con (r-1)(s-1) grados de libertad, dónde r es el número de filas (muestras) y d el número de columnas (clases).

Para el caso particular 2 x 2 (2 muestras y 2 clases), la expresión a considerar es:

$$\chi^2_{exp} = (|O-E|-0,5)^2 \sum_{i,j} \frac{1}{E_{ij}}$$, con 1 g.l.

III.6.6. Regresión y correlación.

Esta correlación se realiza entre los distintos indicadores de aguas y de verduras aliñadas.

La correlación y recta de regresión lineales se calculan mediante las expresiones:

$$b = \frac{\Sigma x_i y_i - \frac{(\Sigma x_i)(\Sigma y_i)}{n}}{\Sigma x_i^2 - \frac{(\Sigma x_i)^2}{n}}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$r = \frac{\Sigma x_i y_i - \frac{(\Sigma x_i)(\Sigma y_i)}{n}}{\sqrt{\left(\Sigma x_i^2 - \frac{(\Sigma x_i^2)^2}{n}\right)\left(\Sigma y_i^2 - \frac{(\Sigma y_i)^2}{n}\right)}}$$

y el contraste de significación para este último coeficiente (de correlación) se realiza mediante:

$$t_{exp} = \sqrt{\frac{(n-2)\, r^2}{1 - r^2}}$$

frente a una t de Student con (n-2) grados de libertad.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV. 1. AGUAS DE RIEGO

IV.1.1. Recuento total de bacterias aerobias

En la Tabla XXIII se recogen los valores obtenidos en el recuento de bacterias aerobias por ml, durante el periodo comprendido entre Marzo 1981 a Febrero 1983 especificando el lugar de recogida de muestra según su emplazamiento. El lugar concreto de recogida de agua para cada uno de los cauces, Rio Genil (Darro) y Acequia Gorda, se indica con letras mayúsculas que van de la A a la D y las tomas realizadas cada mes se expresan con los números 1 y 2, los cuales indican, el 1 la primera recogida del mes y 2 la segunda. Cuando en la tabla no se indican valores en su lugar correspondiente es debido a factores ajenos motivados por la falta de caudal en dicho periodo.

Con objeto de hacer más fácil la visualización de las variaciones ocurridas durante la época estudiada en la figura 10 se representan los valores medios de bacterias aerobias/ml de las cuatro tomas de aguas realizadas cada mes en cada uno de los cauces.

Los resultados obtenidos en los análisis realizados fueron sometidos a un estudio estadístico con el fin de comparar los diversos factores que pueden afectar a los valores de recuento encontrados. En primer lugar se realizó un análisis de varianza para observar las diferencias entre el número de bacterias aerobias en el Rio Genil (Darro) y la Acequia Gorda. Un segundo análisis se realizó con el fin de correlacionar los valores obtenidos en los diferentes puntos de los dos cauces en que se realizó la recogida de muestras y por último, se intenta conocer la correlación existente durante

los meses que duró el estudio. Tras este tratamiento sólo se produjeron diferencias significativas estadísticamente en cuanto a la comparación de resultados en los diferentes meses de recogida de muestras, concretamente los meses de Junio y Julio de 1981 respecto a Marzo, Abril, Mayo, Agosto, Octubre, Noviembre y Diciembre de 1981 y Abril, Mayo, Junio, Julio, Agosto de 1982 y Febrero de 1983 ($p < 0,05$). Por otro lado, los diferentes puntos de toma de muestra tuvieron una cierta tendencia a la significación ($p < 0,1$) mientras que no se observaron ningunas diferencias en cuanto al número de bacterias aerobias en los dos cauces estudiados.

IV.1.2. Recuento de coliformes totales

Los resultados obtenidos en el NMP de coliformes totales por 100 ml de agua a lo largo de nuestro estudio especificando el lugar y época de recogida queda expresado en la Tabla XXIV. El esquema de ordenación de los datos es el mismo que se sigue en el apartado anterior.

De forma similar al caso anterior la Figura 11 recoge los valores medios para cada mes y para cada rio de bacterias coliformes.

En cuanto al estudio estadistico en el cual se hace igualmente referencia a las posibles correlaciones existentes entre los dos rios, las localizaciones de la toma de muestra y el periodo de recogida, tan solo se observan diferencias significativas entre el mes de Julio de 1981 y el resto de los meses estudiados, con un valor de $p < 0,001$, mientras que entre los rios y las localizaciones no aparece ninguna diferencia.

IV.1.3. Recuento de Escherichia coli

El número de bacterias correspondientes a la especie *E. coli* por cada 100 ml de agua de cada una de las muestras recogidas según su procedencia, localización y mes se indica en la Tabla XXV. Estos datos quedan representados gráficamente hallando como en los casos anteriores los valores medios de cada mes en la Figura 12. Las características de esta Tabla y Figura asi como el estudio estadístico realizado son similares a los indicados en los dos parámetros anteriores. Es de destacar no obstante, en este caso que en el análisis de varianza realizado para las diferentes comparaciones no aparecen en ninguno de los casos diferencias significativas.

IV.1.4. Recuento de estreptococos fecales.

El NMP de estreptococos obtenido en las diferentes muestras estudiadas se recoge en la Tabla XXVI, y de forma semejante a los anteriores casos la Figura 13 trata de sintetizar los resultados obtenidos en el Rio Genil (Darro) y Acequia Gorda en los meses que comprenden nuestro estudio.

Los resultados estadísticos coinciden con los obtenidos para *E. coli* es decir no parece existir diferencias entre los rios, localizaciones y meses del estudio.

IV.1.5. Recuento de clostridios sulfito-reductores.

El número de clostridios sulfito-reductores por 100 ml de agua procedentes del Rio Genil (Darro) y Acequia Gorda utilizados para riego se recogen en la Tabla XXVII y de forma más reducida en la Figura 14.

El estudio estadistico como ocurrió en el caso de E. coli y estreptococos fecales no presentó ningunas diferencias significativas.

TABLA XXIII .- Bacterias aerobias / ml en aguas de riego. Marzo - Octubre 1981

LOCALIZACION	MUESTRAS		MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMB.	OCTUBRE
RIO GENIL (DARRO)	A	1	$1,0 \times 10^6$	$8,8 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$1,28 \times 10^9$	$4,0 \times 10^8$	$2,3 \times 10^5$	$3,9 \times 10^6$	$1,9 \times 10^5$
		2	$1,2 \times 10^3$	$4,1 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$8,1 \times 10^6$	-	$1,4 \times 10^5$
	B	1	$6,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^7$	$3,04 \times 10^8$	$3,0 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$
		2	$6,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^5$	$9,0 \times 10^5$	$8,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$4,8 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$2,6 \times 10^5$
ACEQUIA GORDA	C	1	$1,6 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,71 \times 10^7$	$3,68 \times 10^8$	$2,0 \times 10^5$	$6,3 \times 10^5$	$8,5 \times 10^5$
		2	$4,96 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4$	$4,8 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,28 \times 10^7$	$3,9 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$
	D	1	$3,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^6$	$3,2 \times 10^8$	$3,0 \times 10^5$	$2,9 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$
		2	$4,32 \times 10^3$	$2,0 \times 10^5$	$1,9 \times 10^6$	$1,6 \times 10^8$	$5,7 \times 10^7$	$4,48 \times 10^6$	$8,3 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$

TABLA XXIII (Continuación) - Noviembre 1981 - Junio 1982.

LOCALIZACION	MUESTRAS	NOVIEMB.	DICIEMB.	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO
RIO GENIL (DARRO)	A 1	$1,63 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	-	$1,9 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$
	A 2	$3,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^7$	$4,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$2,4 \times 10^7$	$1,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$2,9 \times 10^6$
	B 1	$1,16 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$	$1,92 \times 10^7$	$2,8 \times 10^6$
	B 2	$1,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$3,4 \times 10^4$	$6,0 \times 10^5$	$1,32 \times 10^8$	$1,9 \times 10^6$	$5,1 \times 10^5$	$1,09 \times 10^8$
ACEQUIA GORDA	C 1	$1,25 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^4$	$1,47 \times 10^8$	$2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$
	C 2	$1,5 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$5,1 \times 10^5$	$5,79 \times 10^8$	$7,0 \times 10^4$	$6,5 \times 10^5$	$6,0 \times 10^6$
	D 1	$7,6 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^5$
	D 2	$5,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$1,54 \times 10^5$	$6,2 \times 10^5$	$2,27 \times 10^8$	$5,0 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$8,3 \times 10^6$

TABLA XXIII (Continuación) - Julio de 1982 - Febrero de 1983.

LOCALIZACION	MUESTRAS		JULIO	AGOSTO	SEPTIEMB.	OCTUBRE	NOVIEMB.	DICIEMB.	ENERO	FEBRERO
RIO GENIL (DARRO)	A	1	$2,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$	-	-	$1,78 \times 10^7$	-	-	$8,8 \times 10^5$
		2	$5,2 \times 10^6$	$1,12 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$	-	-	-	$1,0 \times 10^7$	$4,1 \times 10^5$
	B	1	$5,0 \times 10^4$	$7,7 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$9,2 \times 10^6$	$6,0 \times 10^4$
		2	$6,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^5$	-	-	$4,0 \times 10^5$	$5,44 \times 10^7$
ACEQUIA GORDA	C	1	$1,0 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
		2	$9,0 \times 10^4$	$2,8 \times 10^5$	$1,04 \times 10^6$	$8,0 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$8,4 \times 10^5$
	D	1	$4,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$9,0 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$
		2	$3,3 \times 10^6$	$8,0 \times 10^4$	$8,9 \times 10^5$	$3,2 \times 10^6$	$9,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^6$	$9,0 \times 10^4$	$3,65 \times 10^7$

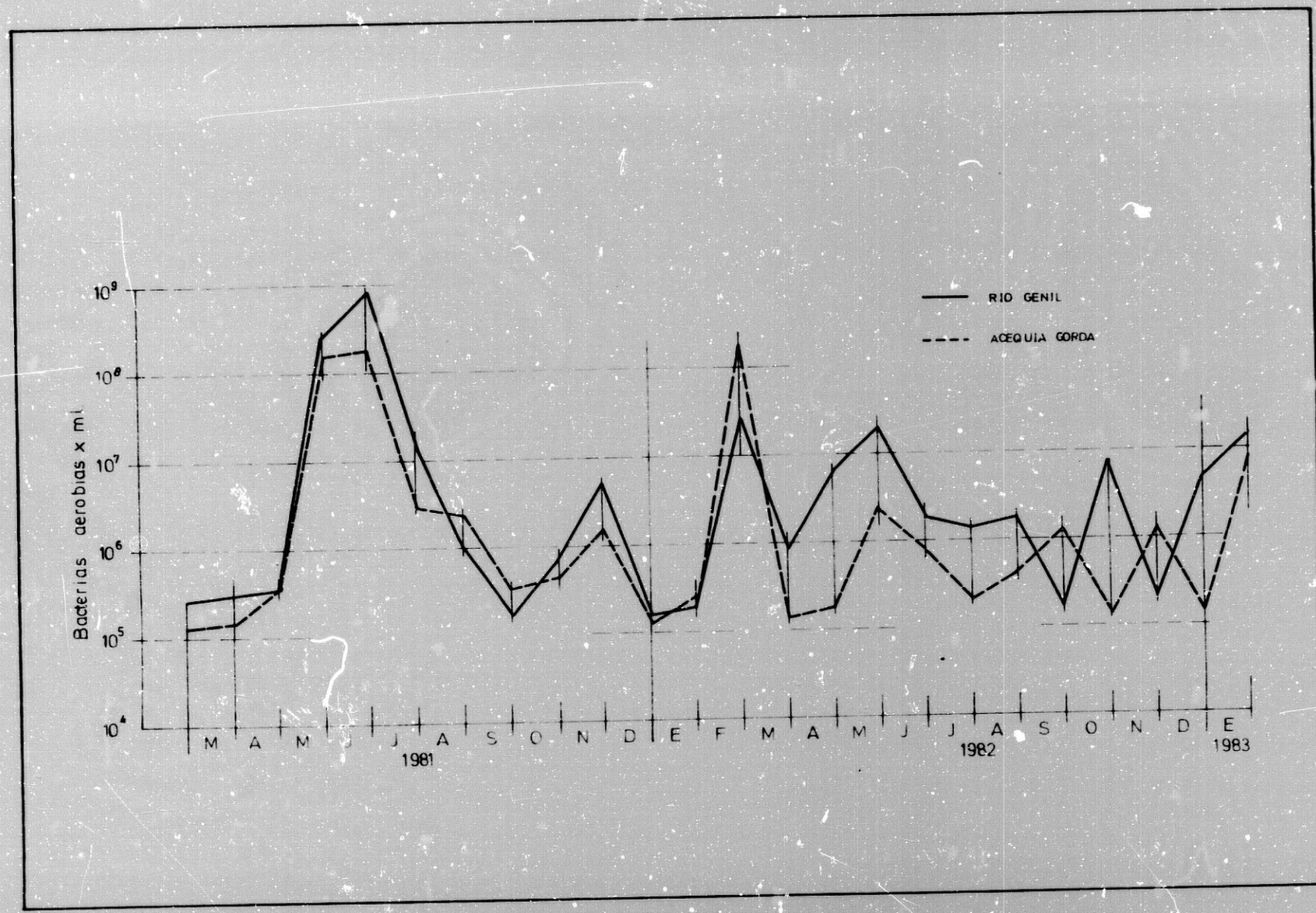


FIGURA 10 .- *VALORES MEDIOS DE BACTERIAS AEROBIAS/ml DE CADA MES DURANTE EL PERIODO DE MUESTREO.*

TABLA XXIV.- NMP de coliformes / 100 ml de aguas de riego. Marzo - Octubre de 1981

LOCALIZACION	MUESTRAS	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMB.	OCTUBRE
RIO GENIL (DARRO)	A 1	$2,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$4,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$
	A 2	$4,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$7,5 \times 10^5$	$2,3 \times 10^7$	$7,3 \times 10^6$	-	$1,5 \times 10^5$
	B 1	$4,6 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7$	$7,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$
	B 2	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$2,1 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	$1,48 \times 10^8$	$9,3 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$
ACEQUIA GORDA	C 1	$9,1 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$1,48 \times 10^8$	$2,4 \times 10^7$
	C 2	$4,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$1,48 \times 10^8$	$2,3 \times 10^7$	$9,3 \times 10^7$	$4,3 \times 10^5$
	D 1	$1,5 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	$4,6 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$
	D 2	$1,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$9,3 \times 10^5$	$1,48 \times 10^8$	$3,6 \times 10^6$	$4,3 \times 10^7$	$3,6 \times 10^5$

TABLA XXIV.- (Continuación) Noviembre 1981 - Junio 1982

LOCALIZACION	MUESTRAS		NOVIEMB.	DICIEMB.	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO
RIO GENIL (DARRO)	A	1	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$4,6 \times 10^6$	-	$4,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$
		2	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$1,48 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$	$1,48 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
	B	1	$4,6 \times 10^6$	$1,48 \times 10^7$	$4,6 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^7$	$7,5 \times 10^6$
		2	$1,5 \times 10^6$	$4,63 \times 10^6$	$7,5 \times 10^4$	$1,48 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$
ACEQUIA GORDA	C	1	$4,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$
		2	$4,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^5$	$1,48 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^6$
	D	1	$1,1 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$2,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^5$	$3,6 \times 10^4$	$2,3 \times 10^6$
		2	$1,1 \times 10^7$	$4,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$1,4 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^7$

TABLA XXIV.- (Continuación). Julio 1982 - Febrero 1983

LOCALIZACION MUESTRAS		JULIO	AGOSTO	SEPTIEMB.	OCTUBRE	NOVIEMB.	DICIEMB.	ENERO	FEBRERO
RIO GENIL (DARRO)	A 1	$9,1 \times 10^4$	$4,6 \times 10^6$	-	-	$1,1 \times 10^7$	-	-	$1,1 \times 10^7$
	A 2	$9,3 \times 10^{}$	$4,6 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	-	-	-	$4,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
	B 1	$2,4 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$
	B 2	$9,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	-	-	$2,4 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$
ACEQUIA GORDA	C 1	$4,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	2.4×10^6
	C 2	$2,1 \times 10^7$	$4,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$
	D 1	$4,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$	$2,4 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$
	D 2	$9,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$

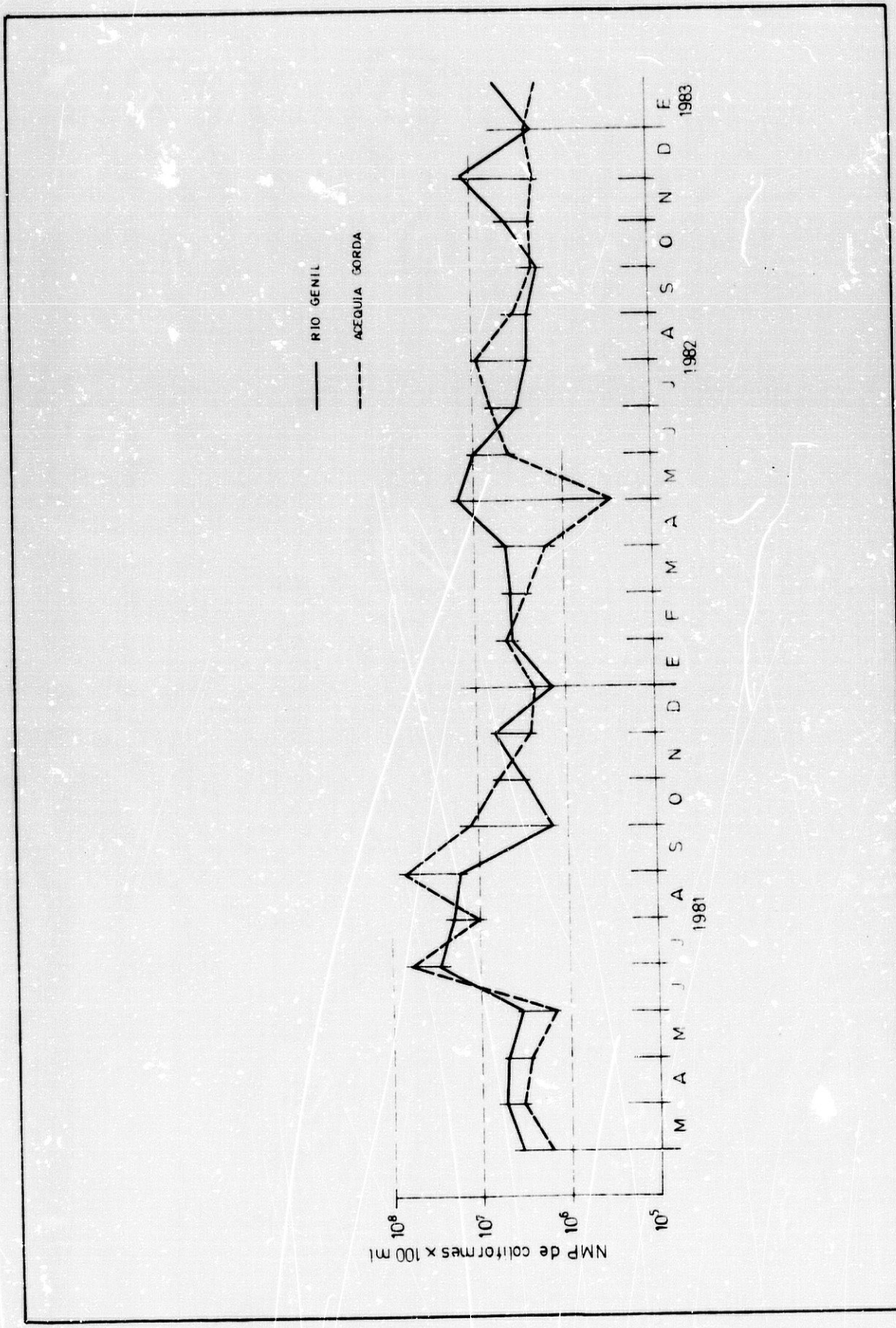


FIGURA 11 .- VALORES MEDIOS DE BACTERIAS COLIFORMES/100 ml DE CADA MES DURANTE EL PERIODO DE MUESTREO.

TABLA XXV .- NMP de E. coli / 100 ml de aguas de riego. Marzo - Octubre 1981.

LOCALIZACION	MUESTRAS								
RIO GENIL (DARRO)	A	1	$2,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$3,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^6$	$3,6 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$
		2	$1,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$2,3 \times 10^7$	$3,0 \times 10^6$	-	$1,5 \times 10^5$
	B	1	$4,6 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$9,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^7$	$3,6 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$
		2	$1,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$2,1 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$9,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^7$	$3,6 \times 10^5$
ACEQUIA GORDA	C	1	$3,6 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$3,6 \times 10^5$	$2,4 \times 10^7$
		2	$3,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$6,1 \times 10^5$	$3,6 \times 10^6$	$2,1 \times 10^7$	$4,3 \times 10^5$
	D	1	$7,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	$9,3 \times 10^5$	$7,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^7$
		2	$1,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$9,3 \times 10^5$	$9,1 \times 10^5$	$3,6 \times 10^6$	$4,3 \times 10^7$	$3,6 \times 10^5$

TABLA XXV .- (Continuación). Noviembre 1981 - Junio 1982

LOCALIZACION MUESTRAS		NOVIEMB.	DICIEMB.	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO
RIO GENIL (DARRO)	A 1	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$4,6 \times 10^6$	-	$9,1 \times 10^2$	$4,3 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^7$
	A 2	$2,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$3,6 \times 10^5$
	B 1	$4,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$4,6 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$9,1 \times 10^4$	$4,6 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$
	B 2	$2,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$7,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$7,3 \times 10^4$	$3,6 \times 10^5$
ACEQUIA GORDA	C 1	$3,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$3,6 \times 10^4$	$9,1 \times 10^5$
	C 2	$4,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$
	D 1	$1,1 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$9,1 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$3,6 \times 10^4$	$9,1 \times 10^5$
	D 2	$1,5 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$7,2 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$

TABLA XXV.- (Continuación) Julio 1982 - Febrero 1983

LOCALIZACION	MUESTRAS	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMB.	OCTUBRE	NOVIEMB.	DICIEMB.	ENERO	FEBRERO
RIO GENIL (DARRO)	A 1	$9,1 \times 10^4$	$4,6 \times 10^6$	-	-	$1,1 \times 10^7$	-	-	$1,5 \times 10^6$
	A 2	$9,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	-	-	-	$4,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
	B 1	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$
	B 2	$9,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	-	-	$1,5 \times 10^5$	$9,3 \times 10^6$
ACEQUIA GORDA	C 1	$1,5 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$
	C 2	$2,1 \times 10^7$	$9,1 \times 10^4$	$9,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$
	D 1	$4,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
	D 2	$9,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$

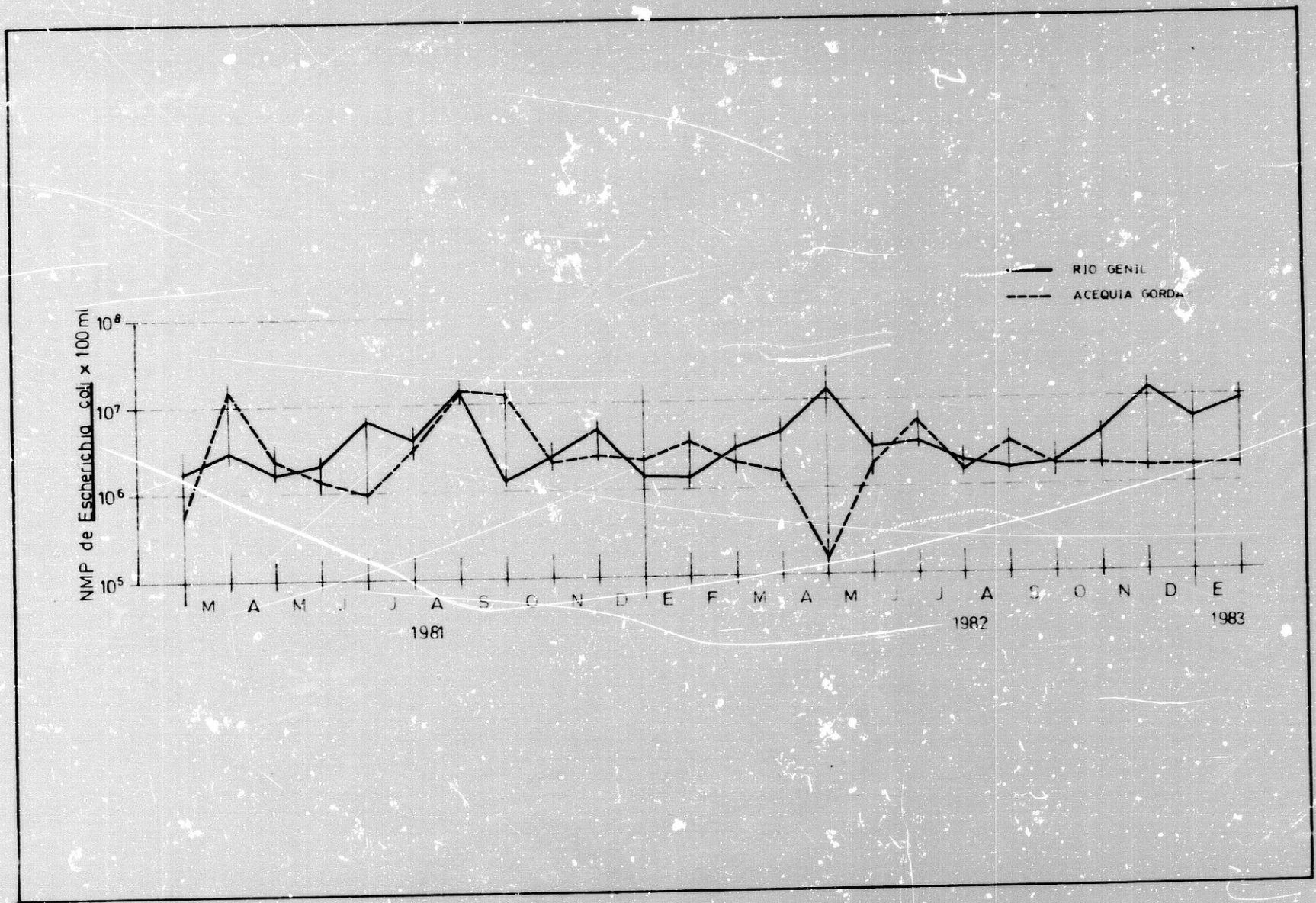


FIGURA 12 .- ***VALORES MEDIOS DE E. coli/100 ml DE CADA MES DURANTE EL PERIODO DE MUESTREO.***

TABLA XXVI.- NMP de estreptococos fecales /100 ml en aguas de riego. Marzo-Octubre 1981

LOCALIZACION MUESTRAS		MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMB.	OCTUBRE
RIO GENIL (DARRO)	A 1	$4,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$9,1 \times 10^4$
	A 2	$1,5 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	-	$3,6 \times 10^4$
	B 1	$4,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7$	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$3,9 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^4$
	B 2	$2,4 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$9,1 \times 10^4$	$3,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$
ACEQUIA GORDA	C 1	$2,3 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$9,1 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$
	C 2	$1,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$9,1 \times 10^5$	$3,6 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$	$3,6 \times 10^4$
	D 1	$3,9 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$7,3 \times 10^4$	$9,1 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$
	D 2	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$9,1 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$	$9,1 \times 10^4$

TABLA XXVI.- (Continuación) Noviembre 1981 - Junio 1982

LOCALIZACION	MUESTRAS	NOVIEMB.	DICIEMB.	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO
RIO GENIL (DARRO)	A 1	$1,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	-	$3,6 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	$9,3 \times 10^5$
	A 2	$1,5 \times 10^4$	$9,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$3,6 \times 10^4$
	B 1	$1,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$9,3 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10^7$	$9,3 \times 10^5$
	B 2	$2,4 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^4$	$9,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	$7,3 \times 10^4$
ACEQUIA GORDA	C 1	$2,4 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$	$9,1 \times 10^3$	$9,1 \times 10^3$	$3,6 \times 10^4$
	C 2	$4,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	$7,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^3$	$2,4 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$
	D 1	$4,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$4,6 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$
	D 2	$4,6 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$3,6 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	$9,1 \times 10^4$

TABLA XXVI.- (Continuación) Julio 1982 - Febrero 1983

LOCALIZACION	MUESTRAS		JULIO	AGOSTO	SEPTIEMB.	OCTUBRE	NOVIEMB.	DICIEMB.	ENERO	FEBRERO
RIO GENIL (DARRO)	A	1	$2,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	-	-	$1,1 \times 10^6$	-	-	$9,3 \times 10^5$
		2	$4,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7$	-	-	-	$4,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$
	B	1	$4,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$
		2	$9,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	-	-	$4,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$
ACEQUIA GORDA	C	1	$2,4 \times 10^5$	$9,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$
		2	$2,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^4$	$4,6 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$
	D	1	$2,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$4,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$
		2	$7,5 \times 10^5$	$9,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$

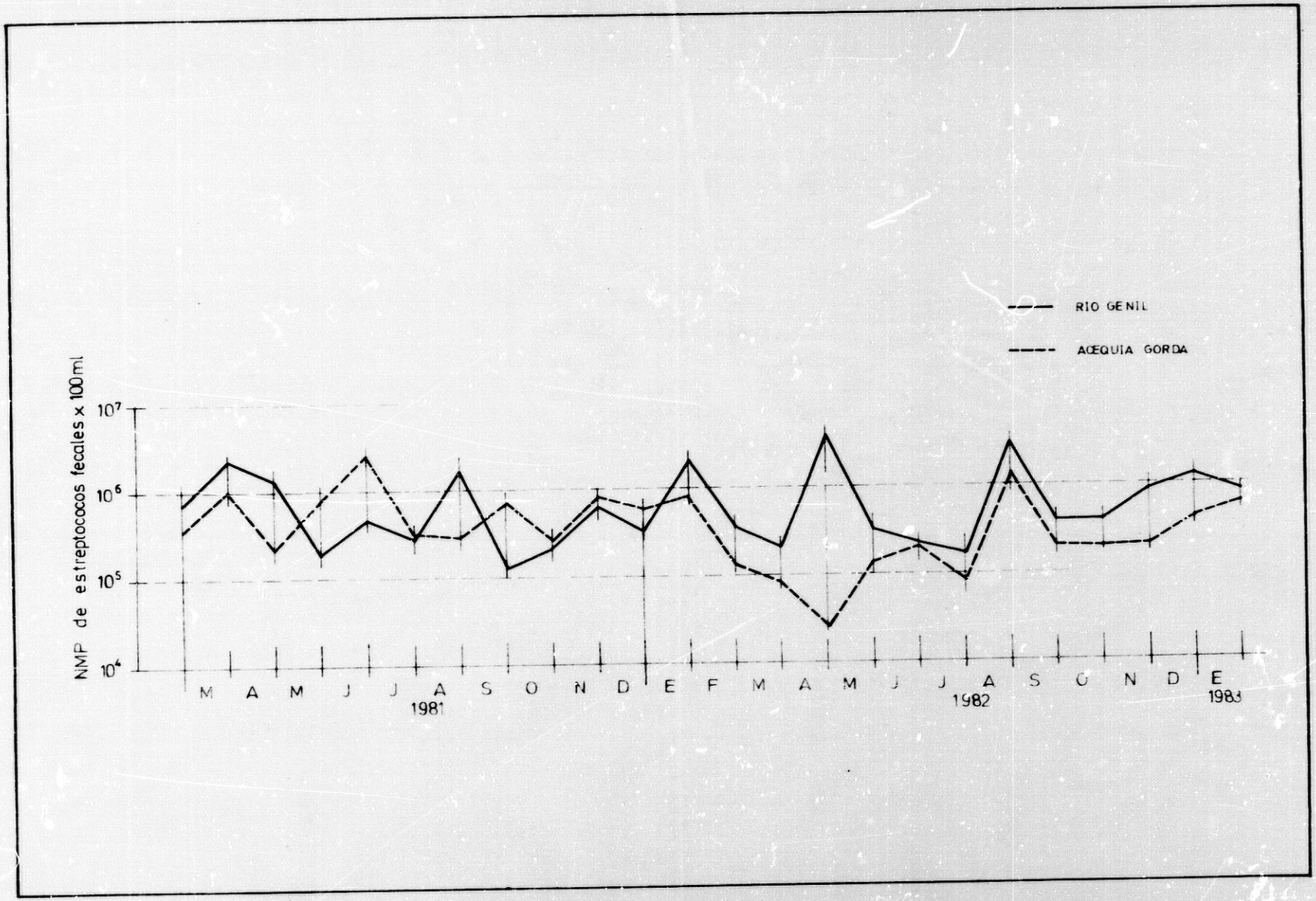


FIGURA 13 .- ***VALORES MEDIOS DE ESTREPTOCOCOS FECALES/100 ml DE CADA MES DURANTE EL PERIODO DE MUESTREO.***

TABLA XXVII.- Esporas de clostridios sulfito-reductores / 100 ml de agua de riego.

Marzo - Octubre 1981

LOCALIZACION	MUESTRAS	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMB.	OCTUBRE
RIO GENIL (DARRO)	A 1	$5,0 \times 10^5$	$7,45 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10$	$5,2 \times 10^3$	$8,0 \times 10^4$	$1,02 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$
	A 2	$2,0 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$	$6,95 \times 10^4$	$3,75 \times 10$	$5,0 \times 10^2$	$3,5 \times 10^3$	-	$2,8 \times 10^4$
	B 1	$2,5 \times 10^5$	$8,15 \times 10^5$	$2,6 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	$2,5 \times 10^4$	$2,25 \times 10^3$	$5,0 \times 10$
	B 2	$9,0 \times 10^4$	$9,65 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$2,4 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$8,5 \times 10^3$	$2,62 \times 10^4$
ACEQUIA GORDA	C 1	$4,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$1,5 \times 10$	$2,0 \times 10^2$	$1,65 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$
	C 2	$8,5 \times 10^3$	$1,52 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$3,45 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$4,1 \times 10^4$
	D 1	$5,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$4,0 \times 10$	$5,0 \times 10$	$4,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^4$	$1,05 \times 10^3$	$4,2 \times 10^3$
	D 2	$1,0 \times 10^4$	$1,48 \times 10^4$	$5,0 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	$4,5 \times 10^2$	$1,75 \times 10^3$	$1,28 \times 10^4$	$4,2 \times 10^4$

TABLA XXVII.-(Continuación) Noviembre 1981 - Junio 1982

LOCALIZACION	MUESTRAS	NOVIEMB.	DICIEMB.	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO
RIO GENIL (DARRO)	A 1	$3,0 \times 10^3$	$1,45 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$	-	$4,5 \times 10^4$	$4,5 \times 10$	$1,5 \times 10^3$	$1,03 \times 10^5$
	A 2	$1,5 \times 10^3$	$7,15 \times 10^4$	$9,0 \times 10$	$1,04 \times 10^3$	$8,9 \times 10^4$	$4,5 \times 10^2$	$3,3 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$
	B 1	$8,5 \times 10^3$	$5,05 \times 10^3$	$2,85 \times 10^4$	0	$1,4 \times 10^4$	$2,5 \times 10$	$1,0 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$
	B 2	$1,0 \times 10^3$	$2,6 \times 10^4$	$3,0 \times 10$	$9,06 \times 10^2$	$3,75 \times 10^4$	$5,0 \times 10$	$3,3 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3$
ACEQUIA GORDA	C 1	$1,75 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	0	$4,34 \times 10^4$	$5,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$
	C 2	$5,0 \times 10^2$	$1,28 \times 10^4$	$8,5 \times 10$	$7,33 \times 10^2$	$7,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$	$8,5 \times 10^2$	$4,5 \times 10^3$
	D 1	$2,05 \times 10^4$	$2,6 \times 10^3$	$4,0 \times 10^4$	0	$1,8 \times 10^4$	$2,0 \times 10$	$5,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$
	D 2	$7,5 \times 10^5$	$5,0 \times 10^2$	$2,25 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	$4,5 \times 10^3$

TABLA XXVII.- (Continuación) Julio 1982 - Febrero 1983

LOCALIZACION	MUESTRAS	JULIO	AGOSTO	SEPTIEB.	OCTUBRE	NOVIEMB.	DICIEMB.	ENERO	FEBRERO
RIO GENIL (DARRO)	A 1	$4,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	-	-	$6,0 \times 10^2$	-	-	$7,45 \times 10^4$
	A 2	$1,15 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	-	-	-	$3,6 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$
	B 1	$3,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$	$3,3 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$	$4,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$
	B 2	$1,3 \times 10^4$	$1,45 \times 10^4$	$6,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$	-	-	$4,4 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$
ACEQUIA GORDA	C 1	$1,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$	$3,6 \times 10^4$	$3,05 \times 10^4$	$4,5 \times 10^2$	$9,0 \times 10^2$	$8,0 \times 10^3$	$4,45 \times 10^4$
	C 2	$1,55 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3$	$1,75 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2$	$6,5 \times 10^3$	$2,75 \times 10^4$	$1,85 \times 10^4$
	D 1	$2,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$4,25 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	$8,0 \times 10^2$	$6,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$3,45 \times 10^4$
	D 2	$1,4 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$	$4,5 \times 10^3$	$3,8 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$

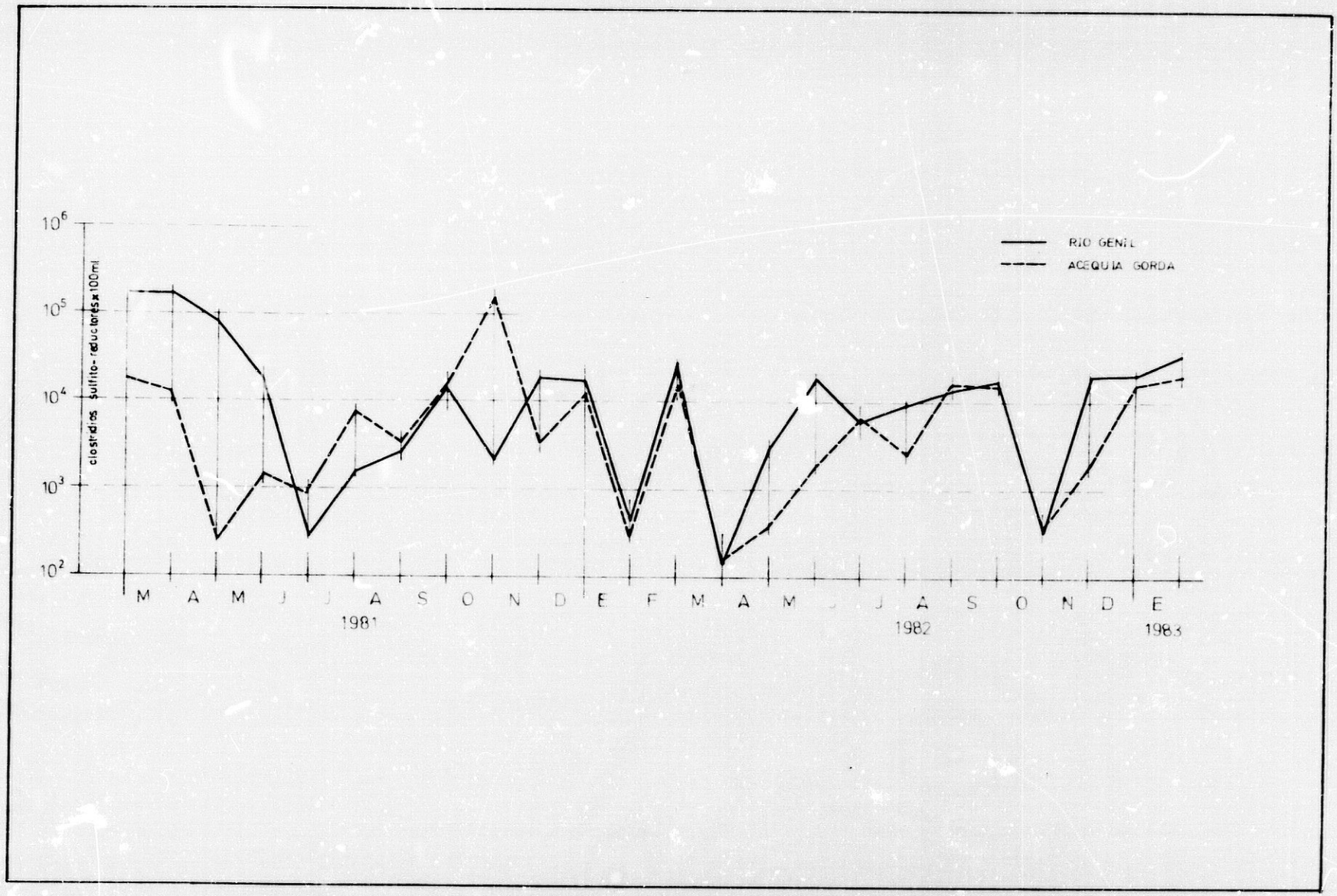


FIGURA 14 .- *VALORES MEDIOS DE CLOSTRIDIOS SULFITO-REDUCTORES/100 ml DE CADA MES DURANTE EL PERIODO DE MUESTREO.*

IV.1.6. Comparaciones entre los indicadores microbiológicos de aguas de riego.

Los valores máximos, mínimos y medios de los indicadores microbiológicos estudiados en las aguas de riego se expresan en la Tabla XXVIII Con el propósito de conocer los valores absolutos y porcentuales de las muestras de aguas de riego analizadas se ha construido la Tabla XXIX en la cual se expresan los rangos de concentraciones de microorganismos.

En la Tabla XXX se exponen los valores medios de los indicadores microbiológicos en aguas de riego según la estación en que fueron recogidas las muestras. Asimismo en la Figura 15 se exponen gráficamente los valores medios antes indicados.

Cada uno de los parámetros analizados en nuestro estudio se han representado de forma gráfica frente a aquellos con los que pudieran guardar una mayor correlación. Con este objeto en la Figura 16A se representa gráficamente por un lado el recuento de bacterias aerobias por ml detectadas a lo largo de nuestro estudio con respecto al número más probable de coliformes en 100 ml durante el mismo período, obtenidos en el lugar denominado A perteneciente al Rio Genil (Darro). En las siguientes figuras denominadas 16B, C y D se establecen estas mismas correlaciones según se trate respectivamente del Rio Genil localización B, y de la Acequia Gorda localización C y D.

En las Figuras 17A, B, C y D se establecen para las mismas localizaciones señaladas anteriormente, la correlación entre NMP de coliformes totales y NMP de E. coli detectados.

De igual forma, en las Figuras 18A, B, C y D se indican las correlaciones entre el NMP de E. coli y el de estreptococos fecales, así como de clostridios y NMP de E. coli en las figuras

19A, B, C y D ó el de estreptococos y clostridios en las Figuras 20A, B, C y D.

Los resultados obtenidos en estas correlaciones sólo fueron significativos para NMP de coliformes y de E. coli en el punto A del Rio Genil (Darro) con un valor de $r=0,8$ y $p<0,001$ y en el punto B $r=0,4$ y un valor de $p<0,01$. Por otro lado, tambien fue significativa la correlación entre E. coli y estreptococos fecales en el punto B del Rio Genil $r=0,55$ y $p<0,01$.

TABLA XXVIII.- VALORES MAXIMOS, MINIMOS Y MEDIOS DE LOS INDICADORES MICROBIOLOGICOS ESTUDIADOS EN AGUAS DE RIEGO.

	Mínimo	Máximo	Medio
Bacterias aerobias/100 ml	$1,2 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^{11}$	$3,1 \cdot 10^9$
NMP de Coliformes	$3,6 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^7$
NMP de *E. coli*	$9,1 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^7$	$5,1 \cdot 10^6$
NMP de Estreptococos fecales	$4,6 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^7$	$8,9 \cdot 10^5$
Clostridios sulfito-reductores/100 ml	0	$8,1 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^4$

TABLA XXIX .- Nº ABSOLUTOS Y PORCENTUALES DE MUESTRAS DE AGUAS DE RIEGO, CUYOS VALORES DE INDICADORES SE ENCUENTRAN EN LOS RANGOS INDICADOS.

Los números entre paréntesis corresponden a los valores porcentuales.

		RANGOS					
	Nº Muestra	10^2	10^2-10^4	10^4-10^6	10^6-10^8	10^8-10^{10}	10^{10}-10^{12}
Bact. aerobias 100 ml	181			5 (2,8)	112 (61,9)	48 (26,5)	16 (8,8)
NMP Coliformes	181			35 (19,3)	142 (78,5)	4 (2,2)	
NMP *E. coli*	181		1 (0,6)	69 (38,1)	111 (61,3)		
NMP Estreptococos Fecales	181		3 (1,7)	145 (80,1)	33 (18,2)		
Clostridios sulfito-reductores/100 ml	181	16 (8,8)	96 (5,3)	69 (38,2)			

TABLA XXX .--VALORES MEDIOS DE LOS INDICADORES MICROBIOLOGICOS ESTUDIADOS EN LAS AGUAS DE RIEGO SEGUN LA EPOCA DE RECOGIDA.

ESTACION	Bact. aerobias ml	NMP de Coliformes	NMP de *E. coli*	NMP de Estreptococos fecales	Clostridios sulfito-reductores/100 ml
PRIMAVERA	24.077.176	5.640.125	4.263.775	1.204.412	51.025
VERANO	69.597.742	20.532.875	5.207.825	801.555	9.083
OTOÑO	1.161.071	5.340.357	4.299.642	598.793	38.744
INVIERNO	3.482.488	4.667.325	3.518.651	955.863	19.574
VALORES MEDIOS	24.579.619	9.045.170	4.315.723	890.156	29.607

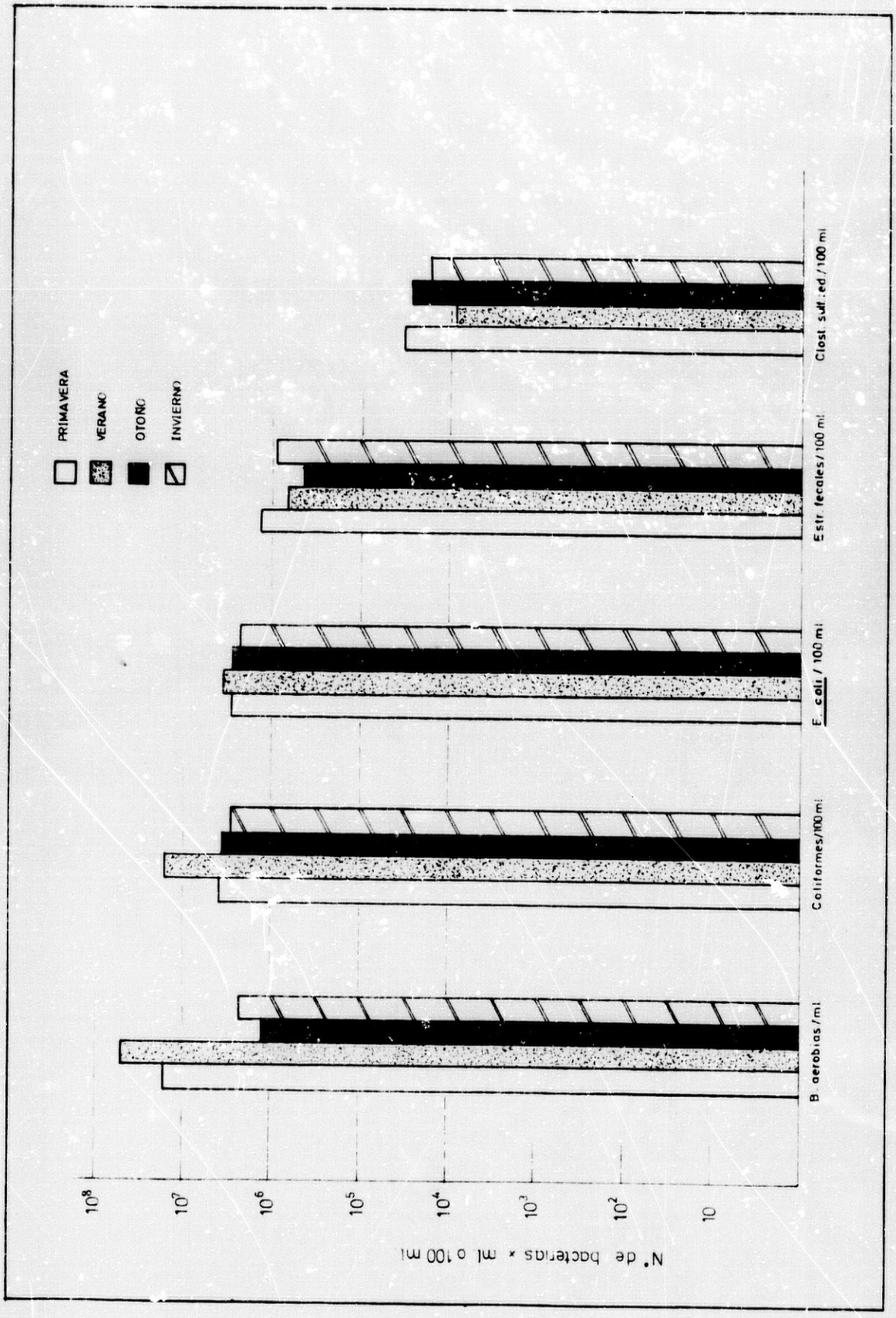


FIGURA 15 .- VALORES MEDIOS DE LOS INDICADORES MICROBIOLOGICOS ESTUDIADOS EN LAS AGUAS DE RIEGO SEGUN LA EPOCA DE RECOGIDA.

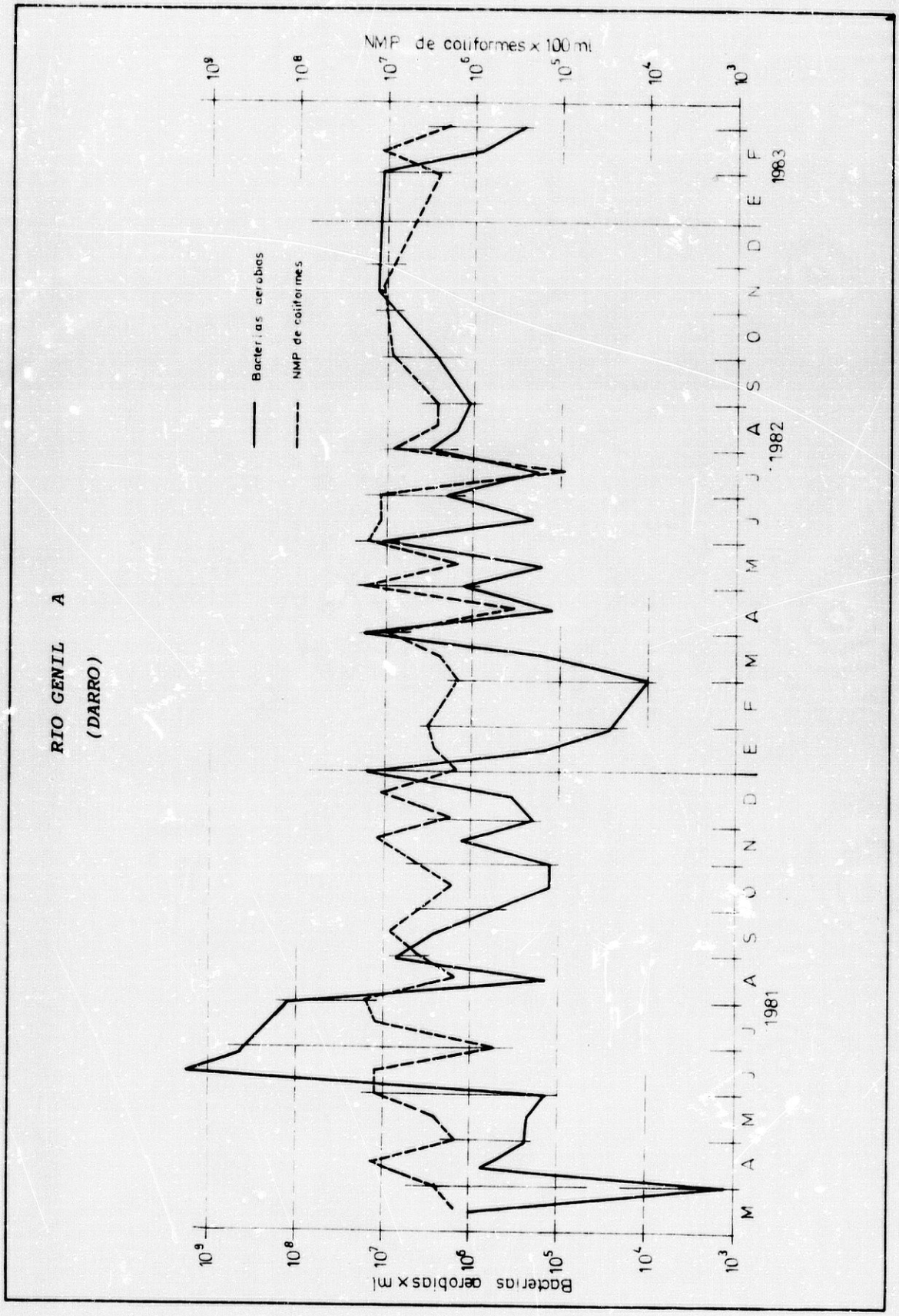


FIGURA 16 A.- RELACION BACTERIAS AEROBIAS/NMP DE COLIFORMES EN EL RIO GENIL (Punto de toma A).

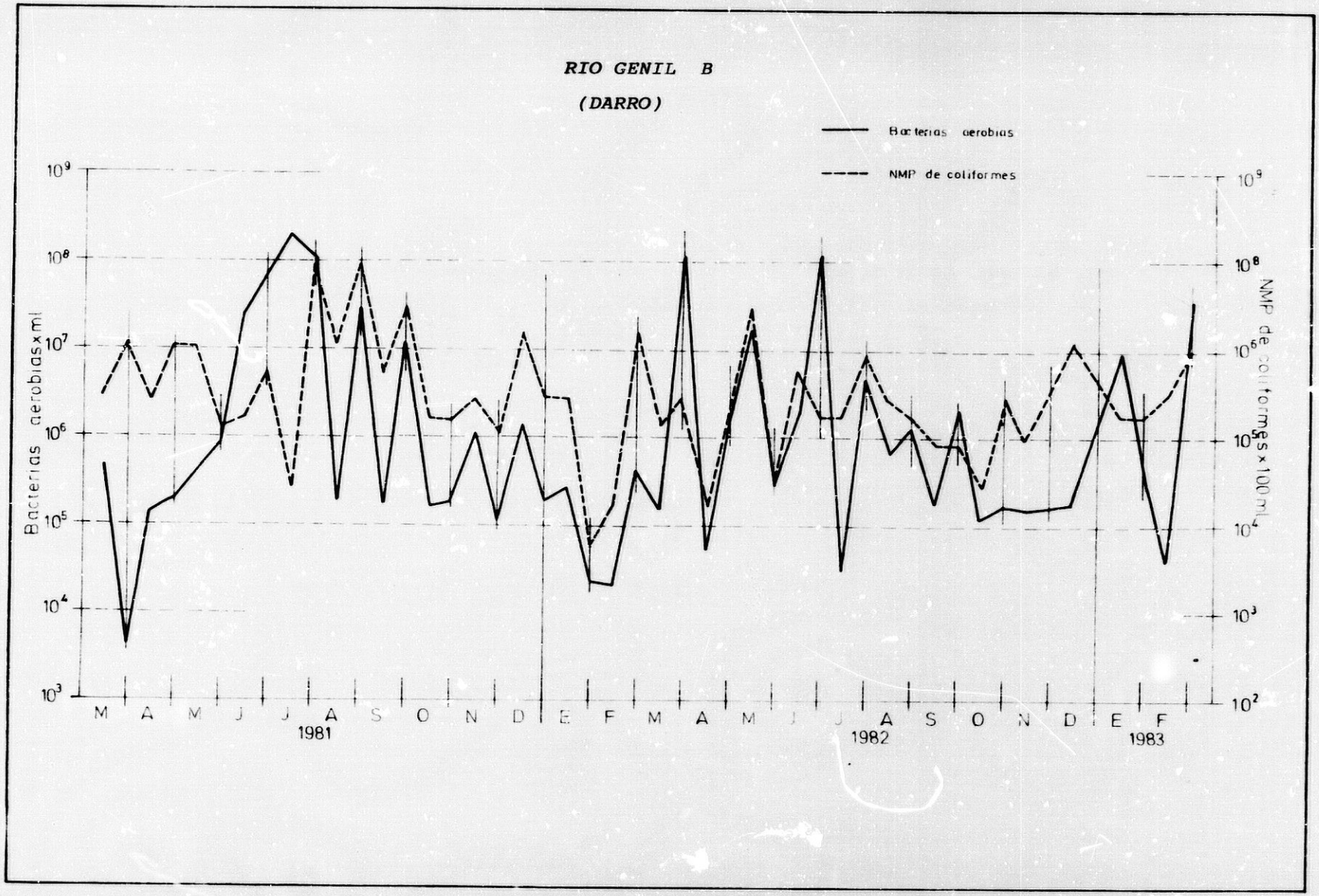


FIGURA 16 B .- RELACION BACTERIAS AEROBIAS/NMP DE COLIFORMES EN EL RIO GENIL (punto de toma B).

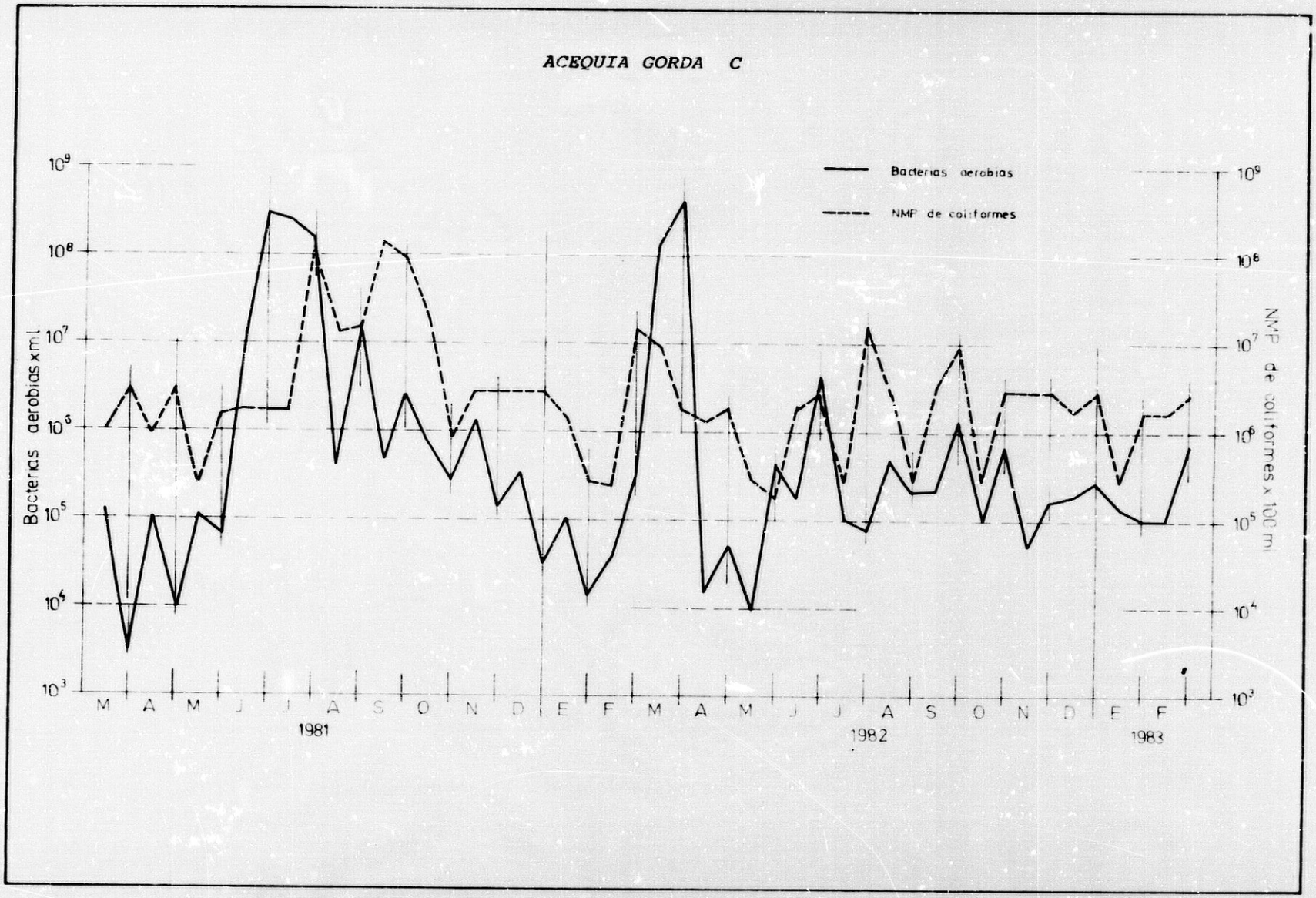


FIGURA 16 C .- RELACION BACTERIAS AEROBIAS/NMP DE COLIFORMES EN LA ACEQUIA GORDA (punto de toma C).

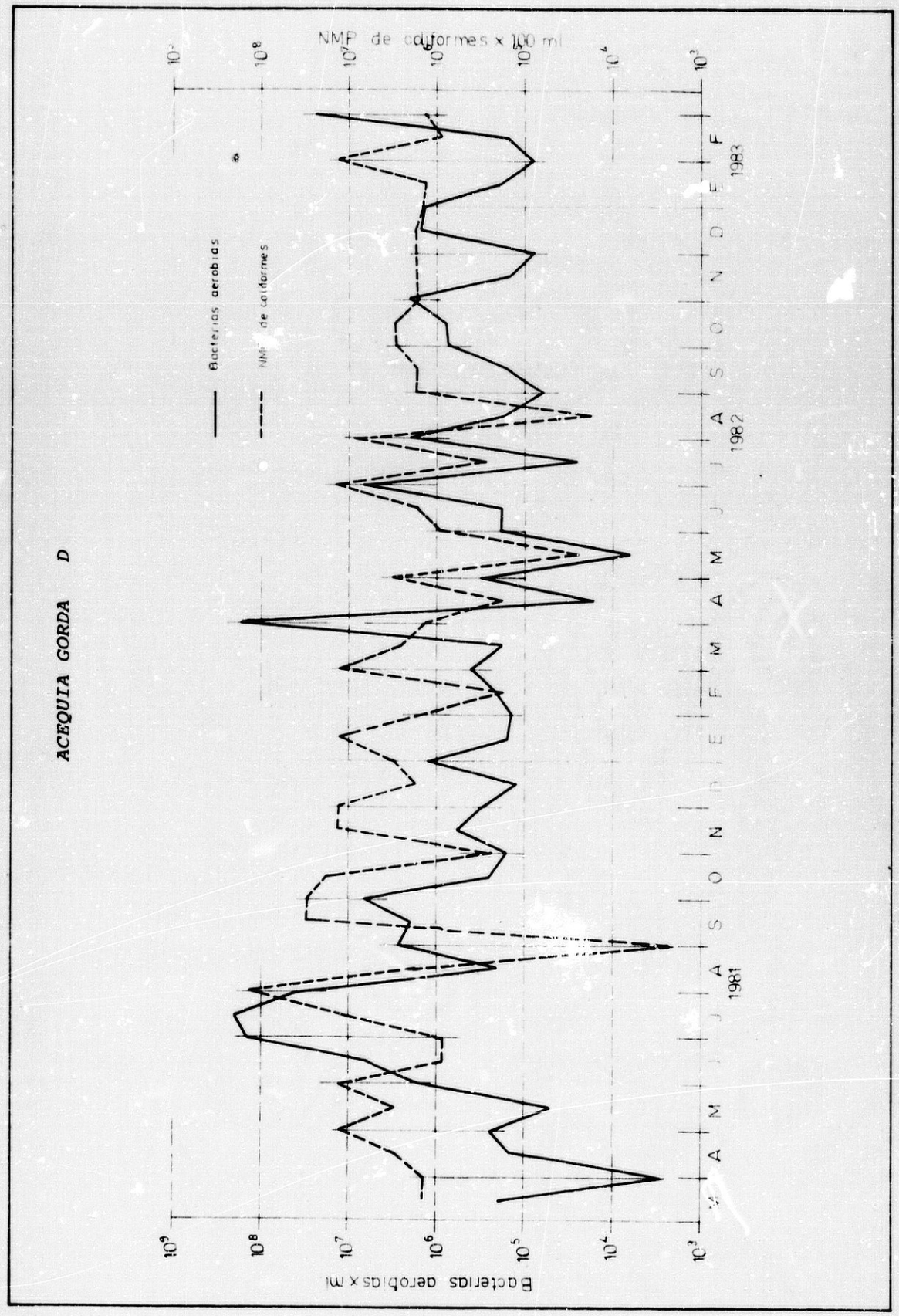


FIGURA 16 D .- RELACION BACTERIAS AEROBIAS/NMP DE COLIFORMES EN LA ACEQUIA GORDA (punto de toma D).

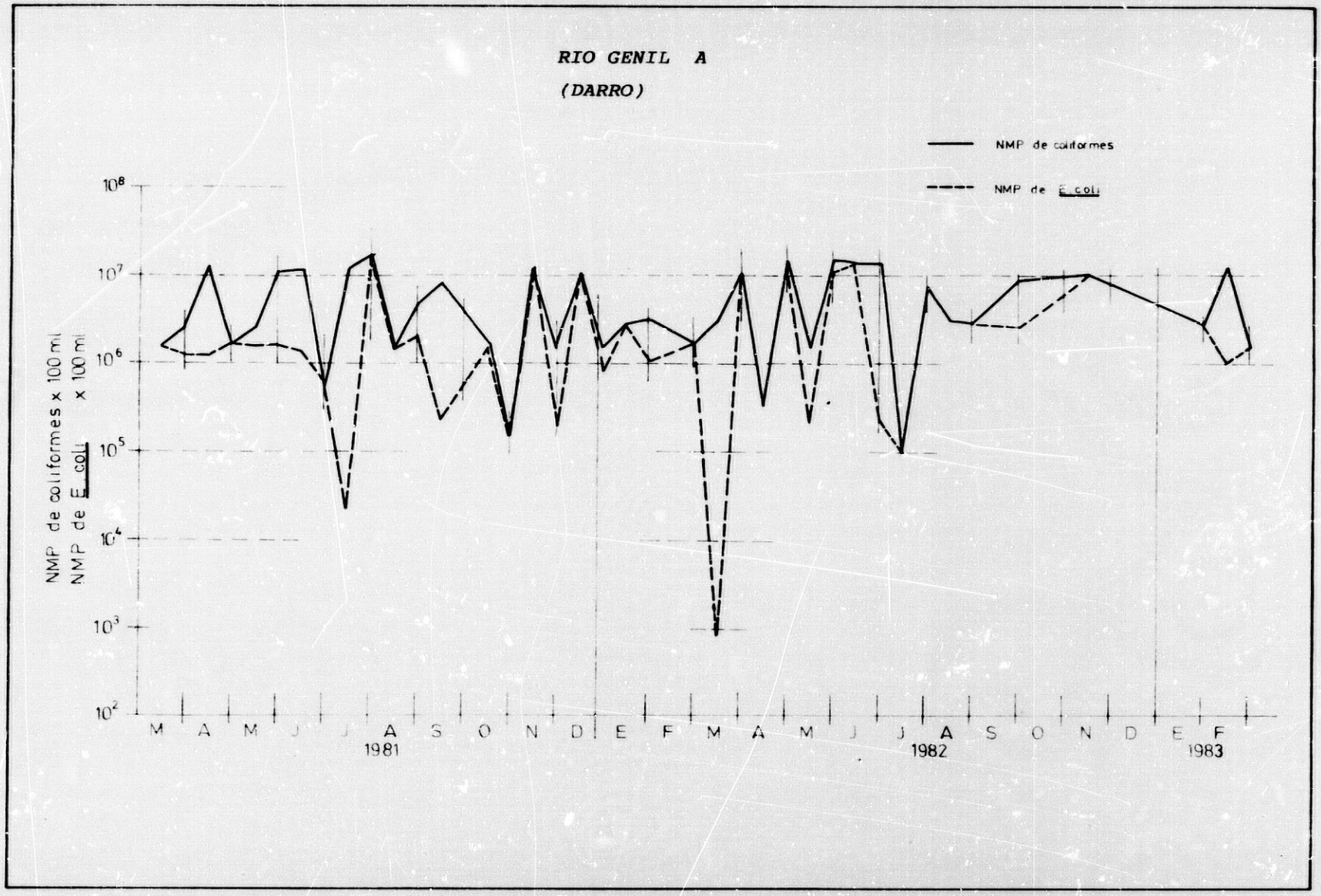


FIGURA 17 A .- RELACION NMP COLIFORMES TOTALES/NMP *E. coli* EN EL RIO GENIL (punto de toma A).

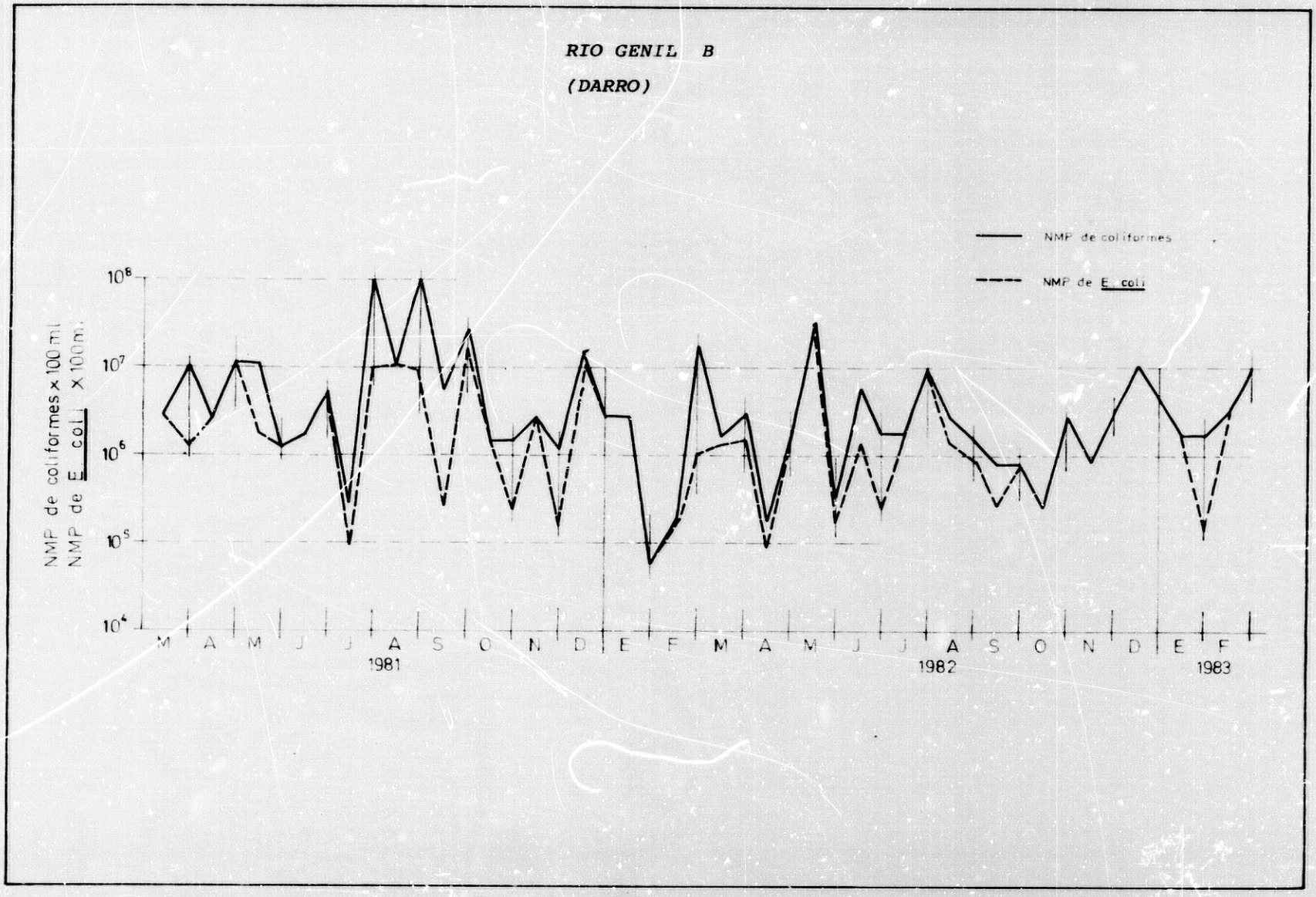


FIGURA 17 B .- RELACION NMP COLIFORMES TOTALES/NMP *E. coli* EN EL RIO GENIL (punto de toma B).

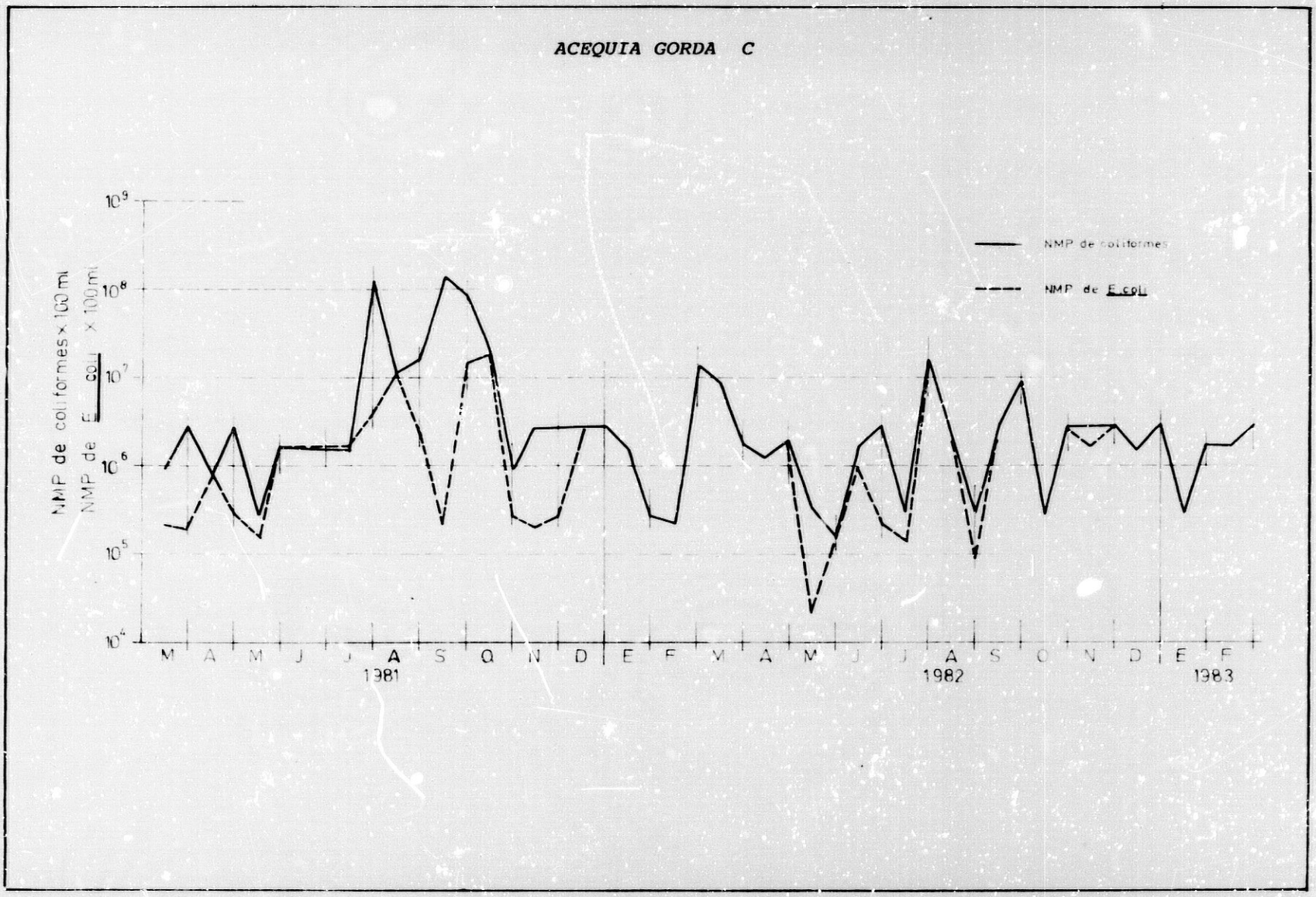


FIGURA 17 C .- RELACION NMP COLIFORMES TOTALES/NMP *E. coli* EN LA ACEQUIA GORDA (punto de toma C).

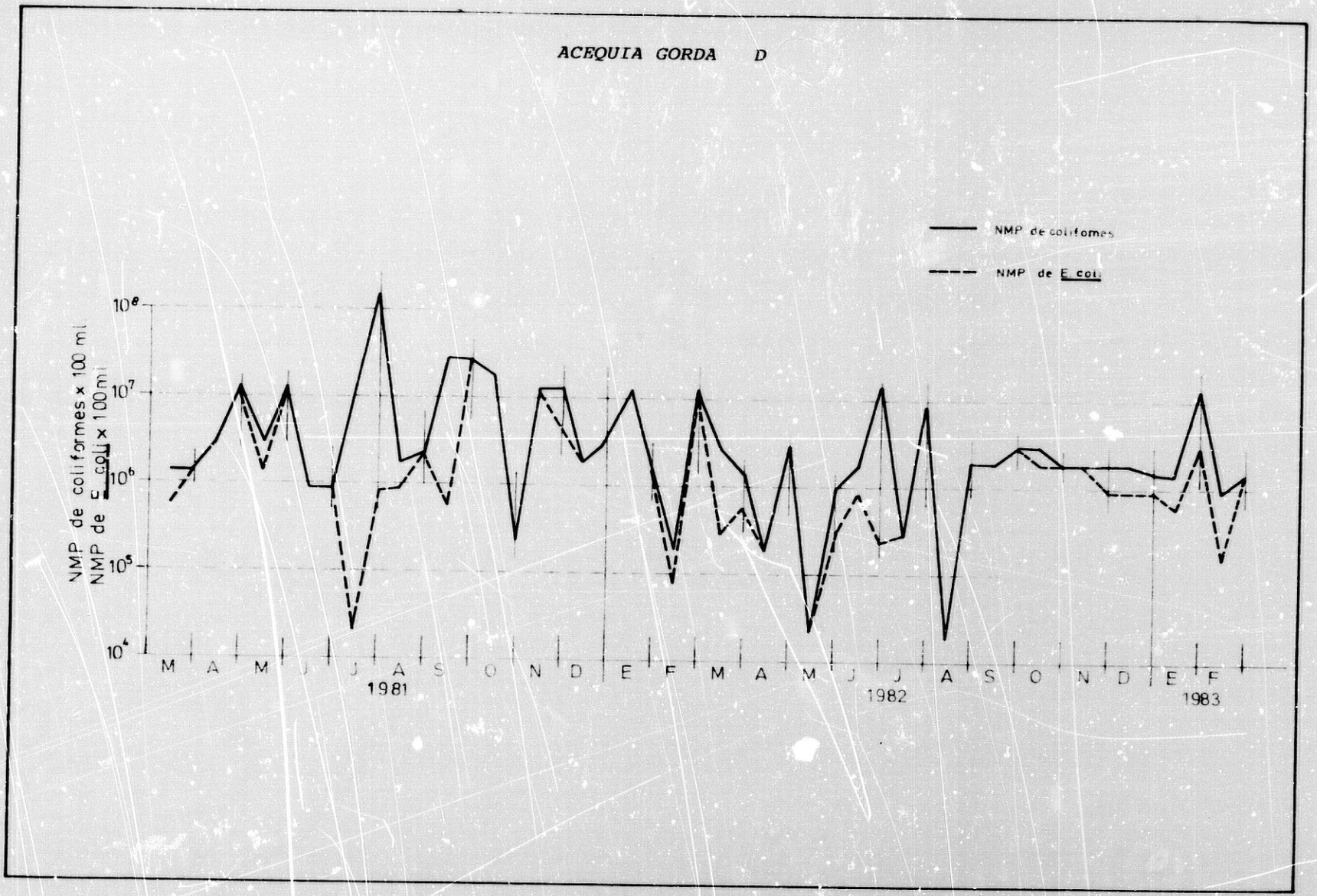


FIGURA 17 D .- RELACION NMP COLIFORMES TOTALES/NMP E. coli EN LA ACEQUIA GORDA (punto de toma D).

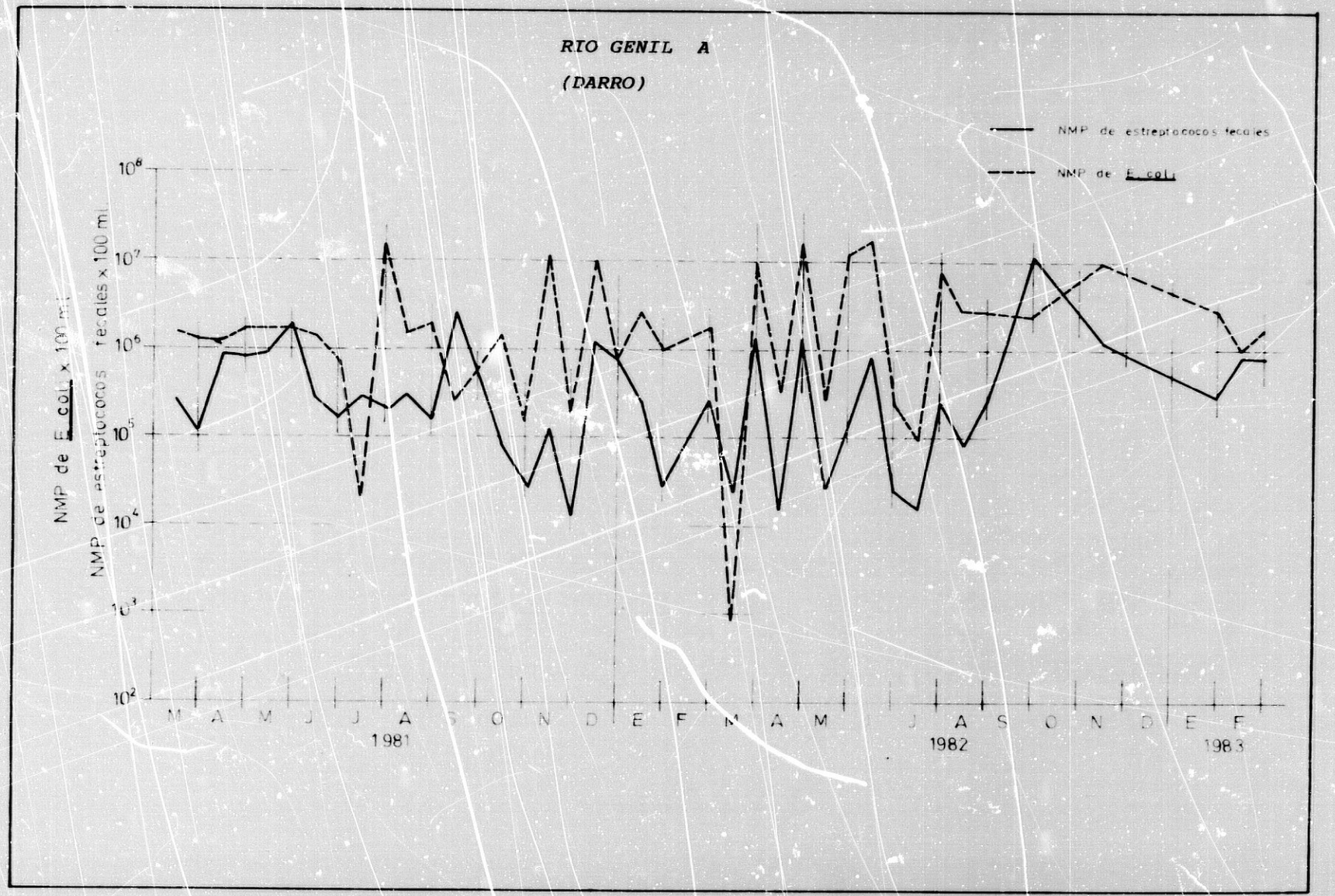


FIGURA 18 A *.- RELACION NMP E. coli/NMP ESTREPTOCOCOS FECALES EN EL RIO GENIL (punto de toma A).*

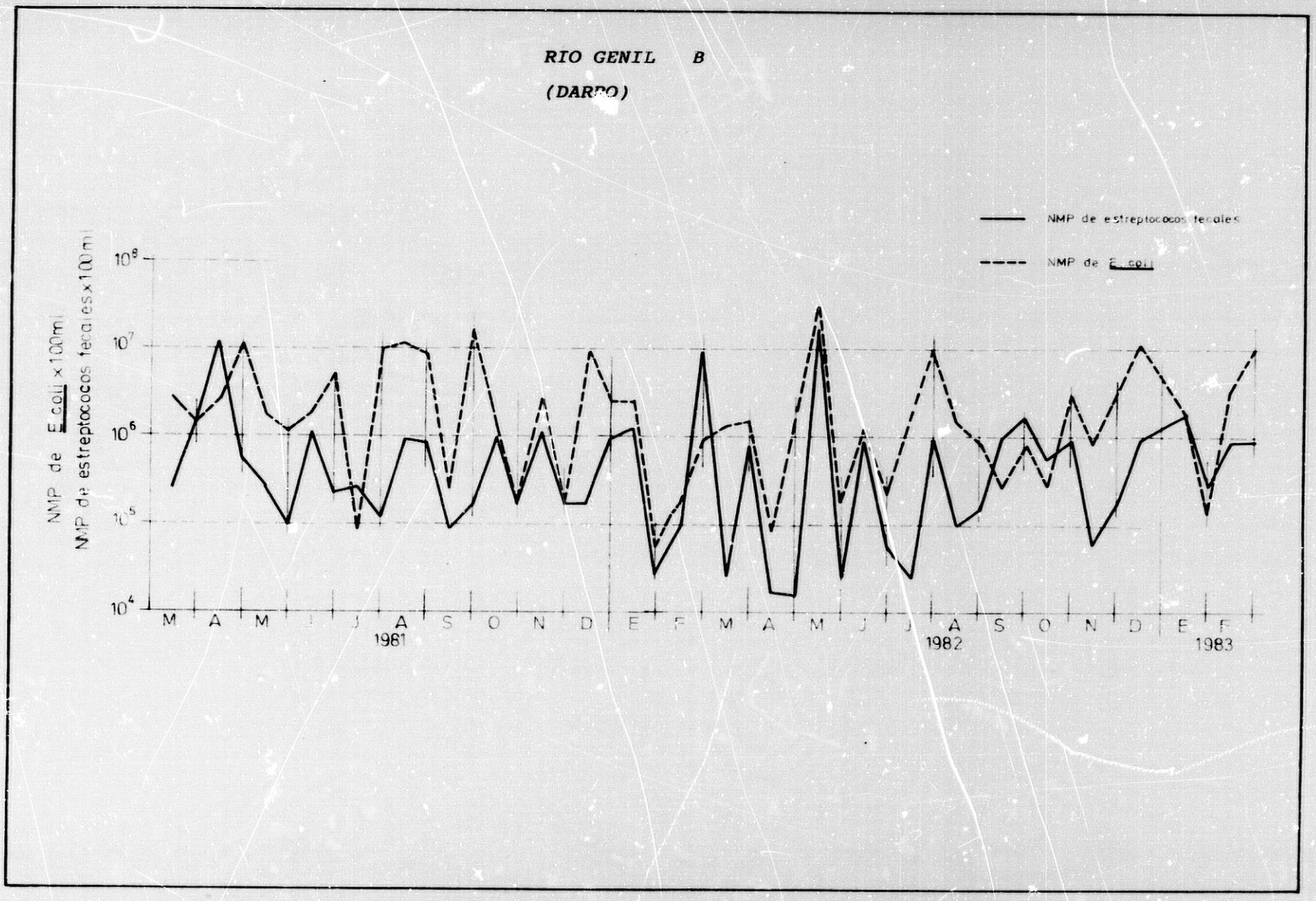


FIGURA 18 B .- RELACION NMP E. coli/NMP ESTREPTOCOCOS FECALES EN EL RIO GENIL (punto de toma B).

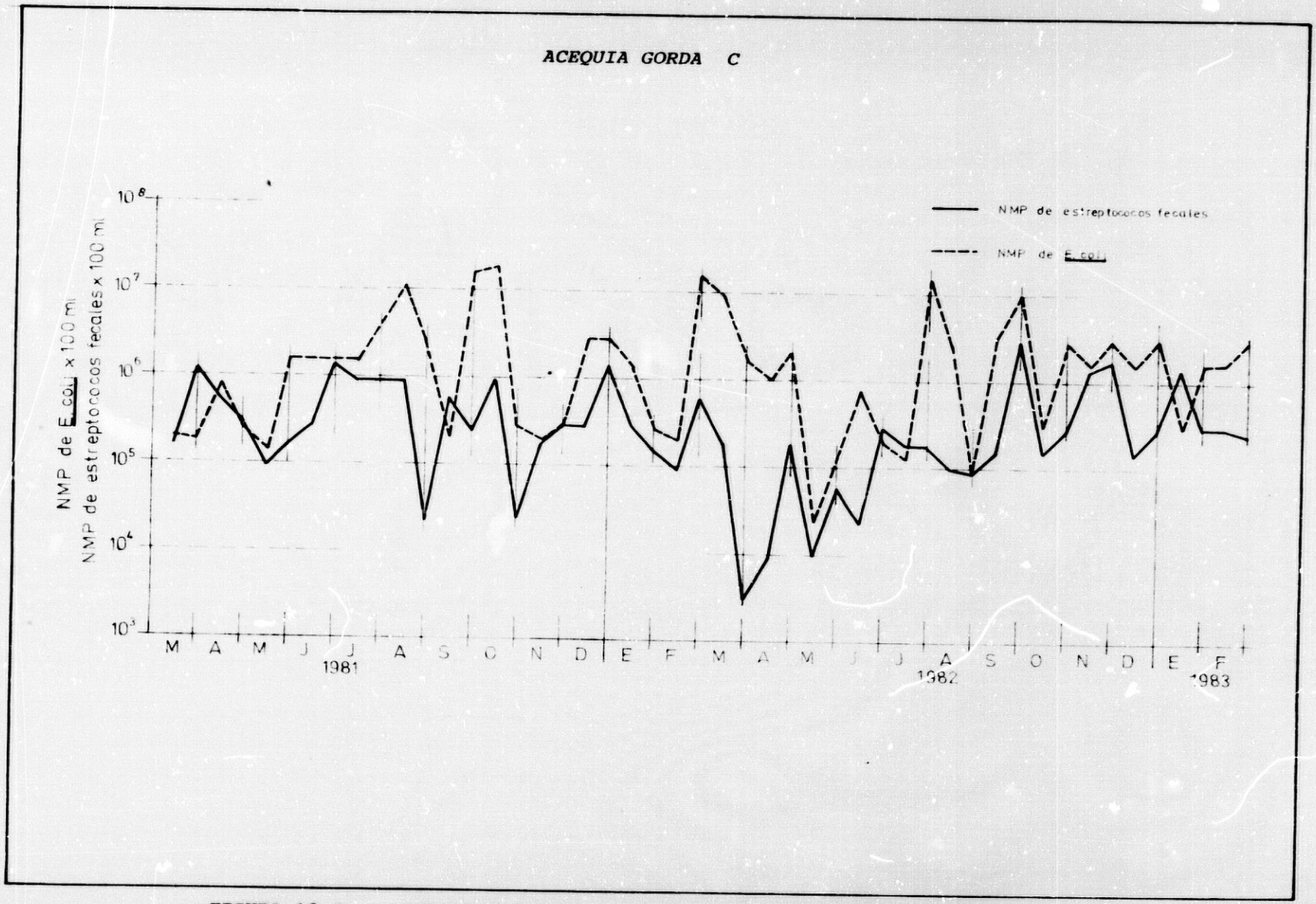


FIGURA 18 C .- RELACION NMP *E. coli*/NMP ESTREPTOCOCOS FECALES EN LA ACEQUIA GORDA (punto de toma C).

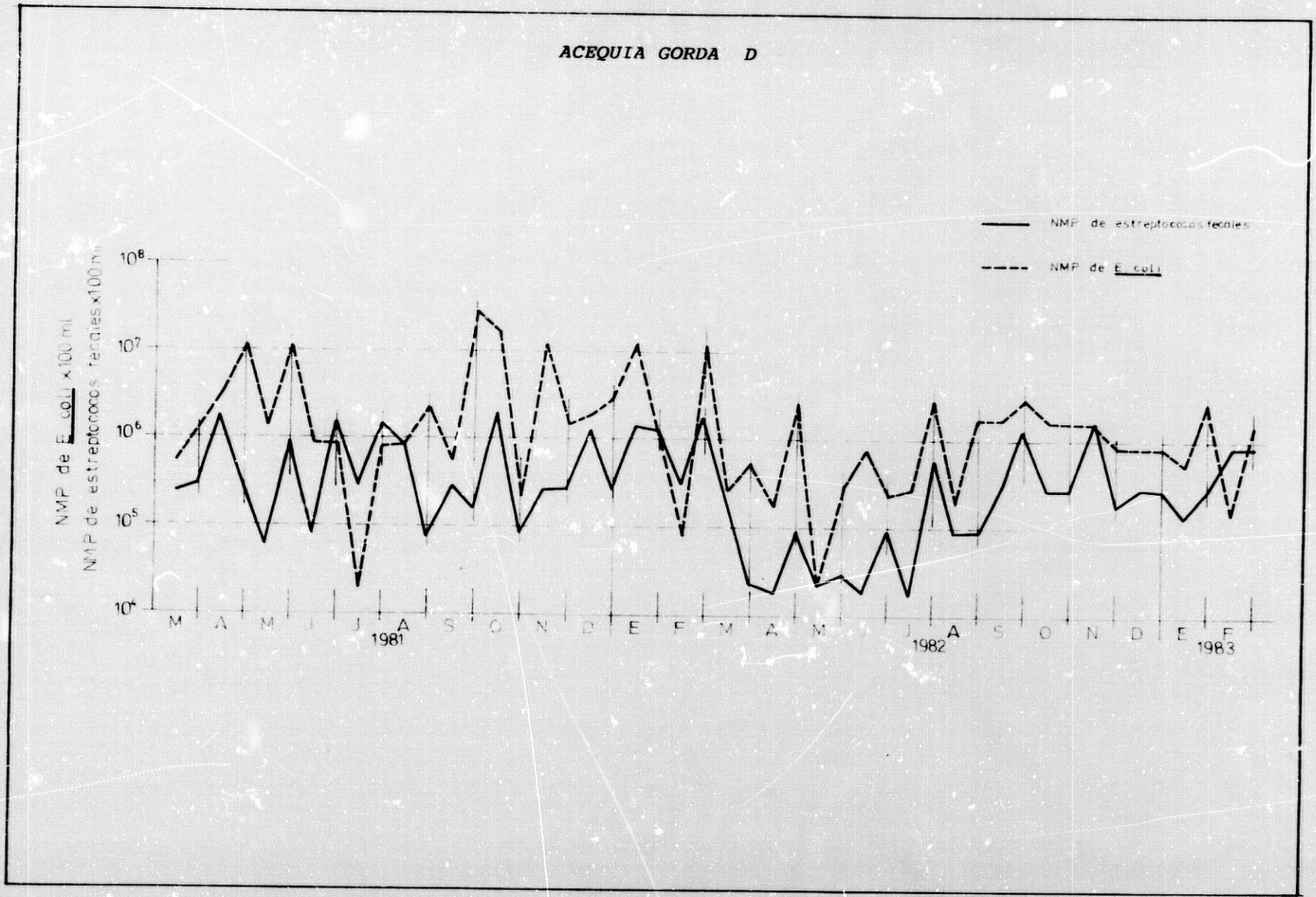


FIGURA 18 D *.- RELACION NMP E. coli/NMP ESTREPTOCOCOS FECALES EN LA ACEQUIA GORDA (punto de toma D).*

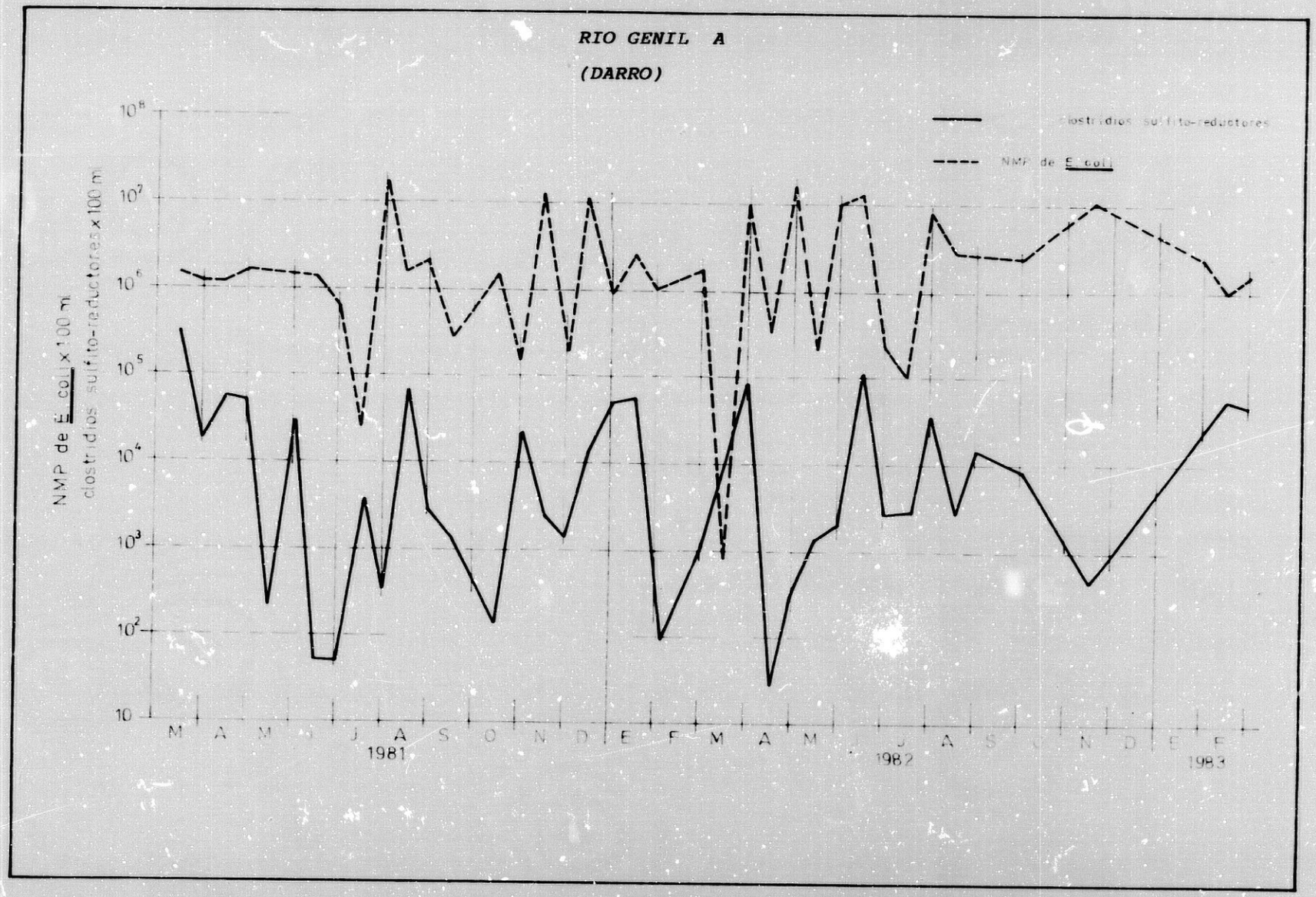


FIGURA 19 A.- RELACION NMP E. coli/CLOSTRIDIOS SULFITO-REDUCTORES EN EL RIO GENIL (punto de toma A).

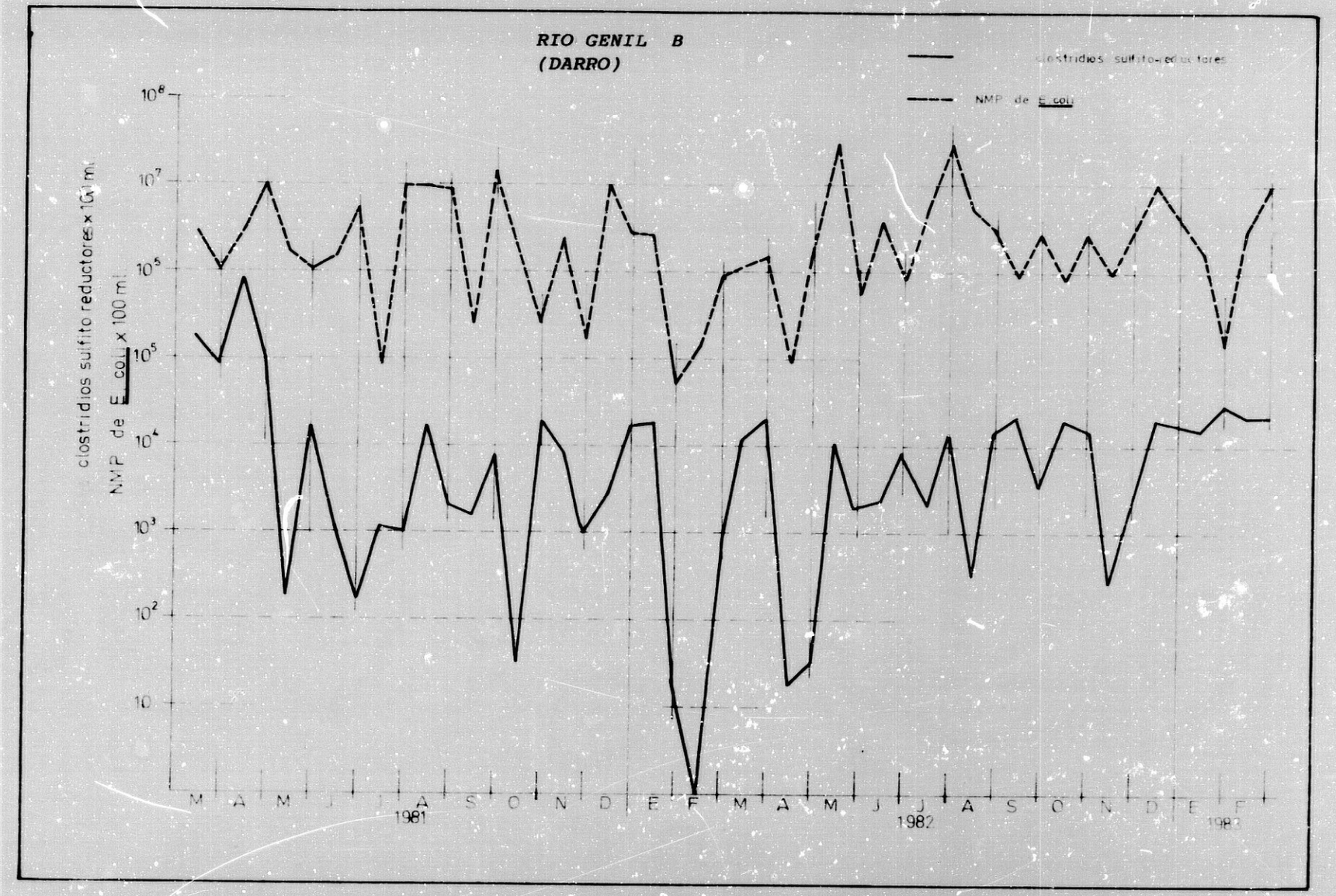


FIGURA 19 B.- *RELACION NMP E. coli/CLOSTRIDIOS SULFITO-REDUCTORES EN EL RIO GENIL (punto de toma B).*

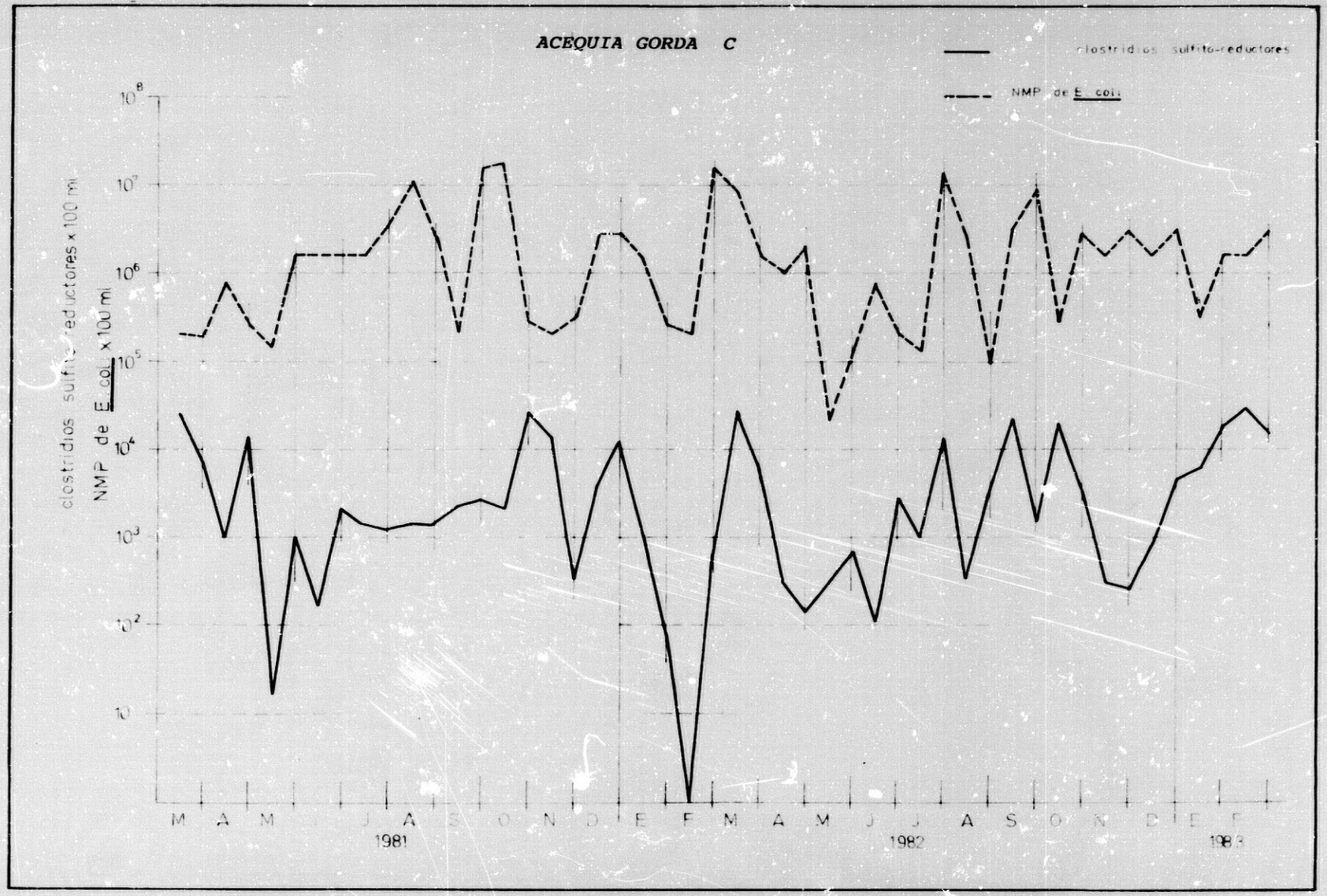


FIGURA 19 C .- RELACION NMP E. coli/CLOSTRIDIOS SULFITO-REDUCTORES EN LA ACEQUIA GORDA (punto de toma C).

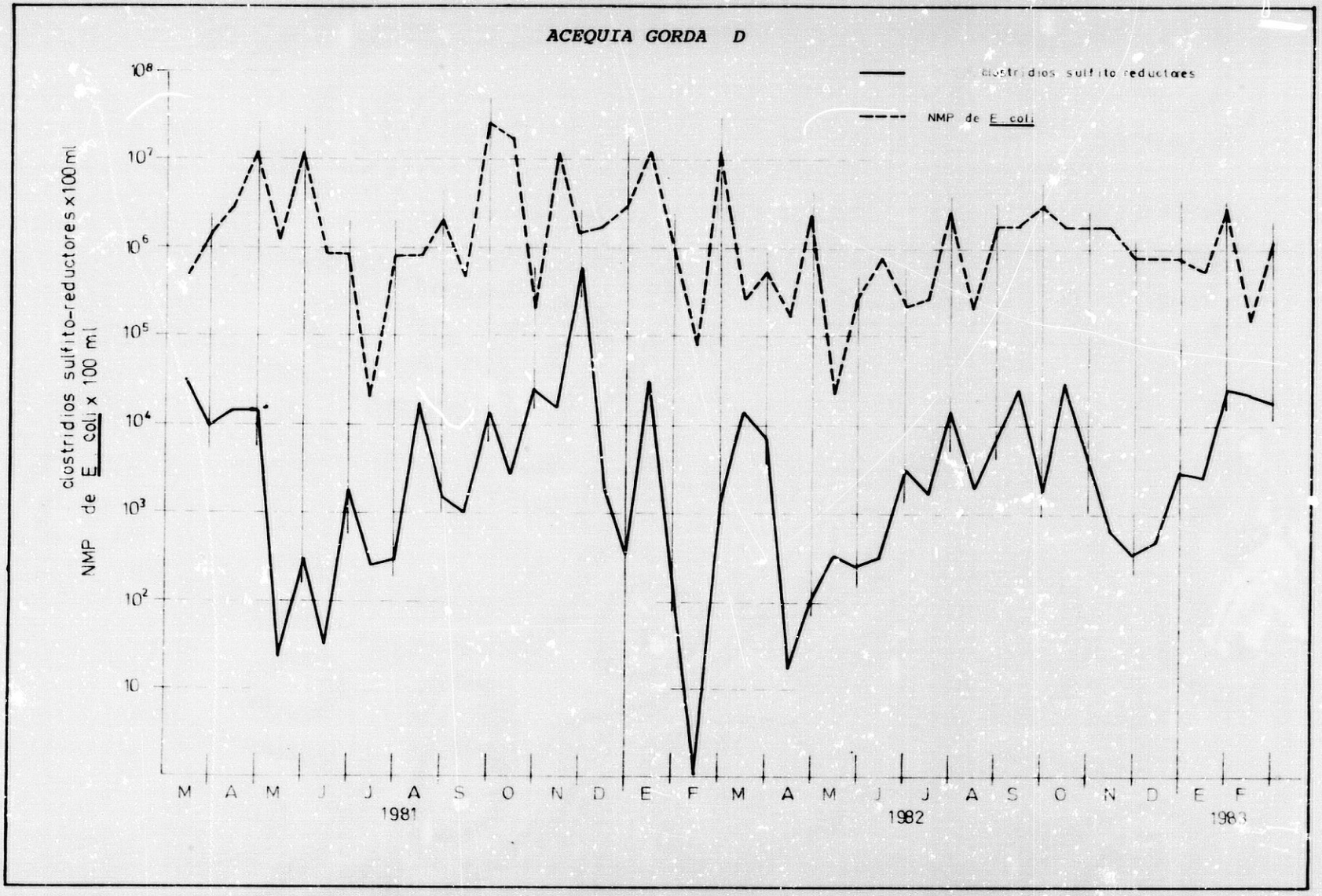


FIGURA 19 D *.- RELACION NMP E. coli/CLOSTRIDIOS SULFITO-REDUCTORES EN LA ACEQUIA GORDA (punto de toma D).*

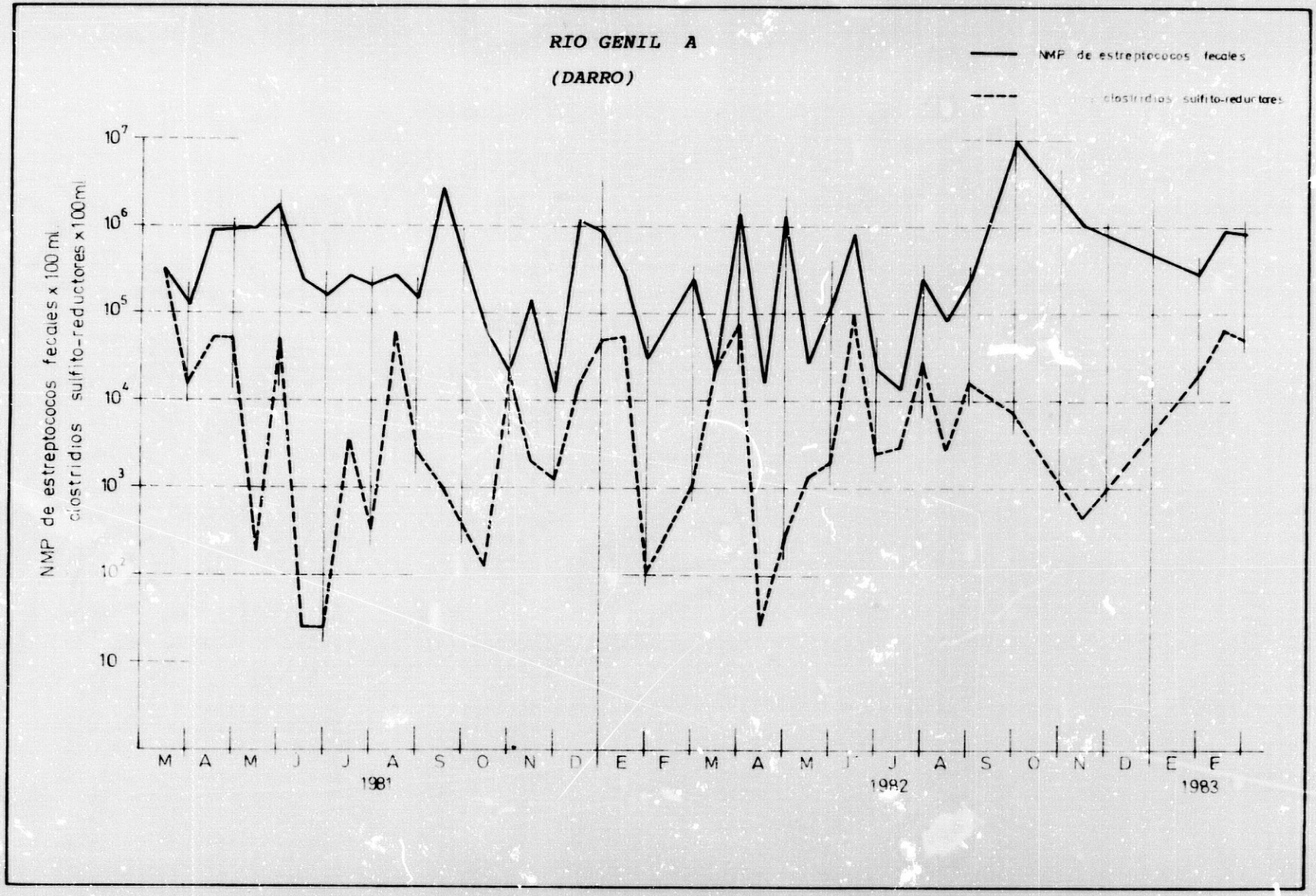


FIGURA 20 A ***.- RELACION NMP ESTREPTOCOCOS FECALES/CLOSTRIDIOS SULFITO-REDUCTORES EN EL RIO GENIL (punto de toma A).***

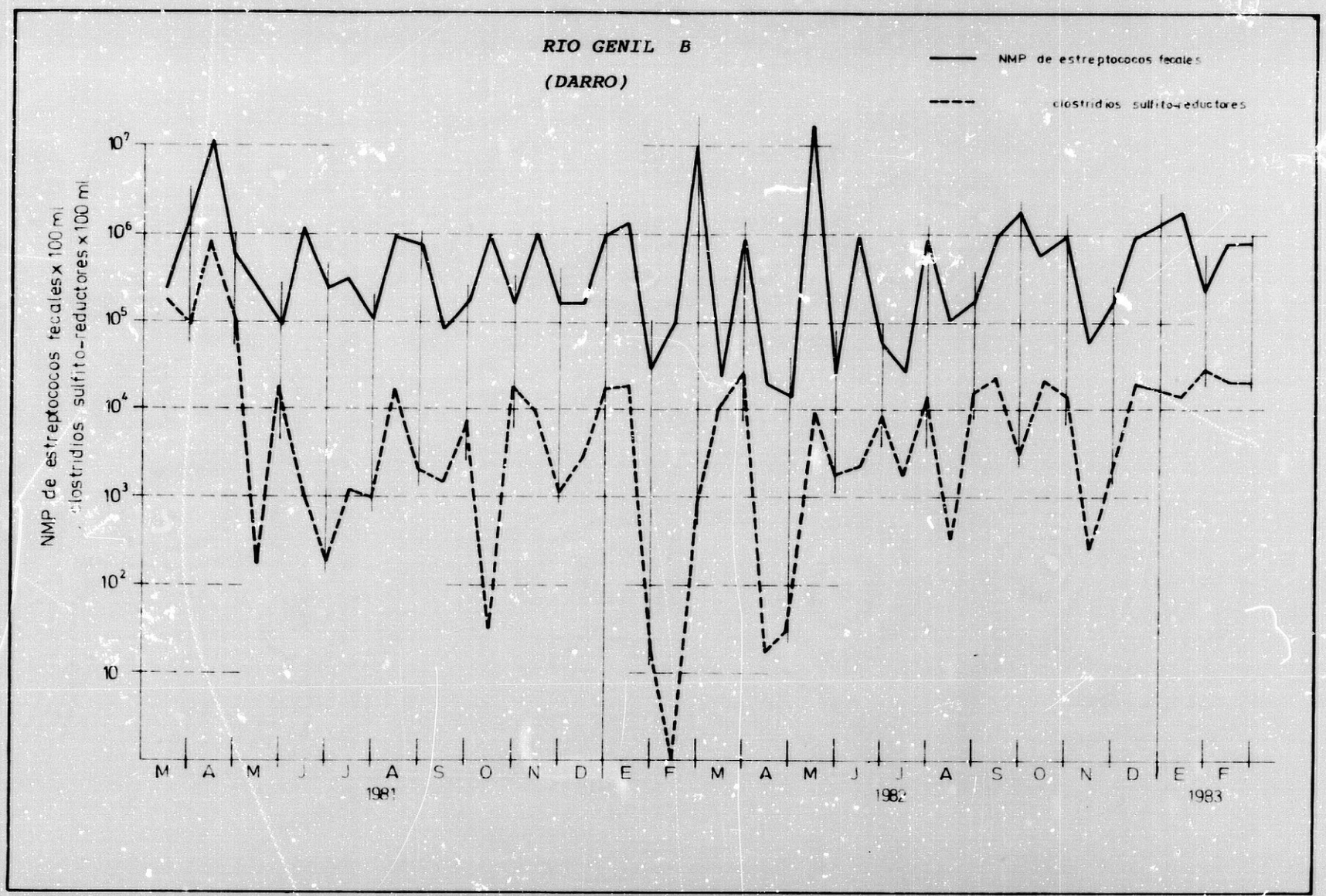


FIGURA 20 B .- RELACION NMP ESTREPTOCOCOS FECALES/CLOSTRIDIOS SULFITO-REDUCTORES EN EL RIO GENIL (punto de toma B).

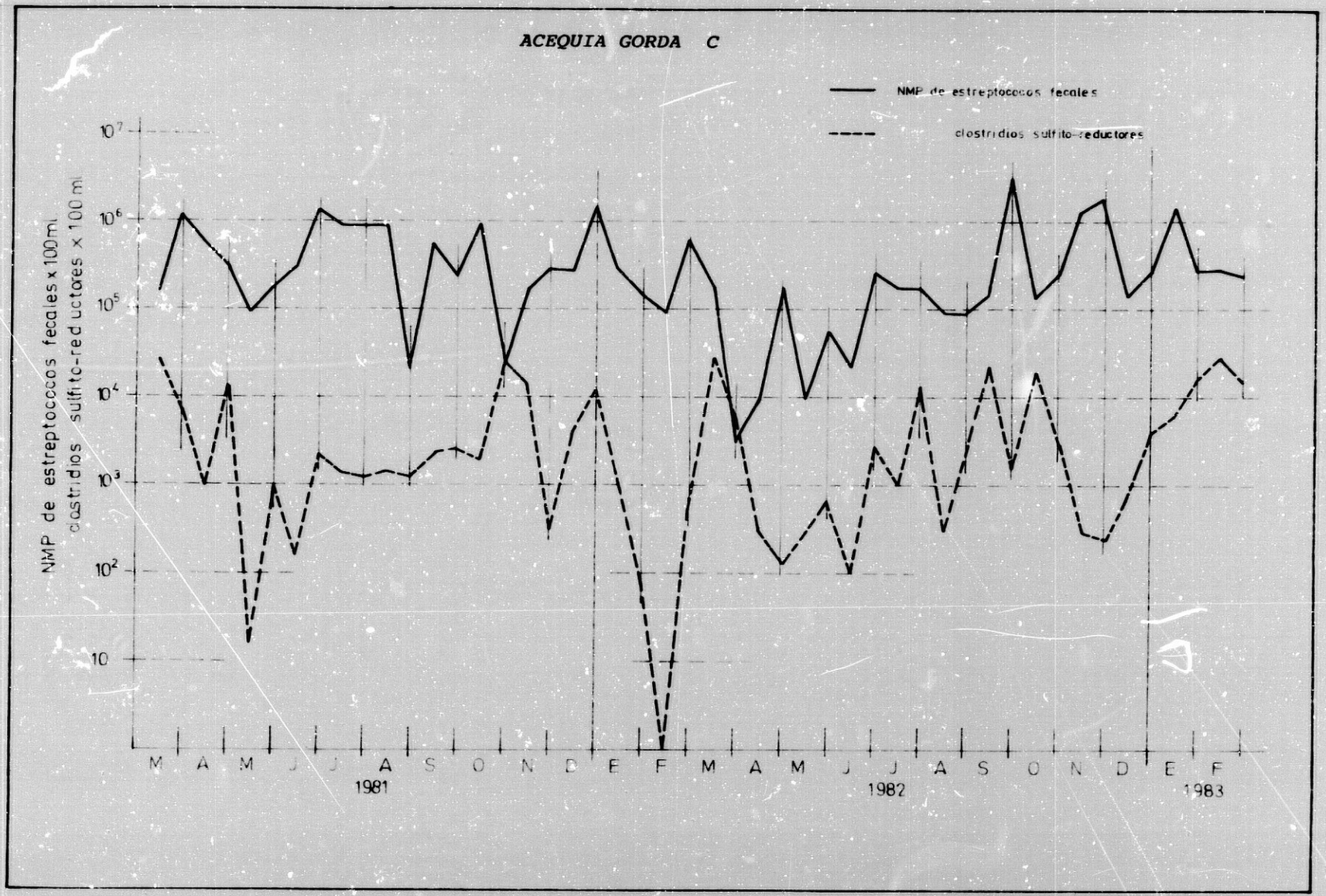


FIGURA 20 C *.- RELACION NMP ESTREPTOCOCOS FECALES/CLOSTRIDIOS SULFITO-REDUCTORES EN LA ACEQUIA GORDA (punto de toma C).*