

T
594
A 366a
1978
F. cc. y HH.

UES BIBLIOTECA CENTRAL 091273
INVENTARIO: 10123844
Ej. 2

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

ANALISIS BACTERIOLOGICO DE MUESTRAS DE "CONCHAS O "CURILES"
Anadara tuberculosa SOMERBY, COLECTADAS EN LA BAHIA DE JIQUI-
LISCO.

Trabajo de Graduación Para Optar al Grado de
Licenciado en Biología

Presentado por :
José Roberto Alegría Coto

Ciudad Universitaria,

San Salvador, Mayo de 1978.-



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

DECANO:

Ing. Rubén González Ojeda

SECRETARIO:

Lic. Raúl Vides Morán

ASESOR:

Lic. Krikor Barsegh Ghazarian

TRIBUNAL EXAMINADOR:

Lic. José Salvador Flores Guido

Lic. Krikor Barsegh Ghazarian

Dr. José Rutilio Quezada

DEDICATORIA

A mis padres :

José S. Alegría Chávez y Graciela Coto

José Alfredo Bracamonte y Dolores de Alegría.

A mis hijos :

Gilberto Alexander Alegría.

Xinia Ivette Alegría.

A mis hermanos :

Ana

Luis

Marielos

Silvia

Guadalupe

Mario

Carlos

A todos mis amigos

A todas las personas que siempre me han demostrado
su aprecio.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar sus agradecimientos al Lic. Krikor Barsegh Ghazarian por la asesoría proporcionada y por el constante estímulo para llevar a feliz término este trabajo. Al Ing. Joaquín Guevara Morán, ex-Director de la D.G.R.N.R. del M.A.G. por haber permitido utilizar equipo de campo de esa Dependencia. Al Lic. Juan Bautista Ulloa, por haber hecho posible la obtención de las muestras y proporcionar datos relacionados con los lugares muestreados. a los Señores José Heriberto Zavala y José Frasmoticas por la colaboración prestada en la colecta de muestras. Al Señor Daniel Arévalo y colaboradores del Almacén de Biología, por su interés en suplir el material de Laboratorio indispensable. Al Br. Guillermo Espinoza, y a mi hermana Silvia, por la valiosa ayuda prestada en el desarrollo del análisis bacteriológico de muestras. A la Señora Ana Vilma Calderón de Ayala, por haber hecho posible el conseguir bibliografía necesaria para el trabajo. Al Lic. José Wester del Cid, por haberme orientado en el desarrollo de los análisis estadísticos y quien al igual que el Lic. Mario Enrique Estrada, Lic. José Dionisio Velasco y Lic. Ernesto López Zepeda hicieron posible mejorar la redacción de este reporte. Al Señor Manuel Menéndez por haber tomado las fotografías necesarias. A la Señorita Martha Lillian Ramos por la fineza que tuvo al mecanografiar este trabajo. Al Lic. José Salvador Flores y al Dr. José Rutilio Quezada por sus acertadas observaciones hechas al trabajo, en su calidad de Jurados Examinadores. Finalmente quiero agradecer al Señor Luis Guillermo Guadrón por su dedicación en la reproducción del original y además a todas aquellas personas que con su colaboración hicieron posible la realización de este trabajo.-

RESUMEN

En diferentes sitios determinados al azar de la "Bahía de Jiquilisco", Usulután, República de El Salvador, se colectaron 14 -- muestras de "Concha" Anadara tuberculosa, Sowerby, en el período -- de Julio a Noviembre de 1976. Estas fueron examinadas bacterio-- lógicamente con el NMP de coliformes y el aislamiento de Salmonella y Shigella y los resultados obtenidos evidencian que las muestras analizadas no eran aptas para el consumo humano, ya que se encontró un NMP de coliformes superior al permitido por normas bacteriológi-- cas generalmente aceptadas y se aisló a distintos serotipos de Sal-- monella y Shigella, que son patógenos al hombre. Se considera -- que el origen principal de esta contaminación proviene de las aguas negras, que descarga directamente a la Bahía, el "Puerto El Triunfo". También contribuyen a la contaminación los diferentes ríos que en -- ella desembocan y diversos núcleos poblacionales que se encuentran alrededor de ellos y de ella. Además, las aves introducen mate-- ria fecal a esas aguas. Para eliminar de esta bahía la contamina-- ción con materia fecal de los alimentos que de ella se extraen se -- debe mejorar el abastecimiento de aguas y el saneamiento ambiental de la zona, así como instaurar por las municipalidades aledañas a la Bahía, un sistema de eliminación de excretas que evite la contamina-- ción de ella.

CONTENIDO

	<u>PAGINA</u>
I - Introducción	1
II - Objetivos	5
III- Revisión de Literatura.....	6
IV - Materiales y Métodos	9
A- Características Morfológicas de la Concha.....	9
B- Area de Muestreo.....	11
C- Establecimiento del Lugar de Muestreo.....	12
D- Fechas y Lugares de Muestreo.....	13
E- Traslado de Muestras al Laboratorio.....	13
F- Métodos Generales de Laboratorio.....	14
G- Tratamiento de la Muestra.....	14
H- Procesamiento de la Primera Fase.....	16
I- Procesamiento de la Segunda Fase.....	28
V - Resultados	34
VI - Discusión	48
VII- Conclusiones	68
VIII- Recomendaciones.....	71
IX - Referencias Bibliográficas	73
X - Apéndice	79
A- Figuras	80
B- Cuadros	89

I- INTRODUCCION

La ingestión de alimentos puede ocasionar alteraciones gastro-intestinales, las cuales se pueden deber a gula, alergias, deficiencias nutritivas, consumo de animales o plantas tóxicos, alimentos - contaminados por parásitos o microorganismos, etc.

Las enfermedades alimenticias causadas por contaminación microbiana pueden ser de dos tipos: a) Intoxicación ocasionada al ingerir alimentos en que se encuentren toxinas; y b) Infección determinada por invasión, multiplicación y alteraciones tisulares del huésped que producen los gérmenes transportados por los alimentos (Frazier, 1972).

Las intoxicaciones alimentarias que producen las bacterias se dividen en dos grupos fundamentales: 1) Botulismo determinado por la presencia en los alimentos de la toxina producida por Clostridium botulinum; y 2) Intoxicación estafilocócica producida por la toxina del Staphylococcus aureus (Frazier, 1972). Las infecciones alimentarias son también de dos tipos: 1) Aquellas en que los alimentos transportan los gérmenes patógenos (tuberculosis, disenterías, fiebre tifoidea, brucelosis, etc.); y 2) Aquellas en que los alimentos constituyen el medio de cultivo de los gérmenes patógenos, que al multiplicarse aumentan las posibilidades de infectar al consumidor (Frazier, 1972).

Aunque haya supervisión higiénica siempre existe riesgo de ingerir alimentos contaminados por gérmenes, riesgo que aumenta cuando se consumen alimentos sin cocción. En El Salvador uno de esos alimentos es la

carne de "Concha" o "Curil", Anadara tuberculosa Sowerby (Hernández y Calderón, 1974) el cual tiene un rango de distribución que va desde el Golfo de California a Perú (Morris, 1965). Es conocido comunmente como "Concha" por el hecho de poseer una cubierta dura que recibe ese nombre; en tanto que en los "bosques salados" o "pantanos de manglar" de nuestro país, en donde se colecta, los pescadores lo denominan con el nombre de "Curil", el cual taxonómicamente está comprendido dentro del Filo Mollusca, Clase Bivalvia o Pallecovoda, Sub-clase Lamelibranquia (Barnes, 1966) (Figs. 1, 2, 3 y 4).

Los "bosques salados" más importantes en nuestro país, en los cuales se reproduce la "Concha" son cinco (5), siendo ellos: "Barra de Santiago" en el Departamento de Chuacarán, "Estero de Jaltepeque" en el Departamento de La Paz, "Bahía de Jiquilisco" en el Departamento de Usulután, "Estero El Tamarindo" y "Bahía de La Unión" en el Departamento de La Unión (M.A.G. "Plan Racional de Manejo de los Manglares, 1972). (Fig. 5). La explotación comercial en forma artesanal de la "Concha" sólo ocurre en tres (3) de ellos: "Estero de Jaltepeque", "Bahía de Jiquilisco" y "Estero El Tamarindo" (M.A.G. Anuario Pesquero de El Salvador, 1972).

La importancia nutricional como alimento, estriba en su contenido de proteínas y gran variedad de carbohidratos y lípidos (Portillo, 1975)*. Se ha estimado que el consumo de seis (6) "Conchas" suministra más de -

* Mirna Enely Portillo, Depto. de Biología, Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad de El Salvador. Comunicación personal, 1975.

lo necesario en la dieta diaria de hierro y cobre, aproximadamente la mitad de yodo, un décimo de las proteínas, calcio, magnesio, fósforo, vitamina A, tiamina, riboflavina y niacina (Rodríguez y Fernández, -- 1968), así como flour y selenio (Scrimshaw y Young, 1976).

Su consumo en forma cruda se debe a que en esa forma se prepara un platillo típico de exquisito sabor, conocido como "Coctel de Conchas" al cual la creencia popular le atribuye propiedades afrodisíacas. La preparación de este "hocadillo" consiste, básicamente, en partir en pedazos el cuerpo del animal, incluyendo el tracto digestivo y sus líquidos corporales, agregar rábano, tomate y/o cebolla picados y adicionar jugo de limón y/o chile al gusto, aunque también se puede aderezar de diversas formas para ingerirla cocinada.

La contaminación microbiana de este alimento puede ocurrir en los procesos de expendio, por el equipo con el que se procesa o en los lugares en donde éste se produce debido a la forma en que este animal obtiene su alimento, ya que al hacer pasar por filtración grandes cantidades de agua a través de su cuerpo acumula en sus branquias partículas alimenticias y microorganismos procedentes del agua y del fondo, incluyendo patógenos, si los hay (Frazier, 1972).

Es importante que la calidad sanitaria del alimento que se consume sea tal que no afecte la salud del individuo, por lo que debe realizarse como primer paso, un examen bacteriológico para asegurar que el ali-

mento posee un mínimo de contaminación bacteriana y pueda conservar su buena calidad.

En este trabajo se pretende cuantificar la contaminación microbiana en muestras de "carne" y "líquidos" de "Concha" obtenidas en la "Bahía de Jiquilisco", mediante la densidad de bacterias coliformes, además se realiza una serie de ensayos bioquímicos y/o serológicos para detectar e identificar la presencia de bacterias productoras de toxinas o de infecciones.

II- OBJETIVOS

Al desarrollar este trabajo, se buscó cumplir con los siguientes objetivos :

- 1) Determinar mediante un muestreo adecuado de la "Bahía de Jiquilisco", lugar de captura y comercialización de "Conchas", el grado de contaminación microbiológica que puedan presentar estos moluscos.
- 2) Detectar la posible presencia de bacterias natógenas ya sea productoras de toxinas como Estafilococos y Clostridios, así como causantes de infecciones como Salmonellas y Shigellas.
- 3) Caracterizar la contaminación de las zonas de muestreo, mediante la cantidad de Coliformes encontrados por gramo de muestras de "Concha" analizada.

III- REVISION DE LITERATURA

Diversos investigadores han reportado en las carnes de moluscos, bacterias potencialmente patógenas que previamente habían sido encontradas en muestras de todo. Clostridium botulinum tipo E aislado - en el limo de la Bahía de Galveston, Texas (Hard and Carroll, 1965) y en la Bahía Mobile, se encontró en la ostra Crassostrea virginica - (Presnell et al, 1966). En ostras del Pacífico Crassostrea gigas se ha encontrado Coliformes, Pseudomonias y otras (Colwell and Liston, - 1959), en ostras del Pacífico de la zona norte se aisló Staphylococcus aureus (Rubio, 1967) y en ostiones consumidos en la ciudad de México, además de encontrarse un alto índice de Coliformes, se comprobó la presencia de enterococos hemolíticos (Rodríguez y Fernández, - 1968). En análisis bacteriológicos rutinarios de alimentos, realizados en Chile, se ha aislado incidentalmente en mariscos, a Salmonella paratyphi B., S. london y S. typhimurium (Cordano y Virgilio, - 1976).

The National Enteric Reference Center de Ottawa (Canadá), reporta 5000 casos anuales de Salmonellosis en humanos, siendo esto el 1% del total de casos, ya que estos pueden alcanzar la cifra de 500.000 (Van derpost and Bell, 1976).

En Riverside, California, se registró en 1966, una grave epidemia de diarrea por Salmonella typhimurium más de 15.000 casos producidos

por contaminación del abastecimiento público de agua profunda no clo-
rada. S. typhimurium también ha causado problemas en Uruguay, Argen-
tina y Brasil (De Araujo, 1975).

Durante 1969-1970 y 1971 se produjo en los países centromericanos
y México un brote de disentería bacilar por Shigella dysenteriae tipo I
(Martínez, 1973). Este brote epidémico se inició en Guatemala en 1969
se extendió hacia el sur al resto de Centro América sin afectar a Pana-
má y hacia el norte hasta México y Estados Unidos (Paniagua et al, 1976).
En nuestro país la epidemia surgió en Julio de 1969 y llegó a su máximo
en Julio de 1970 y luego descendió rápidamente a niveles casi endémicos
en 1973. Los casos registrados excedieron de 197.000, con unas 11.750
defunciones (Faich, 1974).

La Salmonella typhi provocó un brote de tifoidea en México en 1971
y 1972, el mayor registrado para ese país, que fue acompañado de una mor-
talidad elevada (Gangarosa, 1976) y que hasta principios de 1974 no ha-
bía desaparecido totalmente (De Araujo, 1975). En septiembre 8 de 1976
se publicó en el periódico salvadoreño "El Diario de Hoy" bajo el título
"150 casos de tifoidea en el Puerto El Triunfo" el hecho de la contami-
nación del agua potable de la bomba instalada en el "Pío Aguacayo", Jí-
quillisco, causando la epidemia de tifoidea en el puerto y lugares inme-
diatos.

Los microorganismos patógenos causantes de estas enfermedades gastrointestinales proceden de las heces humanas o animales (Burdon and Williams, 1971), cuyos medios de transmisión pueden ser el agua, los alimentos y la leche, las moscas y otros insectos, o bien el contacto directo (De Araujo, 1975).

El consumo de moluscos provenientes de aguas contaminadas es un serio riesgo en el modo de transmisión de la fiebre tifoidea (Sherwood y Thomson, 1963; *PS, Pub. Cienc.* 252, 1970). En diferentes países se han descrito brotes epidémicos de tifoidea, hepatitis infecciosa y casos de intoxicación por algas dinoflageladas, debido a la ingestión de moluscos bivalvos crudos, que procedían de aguas insalubres (Rodríguez y Fernández, 1968).

En un informe de investigación de la cátedra de Microbiología General, Departamento de Biología, primer ciclo, año académico 1975-76, M.E. Estrada y J.R. Alegría, reportan que muestras de "Concha" obtenidas en un mercado capitalino, resultaron altamente contaminadas por Coliformos y se les detectó la presencia de Shigellas y Salmonellas.

IV- MATERIALES Y METODOS

A- Características Morfológicas de la "Concha" :

Características de la cubierta

Esta recibe el nombre de Concha, tiene una longitud aproximada de 3.0 pulgadas y está compuesta por dos valvas articuladas por medio del ligamento articular de la charnela, el cual permite juntar las porciones dorsales de éstas y separar las ventrales (Stoner y Usinger, 1971). Cada valva está formada por tres capas, de afuera hacia adentro: el periostraco, oscuro, casi negro y con vellosidades, es de una sustancia orgánica, la conquiolina; la capa prismática de carbonato de calcio cristalizado y la capa interna de nácar o madreperla formada por muchas capas finas de carbonato de calcio (Hickman, 1967).

En una vista general de la superficie lateral externa de una valva, se distinguen: en posición dorsal y ligeramente interior una protuberancia llamada Umbo que corresponde a la parte más antigua, a su alrededor unas líneas concéntricas que son líneas de crecimiento (Barnes, 1969). Partiendo del Umbo en forma radial y siguiendo una línea dorso-ventral, hay aproximadamente 35 fuertes costillas, algunas de ellas con tubérculos redondeados, especialmente aquellas hacia el extremo anterior (Morris, 1966). (Fig. 1).



En una vista lateral de la cara interna de la valva se observa en la región dorsal y bajo el ligamento articular de la charnela, una serie de más de 50 dientes y alvéolos que encajan con los de la otra valva, lo cual impide el deslizamiento de éstas. Bajo esta serie de dientes y alvéolos en ambos extremos, se notan las impresiones de las inserciones musculares, lo mismo que en el borde de la concha una cicatriz llamada línea paleal (Fig.2).

Al separar las valvas se aprecia que el cuerpo se encuentra en cerrado en un manto de dos lóbulos; el manto es una gran lámina de tejido, que se inserta en la línea paleal, capaz de secretar la concha, además posee función sensorial. El cuerpo está formado por una masa visceral fija dorsalmente y que contiene varios órganos; su parte antero-ventral forma el pie muscular, que como el resto del cuerpo está comprimido lateralmente, de aquí el origen del nombre para esta clase Pelecypoda, pie en hacha (Barnes, 1969). A cada lado de éste se encuentran los palpos, que son laminillas que tienen la función de transporte y clasificación de partículas alimenticias (Barnes, 1969), fijas en la base del pie y adosadas a cada palpo está una grande y delgada branquia doble, que posee la función de acumular alimentos, además de la respiratoria y en la parte dorsal, en ambos extremos dos grandes músculos llamados aductores con función de cerrar las valvas (Storer y Usinger, 1971)(Figs.3 y 4).

B- Area de Muestreo:

La muestra de "Concha" a analizar se obtuvo en la "Bahía de Jiquilisco", estero de la costa salvadoreña, ubicado a 13°10'-13°18' Latitud N. y 88°13'-88°44' Longitud W., entre las desembocaduras del Río Lempa y del Río Grande de San Miguel en un área de 121.2 Km², y una zona de 15.500 ha. de "bosque salados" (I.A.G. "Plan Racional de Manejo en los Manglares", 1972).

Según H.G. Gianloff-Emden, presenta un canal principal con una longitud de 30 km. en el cual una estrecha de 3 km. de ancho y más de 10 mts. de profundidad atraviesan el canal principal desde la bocana en forma sinuosa, con una corriente de saliente que alcanza velocidades de 3 a 4 km. por hora. Los canales laterales presentan un curso sinuoso con lazos casi en forma de meandros con fuertes corrientes excavantes que oscilan. Partiendo de las últimas finas ramificaciones, el radio de lazo y la anchura del canal aumentan tan uniformemente que la línea de unión de las orillas exteriores de lazos, desde el principio hasta la bocana, se parece a una forma de trompeta. Como ejemplo se mencionan el "Estero El Cementerio" en la parte noroeste del canal principal, así como también el largo canal del "Estero Ceiba Doblada", que separa la "Isla Espíritu Santo" de la gran lengua de tierra. Estas condiciones, regulares para estas zonas, señalan una influencia hidrográfica común.

Las muestras recogidas en el caserío de Isla de Méndez fueron colectadas en estas regiones.

Existen otros canales en la parte sur del canal principal que no ajustan con la imagen anterior como son el gran canal oscilante alrededor de las Islas Madrosal, San Dionisio y Santa Catarina, lo cual indica que estos canales están sujetos a otro tipo de corrientes. Las muestras del caserío de "Rancho Viejo" se obtuvieron - muchas veces de esos lugares, debido a su cercanía con ellos.

C- Establecimiento del Lugar de Muestreo:

Se escogió la "Bahía de Jiquilisco" debido a las facilidades - que prestaba el Servicio de Recursos Pesqueros del Ministerio de Agricultura y Ganadería por medio del personal destacado en el "Puer^{to} El Triunfo", quienes proporcionaron lancha de motor para movili- zarse a través de la Bahía hacia los caseríos de "Isla de Méndez" y "Rancho Viejo" en donde los colectores de Producción Pesquera de la Dirección General de Recursos Naturales Renovables del Ministerio - de Agricultura y Ganadería, se encargaban de conseguir la muestra - de estudio, el día que se llamaba por ella, la cual era tomada al razar, sin conocimiento previo del lugar que iba a ser muestreado, por los "curileros" (capturadores de "Conchas"), de dichos caseríos.

D- Fechas y Lugares de Muestreo:

Se tomaron muestras de "Conchas", desde el mes de Julio hasta Noviembre de 1976, según el siguiente detalle :

Muestra Número	Fecha	Procedencia	Lugar
1	26 de Julio	"Isla El Manglar"	(IM)
2	27 de Julio	"Isla Pájarito"	(RV)
3	12 de Agosto	"Tres Enganches"	(IM)
4	17 de Agosto	"La Caramba"	(RV)
5	25 de Agosto	"Guayabo"	(IM)
6	8 de Septiembre	"Pelota de Limón"	(IM)
7	8 de Septiembre	"Rincón Grande"	(RV)
8	22 de Septiembre	"El Guayabón"	(RV)
9	8 de Octubre	"Isla de Méndez"	(IM)
10	6 de Octubre	"Canal del Chile"	(RV)
11	22 de Octubre	"La Venadona"	(IM)
12	22 de Octubre	"Rinconada"	(RV)
13	10 de Noviembre	"El Potrero"	(IM)
14	10 de Noviembre	"Rancho Viejo"	(RV)

IM= Isla de Méndez.

RV = Rancho Viejo.

E- Traslado de Muestras al Laboratorio :

En cada caserío, se obtuvieron muestras de 30 "Conchas", se colocaron en recipientes individuales que se marcaron para su debida identificación, dentro de cada recipiente se depositó una tarjeta con el nombre del lugar de procedencia de la muestra, éstas se transportaron aproximadamente a -- 10°C, pero nunca en contacto directo con el hielo(según lo recomendado por APHA, 1962).

F- Métodos Generales de Laboratorio

En las diferentes pruebas se siguen las instrucciones básicas del American Public Health Association. Para facilitar el trabajo de laboratorio este se divide en dos fases, la primera fase consiste en aplicar a las diferentes muestras la metodología para : a) Recuento total de bacterias, b) Coliformes y su número más probable (NMP) por gramo de muestra, usando la técnica de tubos múltiples de fermentación, c) Presencia de estafilococos coagulasa positivos, d) Presencia de clostridios (Fig. 7) y la segunda fase la de e) Presencia y diferenciación de Salmonellas y Shigellas (Fig. 9).

G- Tratamiento de la muestra :

Para su examen, las muestras se sometieron al análisis 12 horas después de su colecta y en ningún caso después de 30 horas (según APHA, 1962). Para el análisis bacteriológico total de cada muestra, se usó un promedio de 16 "Conchas" las cuales debían tener las valvas bien cerradas (según Rodríguez y Fernández, 1968). Se procedió a lavar la cubierta externa de cada "Concha" con agua destilada, usando un alambre de fregar (nuevo) para quitar el lodo que mantienen cerca del ligamento articular de la charnela y entre las costillas, especialmente en los bordes de la parte ventral de las valvas. La cubierta así tratada se

frotó con alcohol etílico de 70%, se lavó con agua destilada estéril y se secó con gasa estéril.

Para la extracción del contenido de las "Conchas" es necesario lavarse las manos con agua y jabón suficientes y con alcohol etílico de 70%. Las valvas se abrieron con un "abreconchas", aparato comercial usado en los expendios de este alimento, el cual previamente se trató con fenol al 4% y alcohol etílico de 70% (Linch et al, 1972), se lavó con agua destilada estéril y se secó con gasa estéril. El cuerpo (manto y líquido contenido en él, masa viscosa, pie, branquias, palpos y órganos internos), se extrajo con un cuchillo estéril y se depositó junto con el líquido interno, en un recipiente estéril de boca ancha que se cubrió con papel de aluminio, no se usó el líquido que caía fuera de las valvas.

Para las diferentes experiencias de cada muestra se empleó un total de 110 gramos de su carne y líquidos, pero se obtuvo como mínimo, un volumen correspondiente a un peso no menor de 200 gramos (Rodríguez y Fernández, 1968). Los 110 gramos que se usan se repartieron en cuatro beakers estériles de 50 ml. cubiertos con papel de aluminio. En un beaker se pasaron 50 gramos que se usaron inmediatamente en los análisis de la primera fase, en los otros tres beakers se pasaron 60 gramos, repartidos en cantidades de 25, 25 y 10 gramos, para la investigación de la segunda fase, los cuales se conservaron en refrigeración entre 0° y 10°C hasta su examen.

II- Procesamiento de la primera fase

H.1- Preparación de medios de cultivo

Se trabajó en condiciones asépticas en el laboratorio, y se siguieron las indicaciones de los fabricantes de los medios de cultivo en la hidratación y esterilización de todos ellos. Para la primera fase se prepararon los siguientes medios de cultivo - (Apéndice, Cuadro 1) :

- 1- Tres tubos de ensayo marcados como tubos A, B y C conteniendo respectivamente 9.9 de Buffer de Fosfato monobásico de potasio, KH_2PO_4 , ajustado a pH de 7.2 (APHA, 1963), para realizar las diluciones de la muestra que se usan en todas las experiencias de la primera fase.
- 2- Ocho cajas de petri estériles (desechables), rotuladas cada dos cajas de petri indicando las diluciones $0.1 (10^{-1})$, $0.01 (10^{-2})$, $0.001 (10^{-3})$, y una más como testigo. En un erlenmeyer de 500 ml. se esterilizan 180 ml. de Plate Count Agar - (PCA) Difco, para llenar las cajas de petri anteriores, al momento del inóculo, para lograr la determinación preponderante del número total de bacterias en productos alimenticios (Merck, Art. número 5463).

- 3- Diez tubos de ensayo con su respectivo tapón de algodón absorbente, con 10 ml. de Laurisulfato de Bouillon (LSB), Merck, cada uno con un tubo Durham en su interior, para realizar la prueba de tubos múltiples de fermentación (APHA, 1963). Se esterilizó y en series de tres tubos se rotulan con $0.1 (10^{-1})$, $0.01 (10^{-2})$, $0.001 (10^{-3})$ y uno como testigo.
- 4- Nueve cajas de petri, cada una con 20 ml. de agar selectivo para Staphylococcus según Vogel-Johnson (VJA), 39L, más 2.0 ml. de Telurito de Potasio al 1% por cada 100 ml. de VJA, preparado para lograr el crecimiento de estafilococos coagulasa positivos (Merck, Art. número 5405). Antes de llenar las cajas de petri, el VJA previamente esterilizado, se licúa y en baño de maría se enfría a temperatura de 43° a 45°C para agregar el Telurito de Potasio, el cual se distribuyó en todo el medio por acción de movimientos rotatorios del recipiente. Cada dos cajas de petri con VJA se rotularon a $0.1 (10^{-1})$, $0.01 (10^{-2})$, $0.001 (10^{-3})$, $0.0001 (10^{-4})$ y un. como testigo.
- 5- Nueve cajas de petri, cada una con 20 ml. de agar anaerobio - Brewer (BA4), Difco, para lograr el crecimiento de Clostridias (Merck, Art. número 5452).

El BAA previamente esterilizado, se licuó y en baño de maría se enfrió a temperatura de 43° a 45°C para distribuirlo en las diferentes cajas de petri, rótuladas por pares 0.1 (10^{-1}), 0.01 (10^{-2}), 0.001 (10^{-3}), 0.0001 (10^{-4}) y la novena como testigo.

6- Pipetas de 10, 5 y 1 ml. de capacidad con sus respectivas puntas intactas, graduaciones fácilmente perceptibles y protegidas las boquillas con tapones de algodón. Se esterilizaron a 170°C por 2 horas en pipeteros de aluminio, poniendo en cada uno de ellos pipetas de la misma graduación.

H.2- Triturado y dilución de la muestra

Se preparó la dilución inicial 1:10 (10^{-1}), homogenizando 50 gr. de carne y líquidos de "Concha", con 450 ml. de diluyente estéril de fósforo monobásico de potasio, KH_2PO_4 , ajustado a pH 7.2 con lo cual se obtiene una dilución inicial de 1:10 (10^{-1}).

Previamente se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión y temperatura de 121°C, el vaso de vidrio de una licuadora envuelto en un papel tipo kraft, con sus correspondientes cuchillas y tapadera.

Se agitó totalmente con la trituradora la muestra diluida inicial de 1:10. Con una pipeta estéril de 5.0 ml. se pipeteó

en forma invertida (para evitar que partículas sólidas taponeen - las puntas de las pipetas) y se trasvasó 1.0 ml. al tubo "A" que contenía 9.0 ml. del Buffer para lograr una dilución de 1:100 (10^{-2}). Después de agitar vigorosamente la dilución del tubo A, se toma con una pipeta estéril de 5.0 ml. en forma invertida, 1.0 ml. y se -- trasvasa al tubo "B" que contiene 9.0 ml. de Buffer, para lograr una dilución de 1: 1000 (10^{-3}), este tubo "B" se agitó vigorosa-- mente por 25 veces y se toma con una pipeta estéril y en posición normal, 1.0 ml. de esa dilución y se mezcla con los 9.0 ml. de Bu-- ffer del tubo "C" para obtener una dilución de 1:10000 (10^{-4}), -- (Fig. 7).

H.3- Inoculación de material

La inoculación del material se realizó a partir de las 4 di-- luciones anteriores, se dejó sin inocular todos los medios de cul-- tivo rotulados como testigo. Se usó en forma invertida una pi-- peta estéril de 10 ml. y se trasvasó a cada uno de los diferentes medios de cultivo rotulados como 0.1 (10^{-1}), 1.0 ml. de la dilu-- ción inicial de 10^{-1} . Con pipetas estériles de 10 ml. usando pipetas diferentes para cada dilución y en posición normal, se -- trasvasó de los tubos "A", "B" y "C" con diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} y

10^{-4} respectivamente, 1 ml. a los medios de cultivo rotulados con dichas diluciones. Para realizar la inoculación de este material se deben seguir las siguientes indicaciones: la tapa de la caja de petri apenas se debe levantar para la introducción de la pipeta o del medio de cultivo y se deben flamear los labios de los tubos o matraces que se usan para ventar el medio. El medio y la muestra contenidos en la caja de petri, se deben mezclar perfectamente y distribuir de modo uniforme en el fondo de las cajas, bien sea por rotación o inclinándolo en forma conveniente o haciendo uso de una varilla curvada. Todas las placas se deben solidificar rápidamente como sea posible y se colocan inmediatamente en forma invertida en la incubadora a la temperatura apropiada.

H.4- Recuento total

No deben transcurrir más de 20 minutos entre la siembra de la muestra y el vertido del medio en el caso del PCA para el Recuento Total, (APHA, 1963). La incubación de las placas de petri se llevó a una temperatura de $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ por 72 ± 2 horas. Para contar las colonias se hizo uso del contador de colonias Quebec, tomando en consideración sólo aquellas placas que presentaron entre 30 y 300 colonias. Los resultados que se registraron son el promedio

de todas las placas que se siembran con el mismo volumen o dilución. Para evitar una exactitud ficticia, y para expresar los resultados numericos por un método que se ajuste a la precisión de la técnica empleada, el número de bacterias se aproxima para que tuviera solamente dos cifras significativas. Estos datos se designan como "cuenta normal en placa a 35°C" (APHA, 1963).

H.5- Coliformes

Prueba presuntiva (Técnica de tubos múltiples)

Los tubos de fermentación primaria (tubos con LSR), se incubaron a $35^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Cada tubo se examinó al cabo de 24 ± 2 horas, y si no se produjo gas, se examinaron nuevamente al cabo de 24 ± 1 hora (Fig. 3). En cada examen se registró la presencia o ausencia de gas. La formación de cualquier cantidad de gas en el tubo Durham, dentro de 48 ± 3 horas, constituye una prueba positiva, la ausencia de formación de gas al término de ese tiempo constituye una prueba negativa. El número del grupo de bacterias coliformes se expresa como el número más probable de coliformes (NMP), el cual se determina mediante la tabla del NMP y límites de confianza del 95% para diversas combinaciones de resultados positivos (apéndice, cuadro 9) (APHA, 1963).

Prueba confirmada

Se prepararon 7 tubos de ensayo, cada uno con un tubo Durham y 6 ml. de caldo-verde brillante-bilis-lactosa (BRILA) Merck y 7 tubos de ensayo, cada uno con un tubo Durham y 6 ml. de EC Medium (EC Medium) Difco, para realizar un ensayo adicional en búsqueda de Coliformes usando la técnica de la temperatura para detectar la presencia de Escherichia coli que es - un organismo que proviene de heces de animales de sangre caliente y sólo se desarrolla a 44.5°C lo cual no hacen organismos de otra procedencia - (Difco, 1953; Geldrich, 1964; Burdon and William, 1971).

Procedimiento

Se escogieron tres tubos positivos de las diluciones mayores de LSB, para fermentación primaria. Cada tubo de LSB se agitó cuidadosamente an tes de inocular con un asa de platino de 3 mm. de diámetro mediante 3 asa das con cada uno de ellos, 2 tubos de BRILA y 2 de EC Medium; en total se inocularon 6 tubos de BRILA y 6 de EC Medium; quedando un tubo de cada uno de estos dos medios sin inocular, como control (APHA, 1963). Los tubos de BRILA se incubaron a $35^{\circ}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, durante 48 ± 3 horas como máximo y sirvieron para investigar la fermentación de lactosa con producción de gas como índice de presencia de coliformes (Merck, art. núm.5454; Difco, - 1953). Los tubos de EC Medium se incubaron en Baño de María a $44.5^{\circ}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 48 ± 3 horas (Difco, 1953).

Con cada uno de los tubos de BRILA positivos se inoculó en estrías, una placa conteniendo Agar-eosina-azul de metileno (EMB) Difco, para lo cual se empleó una aguja de inoculación ligeramente curvada en su extremo; se inclinó el tubo de BRILA para evitar que la aguja tomara la membrana sobrenadante; se sumergió el extremo de la aguja en el líquido del tubo, hasta una profundidad aproximada de 5.0 mm. se inoculó la placa y se incubó en forma invertida a $35.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ por 24 horas \pm 2 horas.

Las colonias que se desarrollaron en la placa de EMB se tipificaron como :

- a) Colonias coliformes típicas; nucleadas con o sin brillo metálico verdoso en luz reflejada, centro negro azulado en luz refractada o mucosas confluentes, centro pardo-grisáceo en luz refractada;
- b) Colonias atípicas: opacas, anucleadas, mucoides después de 24 horas de incubación, de color rosa; y
- c) Colonias negativas: todas las restantes (APHA, 1963; Merck, art.núm. - 1347; Stanley, 1971).

Un resultado positivo se considera la aparición de colonias típicas dentro del período de incubación de 24 ± 2 horas; la formación de solo colonias atípicas, no se considera como negativo, puesto que algunos organismos coliformes no llegan a formar colonias típicas en las placas de EMB; se considera negativo sólo si no se presentan colonias o se tienen colonias de tipo no coliforme (APHA, 1963).

Prueba Completa

Haciendo uso de un contador de colonias (Quebec), se escogieron de las placas de EMB Agar, colonias típicas y atípicas que se encuentran aisladas y separadas entre sí cuando menos 0.5 cms.; cada colonia se identificó por un número y se inoculó en un tubo de LSB con tubo Durham en su interior para investigar fermentación secundaria de lactosa y en un tubo con Nutrient Agar (Agar Nutritivo) Difco en superficie inclinada, para lograr el crecimiento de la colonia (APHA, 1963; Difco, 1953; Merck, art. - núm. 5450). Tanto el tubo de LSB como el de Agar Nutritivo se marcaron con el número de la colonia. Todos los tubos de LSB de fermentación secundaria como los de Agar Nutritivo inclinados, inoculados, se incubaron a $35^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, durante 48 ± 3 horas. Si hay formación de gas en el tubo de fermentación, la prueba es positiva. Los tubos de Agar Nutritivo inclinado que correspondieron a los resultados positivos con LSB se usaron para hacer frotis bacterianos teñidos mediante la Tinción de Gram (Apéndice, Cuadro 4).

Ensayo Diferencial

Las colonias aisladas que crecieron en Agar Nutritivo y que correspondieron a resultados positivos de LSB de fermentación secundaria, se usaron para inocular los medios según el ensayo diferencial de IMVIC, palabra ne-

metécnica que significa las siguientes pruebas : I = Indol, M = Rojo de Metilo, Vi = Reacción de Voges-Proskauer, C = Citrato (Carpenter,1969).

1- Prueba de Indol: consiste en la producción de Indol a partir de Peptona.

Se utilizaron tubos de ensayo, cada uno con 6 ml. de Bacto Triptone (Caldo de Triptofano) Difco, se inoculó una colonia en cada tubo y se incubó a $35^{\circ}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas, después de este tiempo se añadió a cada tubo 0.3 ml. de reactivo de Kovac (Apéndice, Cuadro 5), en donde el color rojo oscuro en la capa superficial del medio es una prueba positiva, ningún cambio en el color original del reactivo, la prueba es negativa; si reacciona tomando un color anaranjado, indica la presencia de Escatol (producto de la degradación del Triptofano - que junto con el Indol le dan el olor a las heces) (Gebhardt, 1972), y se toma como reacción ambigua.

2- Reacción de Voges-Proskauer: consiste en la producción de Acetil Metil Carbinol por la bacteria; y 3- Prueba de Rojo de Metilo: consiste en la producción de ácido suficiente a partir de glucosa para presentar reacción ácida con Rojo de Metilo.

Se usarán tubos de ensayo, cada uno con 6 ml. de caldo de Rojo de Metilo según Voges y Proskauer (MR-VP) BBL y se inocularon dos tubos -

de MR-VP con la misma colonia. Un tubo de cultivo, el correspondiente a la prueba de la Reacción de Voges y Proskauer, se incubó a $35^{\circ} \pm 0.5^{\circ} \text{C}$, por 48 ± 3 horas, y luego a 1 ml. de cultivo se le agregó 0.6 ml. de solución de 2% Naftol y 0.2 ml. de solución de KOH (Apéndice, Cuadro 5), se agitó el tubo de ensayo, el color rojo o carmesí indica positivo, la reacción se observó a los 15 minutos, pero se esperó hasta 4 horas para dar por negativo el resultado. El otro tubo correspondiente a la prueba de Rojo de Metilo. Se incubó también a $35^{\circ} \pm 0.5^{\circ} \text{C}$ por 5 días, después de agregaron 6 gotas de solución indicadora de Rojo de Metilo (Apéndice, Cuadro 5), el color rojo denota un resultado positivo; el naranja uno negativo (Merck, art. núm. 5712).

- 4- Prueba del Citrato : consiste en la utilización del Citrato como única fuente de Carbono.

Se utilizaron tubos de ensayo con 6 ml. de Caldo-Citrato según KOSER (CK) Difco; en cada tubo se inculó una colonia diferente, se incubó a $35^{\circ} \pm 0.5^{\circ} \text{C}$ por 4 días como máximo para observar crecimiento, el cual se hace notable por una turbidez del medio de cultivo (Merck, art. núm. 2500).

Clasificación de Coliformes

La clasificación de Coliformos se hizo de acuerdo a los resultados obtenidos en las reacciones bioquímicas del ensayo diferencial, por medio del siguiente cuadro (Corn Refiners Association, Inc. 1971) :

	Indol	Rojo de Metilo	Voges Proskauer	Citrato	Tipo
<u>E. coli</u>	+	+	-	-	<u>E.coli</u> típica
	-	+	-	-	<u>E.coli</u> atípica
<u>E. freundii</u>	+	+	-	+	Intermedia típica
(Citrobacter)	-	+	-	+	Intermedia atípica
<u>A.aerógenes</u>	-	-	+	+	Típica
	<u>+</u>	<u>+</u>	+	<u>+</u>	Atípica

H.b- Determinación de Estafilococos coagulasa positivos

Las placas de petri con VJA más Telurito de Potasio, se usan para comprobar la presencia de bacterias patógenas, ya que éstas son capaces de reducir el Telurito y fermentar la manita del medio, formando colonias negras, las cuales se ha comprobado en un 98% por Vogel y Johnson, son de estafilococos coagulasa-positivos (Merck, art. núm. 5405). Estas pla

de VJA se incubaron a una temperatura de $35^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 72 ± 3 horas. se investigó en las diferentes placas de petri conteniendo diferentes diluciones el respectivo crecimiento y su número más probable por gramo de muestra (NMP) (APHA, 1963). Se consideraron como colonias típicas de estafilococos las colonias pequeñas de color negro con halo amarillo o las de color negro grisáceo sin halo. A las colonias aisladas, para su identificación definitiva se les realiza la tinción de Gram y la prueba de la coagulasa (Apéndice, Cuadros 3 y 4).

H.7- Determinación de Clostridios

Las placas de petri con BAA se usan para lograr el crecimiento en condiciones anaeróbicas de clostridios por medio de una cámara de CO_2 a la cual se le introduce gas carbonico. Se buscaron colonias típicas: colonias que decoloran el medio y con olor característico o podrido (Ghazarian, comunicación personal)* y se les hizo la tinción de Gram (Apéndice, Cuadro 4).

I- Procesamiento de la Segunda Fase

I.1- Preparación de material

Se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión y 121°C de temperatura tres vasos de vidrio de licuadora con

* Ghazarian, K.B. Profesor de Microbiología, Depto. de Biología, Fac. de -
Ciencias y Humanidades, Universidad de El Salvador, 1977.

sus respectivas cuchillas y tapaderas, cada vaso envuelto en papel tipo kraft. Se esterilizó en estufa por 2 horas a 170°C de temperatura tres botes de vidrio de 500 ml. de capacidad con sus correspondientes tapaderas.

Se prepararon los siguientes medios de enriquecimiento para Salmonella y Shigella (Elliot, 1966; Lewis y Angelotti, 1964) :

1) 225 ml. de Caldo de enriquecimiento Selenito-Cistina (Caldo SC) (Difco), 2) 225 ml. de Caldo de enriquecimiento tetratio-nato-verde brillante-bilis (TBG) (Apéndice, Cuadro 6), 3) 240 ml. de Caldo de enriquecimiento para Gran Negativos (GN) BBL.

Para lograr el aislamiento de Salmonellas y Shigellas, se prepararon los siguientes medios de cultivo selectivos (Lewis y Angelotti, 1964; Elliot, 1966; Taylor y Shelhart, 1968), 1) Agar verde brillante (BG Agar) Difco, 2) Salmonella-Shigella Agar (SS Agar) Difco, 3) Sulfato de Bismuto Agar (BS Agar) Difco, 4) Agar-Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) Difco, 5) Agar-Desoxicolato Lactosa (DC Agar) Difco, y 6) Agar-Eosina-Azul de Metileno (EMB) Difco. Con cada uno de los diferentes medios de cultivo selectivo, se prepararon diez cajas de petri con 16 ml. de medio de cultivo cada una, para análisis de cada par de muestras, además se utilizaron 30 tubos de ensayo, cada uno con 15 ml. de Agar-Hierro-Tres-Azúcares (TSI) Difco, en superficie inclinada, co

mo medio de cultivo de diferenciación bioquímica, para identificación de bacterias gram-negativas patógenas (Merck, art. núm. - 3915; Elliot, 1966).

I.2- Triturado de la muestra

En una licuadora comercial con tres diferentes vasos y sus respectivas tapaderas y cuchillos estériles, se homogenizó en condiciones asépticas, por dos minutos y a su máxima velocidad 25 gr. de carne y 10 gr. de líquidos de "Concha" previamente pesada y refrigerada, con 225 ml. de Caldo SC, 225 ml. de TBG y 240 ml. de GN, respectivamente para completar con cada uno de ellos 250 ml. de homogenizado, los cuales se trasvasaron a botes estériles de 500 ml. y se incubaron a temperatura de $35.5^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas.

I.3- Inoculación de material

La inoculación de las cajas de petri con los diferentes medios de cultivos selectivos se hizo en condiciones asépticas por medio de un asa de platino de 3 mm. de diámetro, procurando no llevar sobrenadante. Antes de inocular, se agitó por rotación cada uno de los diferentes botes con los caldos.

Con el caldo SC se inocularon 2 cajas de petri de cada uno de los siguientes medios de cultivos selectivos : BG Agar, SS, Agar,

BS Agar, XLD, DC Agar y EMB. Con el TBG dos cajas de petri de -
BG Agar, SS Agar y BS Agar. Con el GN dos de XLD, DC Agar y --
EMB (Fig. 9). Se deja una caja de petri de cada uno de los di-
ferentes medios de cultivo, sin inocular como testigo. Todas
las cajas de petri inoculadas más los testigos se incubaron en for-
ma invertida a temperatura de $35^{\circ}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas, con -
excepción de BS Agar y XLD que se incubaron por 24 horas más. En
cada una de las placas de petri, se buscó colonias características
(Apéndice, Cuadro 7).

I.4.- Prueba Bioquímica :

Consiste en el uso de un medio de cultivo de diferenciación
que contiene : Agar-Hierro-Tres azúcares (TSI), en el cual las di-
ferentes reacciones bioquímicas sirven para identificar bacterias
gram negativas patógenas.

Cada una de las colonias típicas encontradas en las cajas de
petri se numeraron e inocularon con aguja de platino en tubos de
ensayo con TSI de superficie inclinada, tanto por picadura del me-
dio en la parte columnar hasta el fondo del tubo, teniendo cuidado
que el trayecto de salida de la aguja sea el mismo que el de entra-
da; como por frotis en estrías en la superficie inclinada. Estos
tubos se incubaron a temperatura de $35^{\circ}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas.
Los resultados obtenidos se comparan con el cuadro 8 del Apéndice.

I.5- Prueba Serológica

Cada una de las colonias identificadas por la prueba bioquímica como Salmonella o Shigella se sometieron al análisis antigénico, usando antisueros polivalentes y monoespecíficos para su identificación complementaria y efectiva (Buchanan and Gibbons, 1974; Edwards and Ewing, 1972).

I.6- Identificación de Salmonella

Con un lápiz grueso se marcó una división al centro de un portaobjetos. Se preparó una suspensión de la bacteria a identificar en solución de NaCl 0.85% estéril, a partir del crecimiento en TSI. La suspensión tuvo apariencia lechosa.

Se usó una gota de antisuero Polv A-I (Difco) o de uno de los sueros monoespecíficos para Salmonella en una sección del portaobjetos, se añadió una gota de suspensión bacteriana al antisuero y otra en la parte libre (control). Se mezcló el contenido en cada uno de los lados usando palillos de madera. Se inclinó la placa alternativamente por un minuto. Se buscó reacción positiva mediante la observación de aglutinación, ésta se manifiesta con gránulos finos o con agregados grandes. El control y las pruebas negativas muestran turbidez homogénea solamente. Cuando la prueba no presentó aglutinación se calentó la suspensión en agua hirviendo durante 30 minutos, se dejó enfriar y se repitió la prueba.

I.7- Identificación de Shigella:

Se usa un juego de antisueros (Difco), que contiene Poly grupos A, A₁, B, C, C₁, C₂, D y Poly alkalescens-Dispar. Se marcó un portaobjetos y se preparó la suspensión bacteriana en solución salina. Se colocó antisuero en un sector del portaobjetos y se añadió una gota de suspensión bacteriana al antisuero y otra en la parte libre (control), se mezcló el contenido de ambos lados, se agitó la preparación por 1 ó 2 minutos. La aglutinación positiva fue completa y rápida.

Si la aglutinación no ocurrió usando Bacto-Shigella antisuero Poly grupo D, se procedió a los Poly grupos A, A₁, B, C₁, C₂ y al antisuero Poly Alkalescens-dispar.

V - RESULTADOS

Fase I:

En el cuadro 1, se detallan los resultados de las catorce muestras analizadas, según los literales de materiales y métodos:

- a) Recuento total de bacterias por gramo de muestra.
- b) Técnica de tubos múltiples en la búsqueda de coliformes por gramo de muestra con la respectiva delimitación del MP y siempre en b, Técnica de EC Medium a temperatura de $44.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ para la determinación de coliformes provenientes del intestino de animales de sangre caliente.

En la primera parte del cuadro se anotaron los resultados del Recuento Total de bacterias por gramo de muestra expresados en números elevados a la potencia 10. Seguidamente se anotaron los resultados de la técnica de tubos múltiples, en los cuales el numerador indica las veces que se obtuvo resultados positivos y el denominador el número de tubos inculcados; con esos datos se buscó el número más probable (MP) de coliformes, por medio de la tabla respectiva (Apéndice, Cuadro 9).

MUES- TRA No.	a) RECUENTO TOTAL DE BACTERIAS		b) TECNICA DE TUBOS MULTIPLES Y NMP					b) TECNICA DE EC MEDIUM A TEMPERATURA DE 44.5° ± 0.5°C	
	CUESTA NORMAL EN PLACA DE PCA A 35°C	TESTIGO SIN INOCULAR	No. DE TUBOS POSITIVOS DE TRES DE LSB Y TESTIGO SIN INOCULAR				NUMERO MAS PROBABLE (NMP) POR GRAMO	SEIS TUBOS INOCULADOS	TESTIGO SIN INOCULAR
			0.1 ml	0.01 ml	0.001 ml	TESTIGO			
1	18 x 10 ⁵	-	3/3	3/3	1/3	-	460.0	2/6	-
2	17 x 10 ⁵	-	3/3	3/3	3/3	-	> 1100.0	1/6	-
3	13 x 10 ⁵	-	3/3	3/3	3/3	-	> 1100.0	3/3	-
4	12 x 10 ⁵	-	3/3	3/3	1/3	-	460.0	4/6	-
5	53 x 10 ⁴	-	3/3	2/3	0/3	-	93.0	4/6	-
6	14 x 10 ⁵	-	3/3	3/3	1/3	-	460.0	2/6	-
7	97 x 10 ⁴	-	3/3	3/3	1/3	-	460.0	3/6	-
8	15 x 10 ⁵	-	3/3	3/3	1/3	-	460.0	6/6	-
9	99 x 10 ⁴	-	3/3	3/3	0/3	-	240.0	3/6	-
10	54 x 10 ⁴	-	3/3	2/3	0/3	-	93.0	5/6	-
11	15 x 10 ⁴	-	3/3	0/3	0/3	-	23.0	3/6	-
12	15 x 10 ⁴	-	2/3	0/3	0/3	-	9.1	2/6	-
13	62 x 10 ⁴	-	3/3	3/3	1/3	-	460.0	5/6	-
14	44 x 10 ⁴	-	3/3	2/3	1/3	-	150.0	6/6	-

CUADRO 1. En a) recuento total de bacterias por gramo de muestra usando cajas de petri con PCA, b) Coliformes, técnica de tubos múltiples usando tres tubos de LSB de diferente dilución, resultados que se comparan con el cuadro del apéndice para obtener el NMP por gramo de muestra y c) Coliformes, técnica de la temperatura para investigar los de origen de animales de sangre caliente. En los tres casos, los testigos sin inocular no reaccionaron.

El análisis total en la determinación de coliformes se presenta en el cuadro 2 y comprende :

1- Prueba de Confirmación

Que consta por producción de gas observado dentro de los tubos Durham, contenidos en los tubos de ensayo con BRILA de los cuales se inocularon seis por muestra analizada y la pesca de colonias de coliformes en las cajas de petri con EMB, indicado en el cuadro por una X, la cual significa todas las colonias localizadas.

2- Prueba Completa

Mediante la cual se confirma la presencia de bacterias Gram Negativas y la fermentación secundaria en tubos con LSB para todas las colonias localizadas.

3- Ensayo Diferencial

Conformado por las pruebas de IMViC; Indol, Rojo de Metilo, Reacción de Voges Proskauer y Citrato resultados que según la fórmula del IMViC, tomada de Corn Refiners Association, Inc. 1971, identifican tres (3) tipos de bacterias coliformes subdividiéndose cada una de ellas como típica o atípica, dependiendo de los resultados positivos o negativos obtenidos en la prueba del IMViC, lo cual se detalla para las catorce (14) muestras analizadas en el cuadro 2.

En todos los casos se dejó medio de cultivo sin inocular como testigo, y en ninguno de ellos hubo crecimiento alguno al ser incubados conjuntamente con los inoculados.

MUESTRA No.	DE CONFIRMACION		PRUEBA COMPLETA		ENSAYO DIFERENCIAL (IMVIC)											
	CALDO DE BILBA No. de tubos positivos de 6	CAMBIO DE COLOR EN COLIFORMES (Colonias localizadas)	TINCION DE GRAM	FERMEN- TACION SECUNDARIA	Escherichia coli			Escherichia freundii (Citrobacter)			Aerobacter aerogenes					
					TIPICA	ATIPICA	TIPICA	TIPICA	ATIPICA	TIPICA	TIPICA	ATIPICA				
1	6/6	X	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
2	6/6	X	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
3	6/6	X	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
4	6/6	X	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
5	6/6	X	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
6	4/6	X	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
7	4/6	X	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
8	6/6	X	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
9	6/6	X	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	4/6	X	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
11	5/6	X	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
12	6/6	X	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
13	3/6	X	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
14	6/6	X	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

CUADRO 2. Resultados del análisis total en la determinación de Coliformes en prueba de confirmación, completa y ensayo diferencial. En prueba de confirmación se lee el número de tubos positivos que sirvieron para inocular las cajas con EMB; se señala con una X el hallazgo de colonias coliformes. En tinción de Gram, la (-) define a las colonias rosadas Gram Negativas. En fermentación secundaria la (+) representa la presencia de gas. En el ensayo diferencial, se muestra fórmulas y bacterias determinadas con ellas. En todos los análisis los controles sin inocular no mostraron reacción alguna.

El análisis c) presencia de estafilococos coagulasa positiva, usando como medio de cultivo VJA con telurito de potasio, presentó en las cajas de petri inculadas de las muestras 1, 4, 7 y 12 crecimiento de colonias negras de más de 5 mm. de ancho; todas las colonias sin excepción reaccionaron como Gram Positivas (+) y su forma era de cocos en racimos, con reacción negativa para la prueba de la coagulasa. En las cajas de petri inculadas con las otras muestras no hubo crecimiento de ningún tipo de colonias. Todos los medios de cultivo de VJA con telurito de potasio que se usaron como control dieron resultados negativos.

El análisis d) presencia de Clostridios fue negativa en las catorce (14) muestras, tanto en las cajas de petri de BAA inculadas, como en las petri que se incubaron sin inocular (controles). En los medios inculados hubo crecimiento de diversas colonias bacterianas que no se trató de identificar, aunque habían colonias típicas de Pseudomonas, a las cuales no se les hizo ningún análisis para reafirmar este hallazgo.

Fase 2:

Las diferentes bacterias aisladas en las catorce muestras analizadas con respecto a presencia y diferenciación de Salmonella y Shigella (literal e) de materiales y métodos) identificadas a través de reacciones bioquímicas en TSI, aplicando la fórmula tomada de Herck, Manual de Microbiología (Apéndice, Cuadro 8) y el uso de reacciones seriológicas, se detallan en el cuadro 3.

Bacteria aislada.	Reacción en (TSI)		Formación de H ₂ S	Antisueros	Muestra en la que se identificó														% de identificación								
	Zona CO lumbar.	Superficie incl. para.			Salmonella	Shigella	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		13	14						
Salmonella typhi	A	OAL	+	Poly A1 VI								X						X									7.1
Salmonella pullorum	AG	OAL	-	9	X	X	X	X	X								X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	85.7
Salmonella paratyphi-B, Salmonella typhimurium.	AG	OAL	+	4-5				X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	57.1
Salmonella enteritidis.	AG	OAL	+	7	X							X					X	X									28.6
Salmonella gallinarum.	A	OAL	+	9		X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	64.3
Shigella dysenteriae.	A	OAL	-	A	X												X										28.6
Shigella boydii	A	OAL	-	G														X									14.3
Shigella sonnei	A	A	-	D	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	85.7

CUADRO 3. Identificación de Salmonellas y Shigellas por medio de la reacción en TSI y reacciones serológicas, en las catorce (14) muestras analizadas.

El aislamiento de Salmonella por medio de cuatro grupos de caldos de enriquecimiento y medios de cultivo, para cada una de las muestras, se especifica en el cuadro 4 y en el cuadro 5 el correspondiente a Shigella. El aislamiento de Salmonella o Shigella se reporta para los diferentes medios de cultivo con una X independientemente de las cantidades o diferentes especies aisladas de los géneros antes mencionados. Considerando que en catorce muestras analizadas; cada uno de los medios selectivos de los diferentes grupos tuvo catorce oportunidades de permitir el aislamiento de Salmonella y/o Shigella, por lo tanto, catorce oportunidades representan el cien por ciento de aislamiento para cada uno de esos medios selectivos.

Con el porcentaje de aislamiento de Salmonella de cada uno de los medios selectivos de los distintos grupos se elaboró el cuadro 6, con el porcentaje de Shigella al cuadro 7 que son gráficos de barra que muestran los aislamientos de Salmonella y Shigella obtenidos con cada una de las combinaciones de caldos y enriquecimiento y medios de cultivo selectivos.

En el cuadro 8 se muestra el resumen del análisis de varianza considerando cuatro grupos de caldos con sus respectivos medios de cultivo selectivos, para resultados de aislamiento de Salmonella y Shigella de catorce muestras analizadas y en el cuadro 9 considerando grupos pareados.

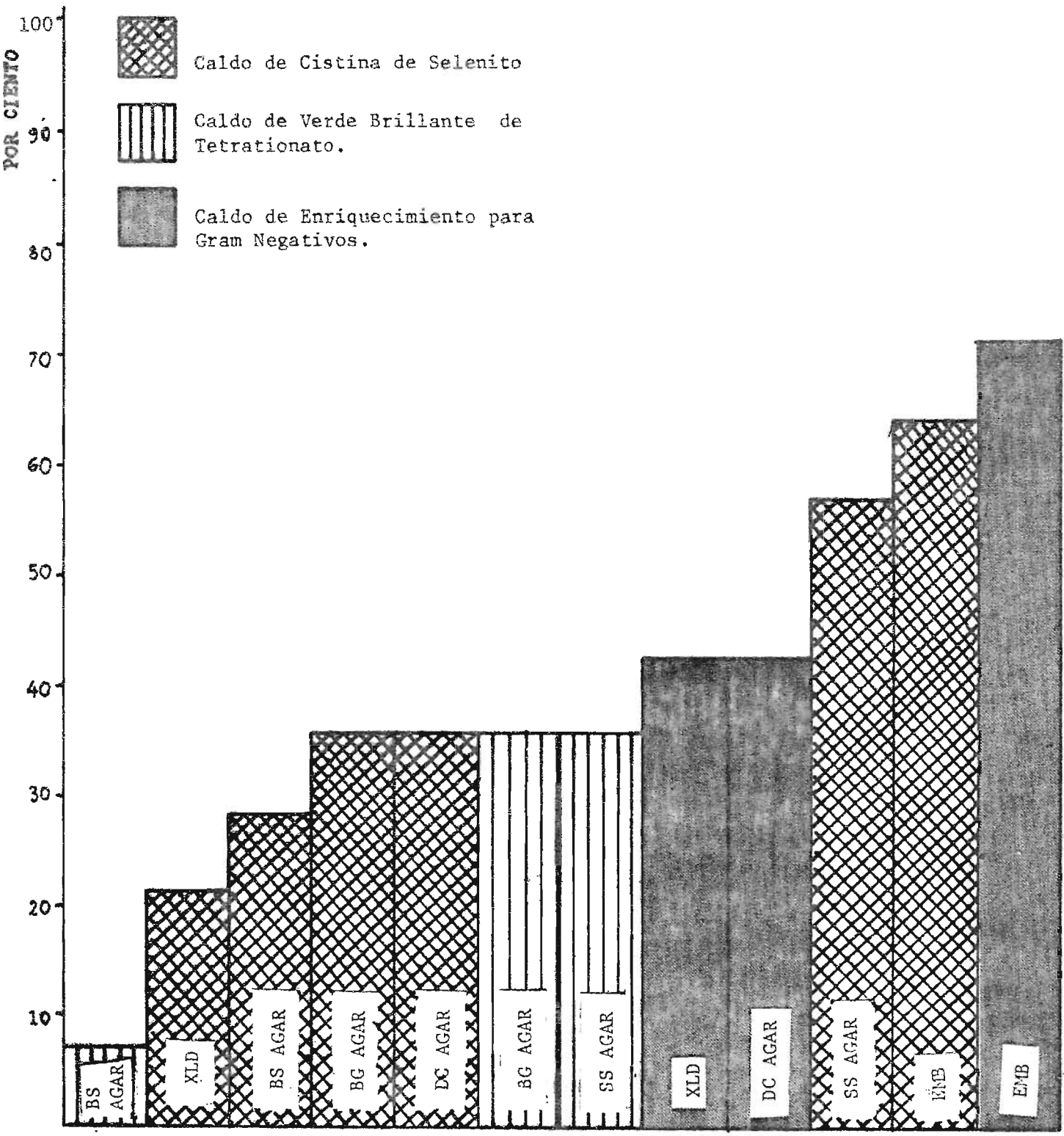
Un contraste de medias para grupos que tienen diferente caldo de enriquecimiento y medios de cultivo selectivos iguales, para resultados de aislamiento de Salmonella y Shigella se resumen en el cuadro 10.

GRUPOS	Combinación de Caldos y Medios de Cultivo Utilizados.	Muestra en la/se aislo Salmonella														Total Salmone- lla ais- ladas en cada uno de los - agares.	% de aisla- miento
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
GRUPO A	Caldo de Cistina de Selenito (SC)	BAGar			X					X	X	X	X			5	35.7
		SSAgar			X			X	X	X	X	X	X		X	8	57.1
		BSAgar			X					X		X	X			4	28.6
GRUPO B	Caldo de Cistina de Selenito (SC)	XLD		X				X				X				3	21.4
		DCAgar								X	X	X	X		X	5	35.7
		EMB	X			X	X	X		X	X	X		X	X	9	64.3
GRUPO C	Caldo de Verde Brillante de tetracionato (TBG)	BAGar		X		X			X			X	X			5	35.7
		SSAgar			X			X	X		X				X	5	35.7
		BSAgar	X													1	7.1
GRUPO D	Caldo de enri- quecimiento -- para Gram Negativos (GN)	XLD			X	X	X		X			X	X			6	42.8
		DCAgar		X					X	X	X			X	X	6	42.8
		EMB			X	X	X	X	X	X	X		X	X		10	74.4

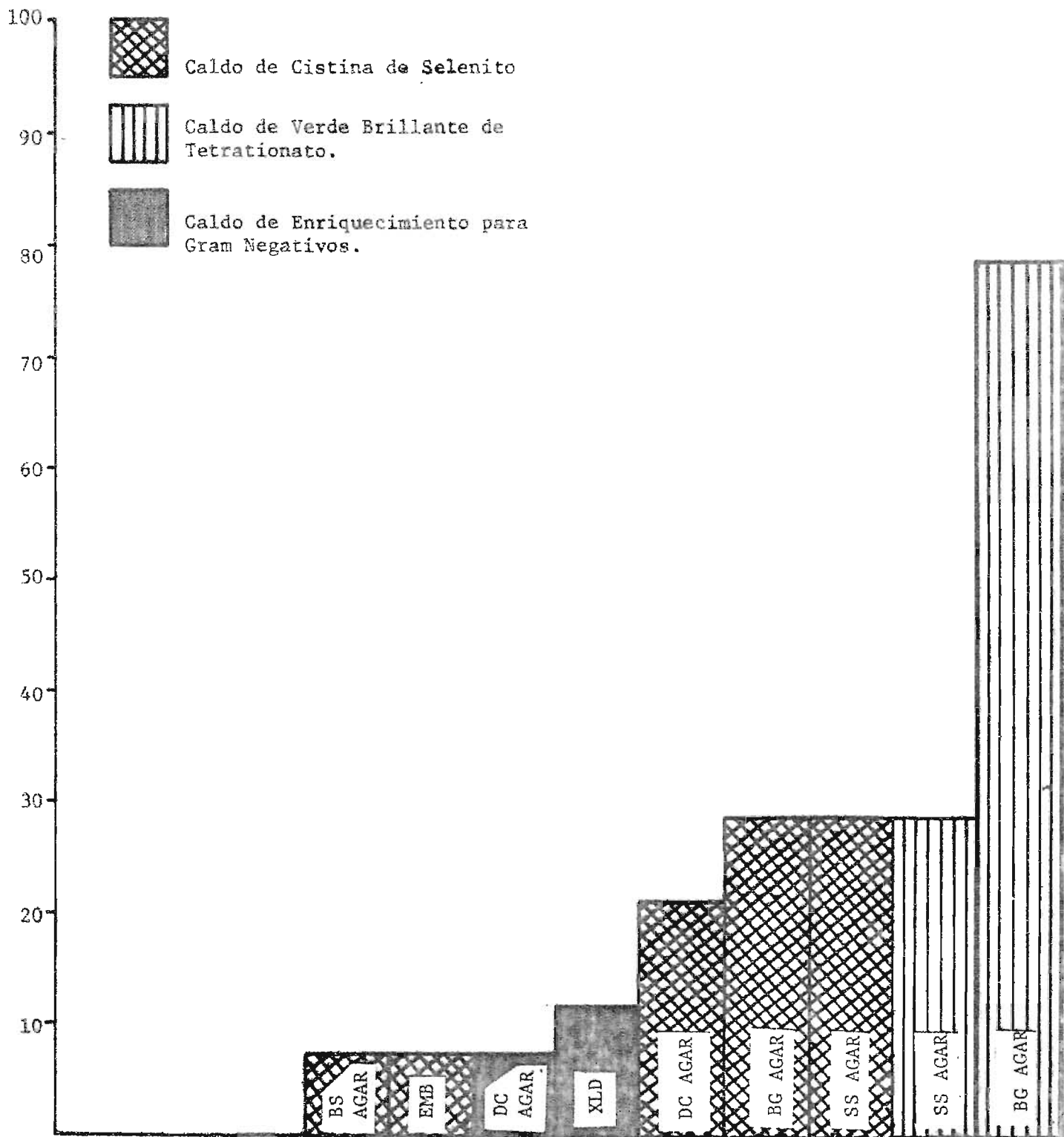
CUADRO 4. Aislamiento de Salmonella y porcentaje de catorce muestras analizadas para diferentes caldos y medios de cultivo.

GRUPOS	Combinación de caldos y medios de cultivo utilizados.	Muestra en la que se aislo Shigella														Total Shigella aisladas en cada uno de los agares.	% de aislamiento	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
GRUPO A	Caldo de Cistina de Selenito. (SC)	BG Agar			X		X	X	X								4	28.6
		SS Agar	X	X			X		X								4	28.6
		BS Agar								X							1	7.1
GRUPO B	Caldo de Cistina de Selenito. (SC)	XLD															-	-
		DC Agar	X				X		X								3	21.4
		EMB												X			1	7.1
GRUPO C	Caldo de Verde Brillante de Tetratio nato. (TBG)	BG Agar	X	X		X		X	X	X	X		X	X	X		11	78.6
		SS Agar				X				X				X	X		4	28.6
		BS Agar															-	-
GRUPO D	Caldo de enriquecimiento para Gram Negativos. (GN)	XLD	X			X											2	14.3
		DC Agar					X										1	7.1
		EMB															-	-

CUADRO 5. Aislamiento de Shigella y porcentaje de las catorce muestras analizadas para los diferentes caldos y medios de cultivo.



CUADRO 6. DIAGRAMA DE BARRAS QUE REPRESENTA LA DETECCION DE Salmonella EN BASE A PORCENTAJE EN LOS DIFERENTES CALDOS Y MEDIOS DE CULTIVO.



CUADRO 7. Diagrama de Barras que representa la detección de Shigella en base a porcentaje en los diferentes caldos y medios de cultivo.

Tipo de operación aplicada	Simbología	Análisis de varianza de los cuatro grupos.	
		Resultados de <u>Salmonella</u>	Resultados de <u>Shigella</u>
Sumatoria de la suma de las X	$\sum (\sum X)$	67	31
Sumatoria de los cuadrados de la suma de las X.	$\sum (\sum X)^2$	1183	331
Cuadrado de la sumatoria de las sumas de X.	$[\sum (\sum X)]^2$	4489	961
Sumatoria de las sumas de los cuadrados de X.	$\sum (\sum X^2)$	443	185
Número total de casos	N	12	12
Número de elementos de cada grupo	n	3	3
Suma total de cuadrados	$\sum X_e^2$	69	105
Suma de cuadrados "entre" grupos	$\sum X_e^2$	20	30
Suma de cuadrados "dentro" de grupos	$\sum X_d^2$	49	75
Grados de libertad del total de grupos	gl _T	11	11
Grados de libertad "entre" grupos	gl _e	3	3
Grados de libertad "dentro" de grupos	gl _d	8	8
Cuadrados medios "entre" grupos	\bar{X}_e^2	6.66	10
Cuadrados medios "dentro" de grupos	\bar{X}_d^2	6.12	9.37
F de Snedecor experimental	F _{ex}	1.08	1.06
F de Snedecor para 5%	F de 5%	4.07	4.07

CUADRO 8. Resumen del análisis de varianza, considerando cuatro grupos de caldos y medios de cultivo para resultados de aislamiento de Salmonella y Shigella en catorce muestras analizadas.

Sim- bología	ANALISIS de VARIANZA con solo dos grupos							
	Resultados de <u>Salmonella</u>				Resultados de <u>Shigella</u>			
	Grupo A-C	Grupo A-B	Grupo A-B	Grupo C-D	Grupo A-C	Grupo B-D	Grupo A-B	Grupo C-D
$\sum(\sum X)$	28	39	34	33	24	7	13	18
$\sum(\sum X)^2$	410	773	578	605	306	25	97	234
$[\sum(\sum X)]^2$	784	1521	1156	1089	576	49	169	324
$\sum(\sum X^2)$	156	287	220	223	170	15	43	142
N	6	6	6	6	6	6	6	6
n	3	3	3	3	3	3	3	3
$\sum X_e^2$	25	33	27	41.5	74	6.84	14.84	70
$\sum X_e^2$	5	4	0	20.1	6	0.17	4.17	24
$\sum X_d^2$	20	29	27	21.4	68	6.67	10.67	46
glt	5	5	5	5	5	5	5	5
gle	1	1	1	1	1	1	1	1
gld	4	4	4	4	4	4	4	4
\bar{X}_e^2	5	4	0	20.10	6	0.17	4.17	24
\bar{X}_d^2	5	7.25	6.75	5.35	17	1.66	2.66	11.5
Fex	1	0.55	0	3.75	0.35	0.10	1.56	2.08
F de 5%	7.71	225	225	7.71	225	225	7.71	7.71

CUADRO 9. Resumen del análisis de varianza, considerando grupos pareados de caldos y medios de cultivo para resultados de aislamiento de Salmonella y Shigella en catorce muestras analizadas.

Contraste de medias de grupos de <u>Salmonella</u> .	
\bar{X}_1 Grupo A	\bar{X}_2 Grupo C
$\sum X_1 = 17$	$\sum X_2 = 11$
$\bar{X}_1 = 5.66$	$\bar{X}_2 = 3.66$
$\sum X_1^2 = 105$	$\sum X_2^2 = 51$
$N_1 = N_2 = N = 3$	
gl = 4	
t experimental = 0.66	

Contraste de medias de grupos de <u>Salmonella</u> .	
\bar{X}_1 Grupo B	\bar{X}_2 Grupo D
$\sum X_1 = 17$	$\sum X_2 = 22$
$\bar{X}_1 = 5.66$	$\bar{X}_2 = 7.33$
$\sum X_1^2 = 51$	$\sum X_2^2 = 172$
$N_1 = N_2 = N = 3$	
gl = 4	
t experimental = 0.24	

Contraste de medias de grupos de <u>Shigella</u> .	
\bar{X}_1 Grupo A	\bar{X}_2 Grupo C
$\sum X_1 = 9$	$\sum X_2 = 15$
$X_1 = 3$	$\bar{X}_2 = 5$
$\sum X_1^2 = 33$	$\sum X_2^2 = 137$
$N_1 = N_2 = N = 3$	
gl = 4	
t experimental = 0.37	

Contraste de medias de grupos de <u>Shigella</u> .	
\bar{X}_1 Grupo B	\bar{X}_2 Grupo D
$\sum X_1 = 4$	$\sum X_2 = 3$
$\bar{X}_1 = 1.33$	$\bar{X}_2 = 1$
$\sum X_1^2 = 10$	$\sum X_2^2 = 5$
$N_1 = N_2 = N = 3$	
gl = 4	
t experimental = 0.20	

Valor límite de los cuatro contrastes : t con 4 gl al .05 = 2.776

CUADRO 10. Resumen de contraste de medias, de grupos que tienen diferente caldo e iguales medios de cultivo. Con el respectivo valor límite para los cuatro contrastes. ($\sum X$ = sumatoria de X, \bar{X} = media de X, $\sum X^2$ = su sumatoria de X al cuadrado. N = número total de casos en cada grupo. gl = grados de libertad).

VI - DISCUSION

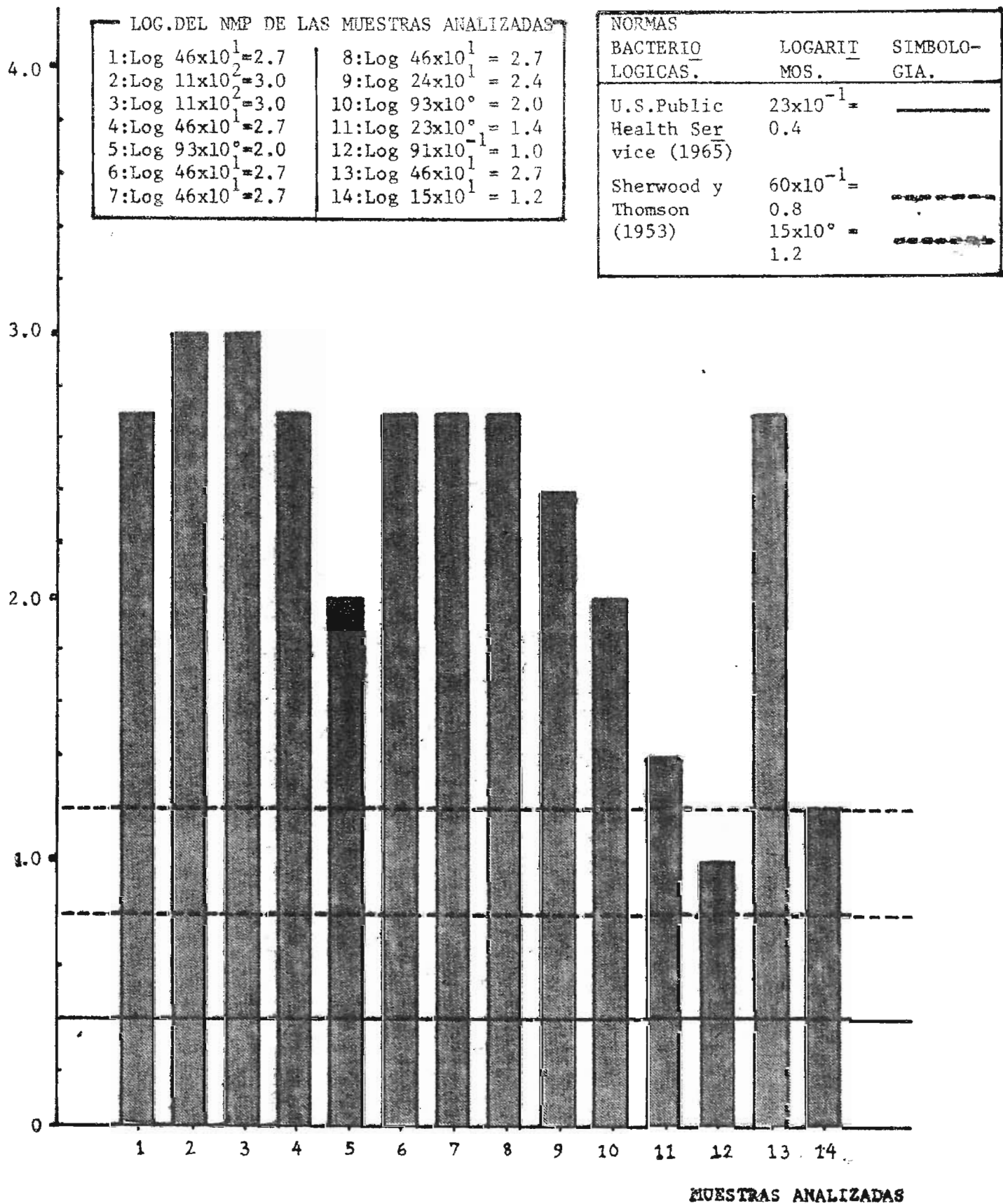
La calidad sanitaria de la carne y líquidos de las "Conchas", Anadara tuberculosa Sowerby, del área muestreada (ver figura 6 del Apéndice), fue analizada en este trabajo mediante los análisis -- bacteriológicos anteriormente descritos.

Las catorce muestras analizadas para recuento total de bacterias y NMP de coliformes (ambos por gramo de muestra, y expresando los resultados en escala logarítmica), se comparan con las normas bacteriológicas recomendadas para la carne y líquidos de moluscos en los Estados Unidos e Inglaterra (ver Cuadros 11 y 12). Como los estándares de los países arriba mencionados, están expresados en ml. para efectos de comparación con los datos aquí obtenidos - se parte de que un ml. es equivalente a un gramo de muestra analizada.

Las normas bacteriológicas del U.S. Public Health Service para moluscos eran hasta 1965, las siguientes : se consideraban aceptables las muestras con una cuenta estandar no mayor de 500,000 por ml. y un NMP de coliformes fecales no mayor de 2.3 por ml. (Rodríguez y Fernández, 1968).

En Inglaterra Sherwood y Thomson (1953), propusieron para el NMP de coliformes, la siguiente norma:

- Grado I : menos de 6 coliformes por ml. de tejido analizado
- Grado II : de 6 a 15 coliformes por ml. de tejido analizado
- Grado III : más de 15 coliformes por ml. de tejido analizado.



CUADRO 12. Comparación de los resultados obtenidos para el número más probable de Coliformes (NMP) por gramo de muestra analizada con normas bacteriológicas sugeridas en Estados Unidos e Inglaterra.

7.0

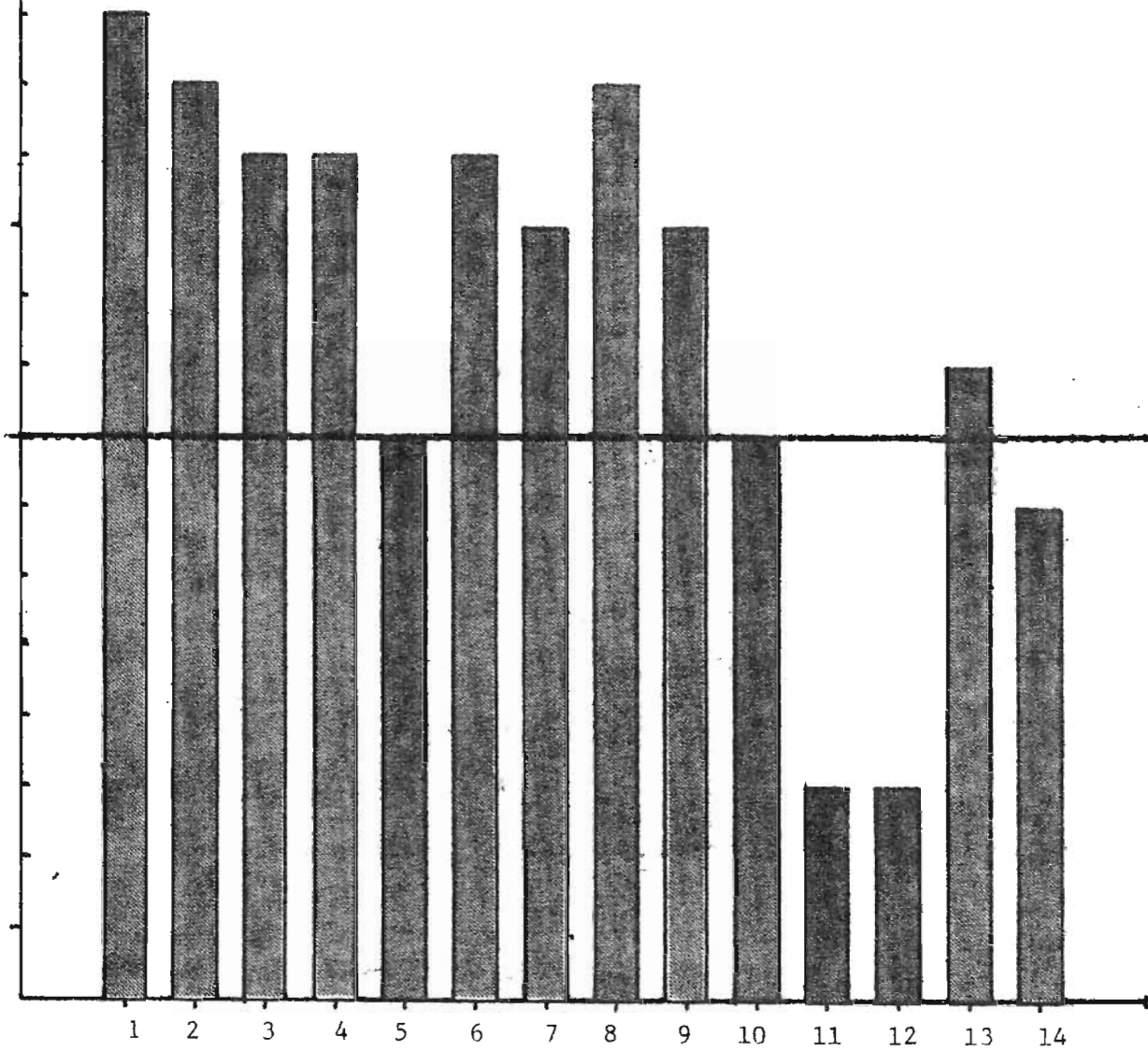
Log. del Recuento Total de Bacterias de catorce muestras analizadas.

1: Log $18 \times 10^5 = 6.3$	8: Log $15 \times 10^5 = 6.2$
2: Log $17 \times 10^5 = 6.2$	9: Log $99 \times 10^4 = 6.0$
3: Log $13 \times 10^5 = 6.1$	10: Log $54 \times 10^4 = 5.7$
4: Log $12 \times 10^5 = 6.1$	11: Log $15 \times 10^4 = 5.2$
5: Log $53 \times 10^4 = 5.7$	12: Log $15 \times 10^4 = 5.2$
6: Log $14 \times 10^5 = 6.1$	13: Log $62 \times 10^4 = 5.8$
7: Log $97 \times 10^4 = 6.0$	14: Log $44 \times 10^4 = 5.6$

NORMA BACTERIOLOGICA.	LOGARITMO.	SIMBIOLOGIA.
U.S. Public Health Service (1965)	$50 \times 10^4 = 5.7$	—

6.0

5.0



Muestras analizadas.-

CUADRO 11. Comparación de los resultados obtenidos para el Recuento Total de Bacterias por gramo de muestra analizada con norma bacteriológica sugerida en los Estados Unidos.

De la norma anterior, el Grado I es considerado como carne de molusco limpia y segura para su consumo, el Grado II es carne de pureza dudosa y el Grado III evidencia una alta contaminación fecal, de tal manera que el consumo de esta carne representa un peligro para la salud humana.

Esta norma del NMP para determinar la densidad de bacterias coliformes fecales, es un método rápido y práctico, usado por la mayoría de organizaciones encargadas de velar por la salud pública. Si bien es cierto que este método no determina la presencia de bacterias patógenas, si indica que hay contaminación fecal y por lo tanto que hay riesgo de que se encuentren agentes causales de enfermedades.

Según el cuadro 11 en donde se comparan los resultados obtenidos para el Recuento total de bacterias con la norma del U.S. Public Health Service, las muestras 11, 12 y 14 colectadas en "La Venadona", "Rinconada" y "Rancho Viejo", respectivamente (ver figura 6 del Anéndice) son aceptables, en tanto que las muestras 5, colectadas en "Guayabo", y 10, en "Canal del Chila", por encontrarse exactamente en el límite de dicha norma, se deben de considerar como no aceptables.

De la comparación hecha en el Cuadro 12, sobre los resultados obtenidos para el NMP de coliformes con las normas de los estándares, ya mencionados, se observa que trece muestras se considerarían como contaminadas. Solamente la muestra doce colectada en "Rinconada", estaría ubicada por la norma del U.S. Public Health Service, como no recomendable para el con-

sumo humano. En tanto que, por la norma sugerida por Sherwood y Thomson, dicha muestra solo sería considerada como sospechosa por encontrarse entre los límites del Grado II.

La determinación de que los coliformes proceden de heces de animales de sangre caliente fue dada por dos parámetros. El primero de ellos -- fue la técnica de EC Medium a temperatura elevada ($44.5^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) y el segundo parámetro usado fue el Ensayo Diferencial (IMVIC).

Ha sido comprobado que la técnica del EC Medium a temperatura elevada, posee 96.3 por ciento de eficiencia para determinar la presencia de coliformes de origen fecal (Geldreich, 1965). Según el cuadro 1 de Resultados, el 100 por ciento de las muestras analizadas presentaban contaminación fecal, la cual es indicada por la formación de gas dentro de uno o más tubos Durham del Caldo EC.

Según el cuadro 2 de Resultados, el Ensayo Diferencial (IMVIC) también el 100 por ciento de las muestras presentaban contaminación fecal, la cual es indicada por el aislamiento de una o las dos especies de bacterias Escherichia coli y Aerobacter aerogenes, que existen con frecuencia elevada asociadas a las heces de animales de sangre caliente (Carpenter, 1969).

En conclusión, los dos parámetros determinaron en el total de las muestras la contaminación por bacterias coliformes, procedentes de heces de animales de sangre caliente. Además se considera que la técnica del EC Medium, es recomendable para ser empleada por ser un método eficiente y rápido de desarrollar.

La contaminación de la "Bahía de Jiquilisco" con materia orgánica proviene especialmente de los desechos de aguas negras que se vierten directamente a ese manto de agua, principalmente del "Puerto El Triunfo". También debe de considerarse como vehículo de contaminación química y orgánica el agua de los ríos, cuyas vertientes desembocan en la bahía después de atravesar una zona de intensa actividad humana. Es importante señalar que alrededor de la bahía existen núcleos poblacionales como "Puerto Parada", "San Dionisio", "Isla de Méndez", "Rancho Viejo" ubicado en la "Isla Madresal" y otros, así como numerosas propiedades particulares que desaguan sus desechos en las aguas de la bahía.

Una costumbre observada en "Isla de Méndez" es de que los habitantes del lugar ubican las "Conchas" capturadas en empalizadas llamadas "chiqueros" las cuales están construidas dentro de la bahía. Estos "chiqueros" se encuentran a poca distancia de servicios sanitarios improvisados, construidos de paredes de tabla y techados con hojas que descansan sobre pilotes de mangle y que posan directamente sobre las aguas de la bahía.

Según H.G. Gierloff Emden (1976), la "bahía de Jiquilisco" posee condiciones hidrográficas propias, en ella existe una circulación de agua lo suficientemente fuerte para inundar toda la serie de canales que la conforman (ver figura 8 del Apéndice). Razón por la cual puede considerarse al "Puerto El Triunfo" como un foco principal de contaminación fecal, la que puede extenderse fácilmente a través de la bahía por medio del movimiento de mareas.

Según las Normas Sanitarias de Alimentos aprobadas por El Salvador en el Consejo de Ministros de Salud Pública de C.A. y Panamá, período de 1964-66 por medio de la Organización Panamericana de Salud (OPS), Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud (OMS), los moluscos no deben de provenir de aguas contaminadas o sucias, requisitos que no cumplen las aguas de la "Bahía de Jiquilisco".

Otros requisito dado en las normas anteriores para el aspecto microbiológico es : debe de haber ausencia total de microorganismos causantes de la descomposición del producto, que puedan producir intoxicaciones alimentarias o de microorganismos causantes de infecciones alimentarias.

En este trabajo no se aisló en ninguna de las muestras analizadas microorganismos causantes de intoxicaciones alimentarias como son : Staphylococcus aureus y Clostridium botulinum.

El aislamiento de S. aureus en ostras del pacífico ya ha sido informado (Rubio, 1967), también Rodríguez y Fernández (1968), reportan la presencia de enterococos hemolíticos en carne y líquidos de ostiones. Sin embargo, en este trabajo no se aisló ningún estafilococos coagulasa positiva. Este hecho hace suponer tal como lo reporta Troller y Frazier (1962), que su presencia ha podido ser inhibida por antibiosis o competencia de nutrientes con : Escherichia coli, Aerobacter aerogenes y algunas no identificadas en estos análisis, y que pudieron estar en las muestras, tales como Pseudomonas sp. Bacillus cereus, Proteus vulgaris y Serratia -

marcescens. Por lo tanto es lógico pensar que la contaminación con esta filococos coagulasa positiva se deba al tratamiento de los moluscos (captura, distribución o venta) por individuos infectados, como portadores nasales o con abscesos abiertos.

Ya ha sido detectado Clostridium botulinum en sedimentos marinos, aguas de estuarios y en ostras (Presnedl et al, 1967; Hard y Carroll, 1965). El hecho de no encontrarla en ninguna de las muestras analizadas, pudo deberse a que el método empleado para su aislamiento necesitaba condiciones anaeróbicas, indispensables para el desarrollo de este género de bacterias; condiciones que no se pudo lograr en el laboratorio, ya que es poco probable que el limo de la bahía (superficie con la cual, estos animales ponen en contacto su cuerpo para desplazarse), este exenta de esporas de Clostridium.

La presencia de bacterias en forma de estafilococos con reacción coagulasa negativa aisladas en VJA con telurito de potasio de algunas muestras y las colonias típicas del género Pseudomonas observadas en BAA, podrían explicarse al considerar que ambas forman parte de la flora normal del agua de la bahía.

Bacterias de los géneros Salmonella y Shigella causantes de infecciones alimentarias, han sido localizadas en hábitats relacionados con moluscos (Sherwood y Thomson, 1953; OPS, Pub. Cient. 252, 1970; De Araujo, - 1975, Cordano y Virgilio, 1976). En este trabajo se aisló e identificó

a algunos serotipos de bacterias Salmonella y Shigella, en la carne y líquidos de "Concha" (ver Cuadro 3 de Resultados), en el cual se anota la correspondiente identificación de las bacterias en las muestras analizadas.

Donald F. Spino (1966), encontró por medio de la Técnica de Temperatura elevada para el aislamiento de Salmonella que el NMP de Coliformes es un excelente indicador de la posible presencia de Salmonella. K. Grunnet y B. Nielsen (1969), determinaron en el Golfo de Aarhus, Dinamarca que la presencia de Salmonella puede ser demostrada, cuando el NMP de coliformes es alto. En este trabajo se obtuvieron resultados similares, porque en el 100% de las muestras analizadas hubo aislamiento de Salmonella y los NMP de coliformes nunca estuvieron bajo los dos estándares con los que se compararon. Por consiguiente, se puede inferir que cuando se encuentra una muestra contaminada fecalmente según el método del NMP de coliformes, posiblemente se encontrarán bacterias Salmonella en esa misma muestra.

T.P. Gallagher y D.F. Spino (1966), recomiendan que el método del NMP de coliformes debe ser implementado con el de aislamiento de Salmonella debido a que se pueden aislar Salmonella aún con densidades de coliformes de 1.5 por ml. Esta densidad es menor que las dadas por muchos estándares como límite de seguridad sanitario aceptable, para la muestra que estén investigando.

Lo anterior ha sido comprobado por muchos investigadores, quienes han aislado Salmonella aún cuando los NMP de coliformas eran bajas (Presnell y Miescier, 1971; Outka y Bell, 1973; Dondero et al, 1977). Es básico tener esto presente cuando se trata de implementar por medio del MP de coliformas, una metodología que tienda a investigar la contaminación fecal para relacionarla con normas sanitarias de salud pública.

De catorce muestras analizadas se aisló en el 85.7% y en el 64.3% a S. pullorum y S. gallinarum respectivamente, las cuales se considera que tienen como hospedero principal a las aves (Burrows, 1968; Berg y Anderson, 1972; Dondero et al, 1977) y que en excepcionales casos son patógenos al hombre (Burrows, 1969; Kobardth, 1972; Dondero et al, 1977). Le siguió con 57.1% de porcentaje de aislamiento S. paratyphi-B o S. typhi-murium, las cuales no pudieron ser diferenciadas por no tener los antisueros específicos que lo hubieran podido elucidar. Se aisló S. enteritidis en el 28.6% y S. typhi en el 7.1%. Las bacterias S. typhi y generalmente S. paratyphi-B son parásitos obligados del hombre (Burrows, 1969; Barker, 1976; Cordano y Virgilio, 1976). S. typhi-murium y S. enteritidis son aisladas con frecuencia de heces humanas (Grunnet y Nielsen, 1969), sin embargo, ha sido comprobada su presencia en gran variedad de hospederos animales, tales como animales domésticos y aves marinas (gaviotas) (Grunnet y Nielsen, 1969; Berg y Anderson, 1972; Grados, 1975; Dondero et al, 1977).

Por lo anterior, se podría considerar que la contaminación fecal de la bahía es incrementada por millares de aves. Este punto fundamen-

tarse por el hecho de haber aislado en la misma muestra S. typhi conjuntamente con S. pullorum y S. gallinarum. También es probable que gaviotas y otro tipo de aves marinas que habitan esta región se contaminen previamente con los desechos humanos, ya que se ven continuamente sobrevolando las zonas de descarga de éstos, cuando se encuentran en búsqueda de su alimento.

A diferencia de Salmonella, Shigella no es nativo en los alimentos y usualmente no está clasificada como causa de ataques de naturaleza explosiva en la infección de alimentos (Lewis y Angelotti, 1964), sin embargo, es causa de severas enfermedades diarreicas que son transmitidas ocasionalmente a través de los alimentos que han tenido contacto con agua contaminada fecalmente (Lewis y Angelotti, 1964; Barker, 1977).

El Dr. Juan Riquel Martínez (1973), en su estudio epidemiológico de disentería bacilar en el asentamiento campesino "14 de Julio" de la Hacienda Mancuhiname, Departamento de Usulután, El Salvador, de un brote que formó parte de la gran epidemia de Shigella dysenteriae, tipo 1, que azotó el país durante 1969-1970 y 1971, reporta que dos fuentes naturales a la orilla de un río que abastecían de agua de consumo a los habitantes del lugar presentaban contaminación fecal. El tipo de curva del brote, que él encontró parecía indicar que la forma de transmisión dominante tuvo un origen común. Este pudo haber sido el abastecimiento de agua. Por esa razón,

el aislamiento de Shigella en doce de las catorce muestras de al menos uno de los siguientes serotipos : Sh. sonnei, Sh. dysenteriae y Sh. boydii con el porcentaje de aislamiento de 85.7%, 28.6% y 14.3% respectivamente, podría confirmar que las aguas de donde fueron sustraídas las "Conchas" que resultaron con aislamiento de Shigella, estaban contaminadas con materia orgánica de humanos.

En las muestras nos. 3 y 11 obtenidas en "tres enganches" y "la vena dona" respectivamente (ver figura 6 del Apéndice), no se aisló ninguna especie de Shigella. El hecho de que la muestra No. 3 haya presentado un alto valor en su NMP de coliformes y que solamente se halla aislado S. puttorum, S. gallinarum y ninguna especie de Shigella, sugiere una gran contaminación fecal proveniente de aves. En tanto que la muestra No. 11, aunque su NMP de coliformes fue el segundo de los valores mas bajos encontrados, se aisló a S. enteritidis y S. paratyphi-B o S. typhi-murium, - las cuales podrían provenir de contaminación por heces humanas.

Es importante llamar la atención en el hecho de que la única vez que se aisló S. typhi fue en la muestra No. 8, colectada el día 22 de septiembre de 1976 en el "Guayahón", escasamente a catorce días de haber aparecido una epidemia de fiebre tifoidea en el "Puerto El Triunfo", el cual es considerado como la fuente principal de contaminación fecal de la bahía. Este sugiere el posible papel que puedan tener los alimentos marinos extraídos de zonas contaminadas, como factor de expansión de una epidemia.

Hay que tener en cuenta que los factores interactuantes en un brote epidémico son según W.H.Barker (1976) : el agente, el huésped y el ambiente. El agente con su capacidad para persistir en el ambiente y causar alteraciones fisiopatológicas; el huésped con sus características biológicas y de comportamiento que puedan aumentar o disminuir el riesgo de enfermedad y el ambiente, como medio de transmisión del agente al huésped.

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian el precario equilibrio en que se encuentran los factores antes mencionados con respecto a la salud pública. Por tanto, se puede inferir que existe un peligro potencial de infección: 1) los agentes causales de enfermedades entéricas, que se encuentran sobreviviendo en un alimento (la "Concha"); 2) en nuestro país es consumido generalmente crudo por una población desnutrida; (establecido por las Naciones Unidas cuando considera que El Salvador presenta un grave déficit alimentario; Mortman, 1976); 3) la desnutrición favorece el desarrollo de procesos diarreicos (Mendoza, 1975; Behar, 1975; DuPont, 1975; Barker, 1976).

En 1911 Phelps demostró que los moluscos desarrollados en aguas contaminadas pueden ser liberados totalmente de los microorganismos fecales si se los traslada a aguas puras, poco después en 1916, estaba funcionando eficientemente una planta comercial en Inglaterra dedicada a la purificación de mejillones (Fernández y Brunker, 1977). En la actualidad existen tanques de tratamiento en los cuales los moluscos, pueden descontami-

narse en dos días alcanzando un Grado I (Sherwood y Thomson, 1953) de acuerdo a las normas citadas en esta discusión. Este tipo de tecnología podría ser aprovechada en nuestro país para una explotación de los moluscos, acorde a normas sanitarias de salud pública.

Los resultados obtenidos en el aislamiento de Salmonella y Shigella con cada una de las diferentes combinaciones de caldos y medios de cultivo (ver Cuadros 4 y 5 de Resultados), muestran que la mejor combinación de aislamiento para Salmonella se obtuvo con caldo GN y EMB con 71.4 por ciento de aislamiento, la menos efectiva fue el caldo TBG y BS agar con 7.1 por ciento, se obtuvo un promedio total de 40.1 por ciento. En tanto, que la combinación que resultó más efectiva en aislamiento de Shigella fue el caldo TBG y BG agar con 73.6 por ciento de aislamiento y las menos efectivas fueron : caldo SC con XLD, caldo TBG con BS agar y caldo GN con EMB con cero por ciento de aislamiento, y se tuvo un promedio total de 36.4%.

En relación al aislamiento de Salmonella y Shigella, según se observa en los cuadros 6 y 7 de Resultados, se podría creer que esto no se debió al azar, sino que a una mayor o menor selectividad proporcionada por las distintas combinaciones y caldos y medios de cultivo. Para comprobar que la diferencia de los resultados es real y que se trata de una variación casual debida al azar, se realizan análisis estadísticos diseñados para muestras pequeñas. Dichos análisis cuyos resultados están resumidos en

Los cuadros 3, 9 y 10 de Resultados son : 1) análisis de varianza considerando los cuatro grupos (A, B, C y D) de caldos y medios de cultivo, para resultados de aislamiento de Salmonella y Shigella; 2) Análisis de varianza considerando grupos pareados; 3) Contraste de significación de diferencia de dos medios cuando el número de elementos (N_1) de un grupo es igual al número de elementos (N_2) del otro grupo.

Análisis de Varianza Para una Clasificación Simple de Datos Considerando - Todos los Grupos de Caldos y Medios de Cultivo en Aislamiento de Salmonella.

Se construye una tabla en que aparecen las veces (X) que en catorce muestras analizadas se aisló Salmonella, con tres diferentes medios de cultivo para cada uno de los grupos (A, B, C y D) (ver Cuadro 4 de Resultados). En las cuatro columnas de la derecha figuran los cuadrados de cada uno de los aislamientos. Bajo la tabla se ubican las sumatorias y otros datos necesarios para realizar las diferentes operaciones.

A	B	C	D	A	B	C	D
X	X	X	X	X ²	X ²	X ²	X ²
5	3	5	6	25	9	25	36
8	5	5	6	64	25	25	36
4	9	1	10	16	81	1	100

$$\sum (\sum X) = 17 \quad 17 \quad 11 \quad 22 = 67. \quad \sum (\sum X^2) = 105 \quad 105 \quad 51 \quad 172 = 443$$

$$\sum (\sum X)^2 = 289 \quad 289 \quad 121 \quad 484 = 1183$$

$$[\sum (\sum X)]^2 = 67^2 = 4489$$

$$N = \text{No. total de casos} = 12$$

$$n = \text{No. de elementos de c/grupo} = 3$$

$$K = \text{No. de grupos} = 4$$

La suma total de cuadrados se deduce de la expresión siguiente :

$$\begin{aligned} X^2_t &= [\sum (\sum X^2)] - \frac{[\sum (\sum X)]^2}{N} \\ &= (443) - (4489 \div 12) \\ &= 443 - 374 \\ &= 69 \end{aligned}$$

La suma de cuadrados "entre" grupos se haya mediante la fórmula :

$$\begin{aligned} \sum X^2_e &= \frac{[\sum (\sum X)^2]}{n} - \frac{[\sum (\sum X)]^2}{N} \\ &= (1183 \div 3) - (4489 \div 12) \\ &= 394 - 374 \\ &= 20 \end{aligned}$$

La suma de cuadrados "dentro" de los grupos se puede deducir directamente restando la suma de cuadrados "entre" grupos de la suma de cuadrados total :

$$\begin{aligned}\sum X^2_d &= \sum X^2_t - \sum X^2_e \\ &= 69 - 20 \\ &= 49\end{aligned}$$

Los grados de libertad para cada una de estas operaciones son : Grados de libertad total = número total de casos menos uno ($N-1$), como hay 12 casos = $12-1=11$. Grados de libertad "dentro" de grupos = sumatoria del número de casos de cada grupo menos uno ($n_1-1 + n_2-1 + \dots + n_k-1$), como hay 3 casos en cada grupo, hay 2 grados de libertad en cada uno de ellos, por consiguiente los grados de libertad "dentro" de grupos es de 8. Por otra parte, como existen cuatro grupos, hay 3 grados de libertad "entre" los grupos. Generalizando :

$$g_l \text{ del total de grupos} = N-1 = 11$$

$$g_l \text{ "dentro" de los grupos} = (n_1-1) + (n_2-1) + (n_3-1) + (n_4-1) = 8$$

$$g_l \text{ "entre" grupos} = K-1 = 3.$$

El procedimiento del Análisis de Varianza, presenta la forma de una tabla. En las distintas columnas de la misma se anotan el número de grados de libertad, la suma de cuadrados para cada una de las tres categorías y los cuadrados medios. Estos últimos se obtienen dividiendo ca-

da una de las sumas de cuadrados por el número de grados de libertad correspondiente. Los cocientes son auténticas varianzas. Los cuadrados medios "dentro" y "entre" los grupos constituyen por tanto sendas estimaciones de la varianza de la población (Downie y Heath, 1973).

Origen de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios
"entre" grupos	3	20	6.66
"dentro" de los grupos	8	49	6.12
Total de grupos	11	69	

El contraste de la F de Snedecor se obtiene mediante la evaluación de la tabla del análisis de varianza, haciendo el siguiente contraste de la F.

$$\begin{aligned} F &= \text{Cuadrado medio "entre" grupos} \div \text{cuadrado medio "dentro" de los --} \\ &\quad \text{grupos.} \\ &= 6.66 \div 6.12 \\ &= 1.08 \end{aligned}$$

Los valores de F se interpretan mediante la tabla de la distribución F de Snedecor, para un nivel de 5 por ciento de significancia; en ella se encuentra con el número de grados de libertad correspondiente al cuadrado medio mayor, por la fila superior y con el número de grados de libertad del cuadrado medio menor por la columna de la izquierda. En este proble

ma analizado, los valores son 8 y 3 respectivamente. Se lee el número 4.97 que es el valor de F significativo al nivel 5 por ciento como el valor calculado de F es 1.08, mucho menor que el valor de F crítico citado para esa combinación de grados de libertad, se acepta la hipótesis nula de que, no existen diferencias significativas de las medias al nivel 5 por ciento y por lo tanto las diferencias observadas en el aislamiento de Salmonella con los diferentes caldos y medios de cultivo se deben al azar.

Se sigue el mismo procedimiento estadístico para evaluar los resultados de aislamiento de Shigella considerando todos los grupos, al igual que el análisis de varianza para los resultados de aislamiento de Salmonella y Shigella considerando grupos pareados.

Los análisis de varianza de la F de Snedecor experimental son en todos los casos menores que la F de Snedecor crítica al 5% (ver Cuadros 8 y 9 de Resultados) por lo que se concluye que las diferencias en los aislamientos realizados por las diferentes combinaciones de caldos y medios de cultivo se debieron al azar.

El cuadro 10, resume los resultados del análisis estadístico, aplicando la prueba de T para el contraste de medias aritméticas obtenidas con diferentes caldos, referentes a aislamiento de Salmonella y Shigella. Los datos de los cuadros 4 y 5 de resultados sirven para los análisis presentados en el cuadro 10. Como puede observarse en los cuatro casos, los re

sultados obtenidos están dentro de los límites de confianza determinados por el estadístico T de Student. Por consiguiente se puede usar indistintamente cualquiera de estas combinaciones de caldos con resultados satisfactorios.

VII - CONCLUSIONES

La "Bahía de Jiquilisco" al igual que la mayoría de nuestros esteros, muestra una alta contaminación agroquímica (López Zepeda, 1977) y orgánica. La contaminación agroquímica proviene de los pesticidas y fertilizantes de los algodones y la orgánica de los habitantes de la zona, que viven en condiciones de insalubridad.

Las "Conchas" muestreadas en sus áreas de reproducción en la "Bahía de Jiquilisco" presentaron una alta contaminación fecal proveniente de desechos humanos, que es incrementada por las aves. Es sabido que la flora microbiana de los moluscos guarda relación con el tipo y número de microorganismos del agua en el que hayan estado poco tiempo antes (APHA, 1962), por lo tanto, se puede afirmar que la característica de las aguas de estas áreas es la de estar sucias y contaminadas.

Aún cuando se observa que alrededor de la bahía diversos ríos vierten desechos orgánicos y hay núcleos poblacionales con prácticas inadecuadas de eliminación de excretas, debe considerarse al "Puerto El Triunfo" como el principal introductor de materia fecal; la cual es dispersada por la fuerza de las mareas.

La comparación de los resultados con los estándares de Recuento total de bacterias y NMP de coliformes, dan la pauta para considerar

que de los dos, el NMP de coliformes es más confiable para detectar contaminación fecal.

La Técnica de EC Medium a temperatura elevada fue un mecanismo igual de eficaz y menos laborioso que el Ensayo Diferencial (Prueba IMViC) en la determinación de coliformes provenientes de animales de sangre caliente.

No aislar Staphylococcus aureus en la carne y líquidos de la "Concha", puede deberse a que la contaminación de ésta con esa bacteria no se efectúe dentro del hábitat acuático, sino que fuera de él, debido a un manejo inadecuado en la captura distribución o venta de la "Concha".

No aislar bacterias del género Clostridium, en ninguna de las muestras analizadas, pudo deberse a que no se poseía equipo adecuado para crear condiciones anaeróbicas, que necesita esta bacteria para su desarrollo.

El aislamiento del 92.8 por ciento de S. pullorum y/o S. gallinarum en las muestras analizadas, indican la constante contaminación fecal proveniente de las aves.

S. typhi bacteria cuyo reservorio exclusivo es el hombre (De Araujo, 1975; Barker, 1976; Cordano y Virgilio, 1976), fue aislada en este trabajo en carne y líquidos de "Concha", a catorce días de un -

brote epidémico de Tifoidea en el "Puerto El Triunfo" (Septiembre de 1976). Esto muestra la existencia de un mecanismo indirecto (individuo-agua-alimento-individuo) en la posible transmisión de este microorganismo.

El aislamiento de bacterias S. typhi en 7.1%; S. enteritidis, - 28.6%; S. paratyphi-B o S. typhi-murium, 57.1%; Sh. boydii, 14.3%; Sh. dysenteriae, 28.6% y Sh. sonnei, 85.7% que son bacterias patógenas al hombre y el de S. gallinarum en 64.3% y S. pullorum en 85.7%; ambas ocasionalmente patógenas al hombre (Burnows, 1969; Dondero et al, 1977) justifican el considerar las muestras analizadas como no aptas para el consumo humano. Estas fueron tomadas al azar de diferentes sitios de la bahía, la cual tiene condiciones de insalubridad. Por consiguiente, se infiere que el consumo de alimentos - provenientes de ella son un riesgo potencial para la salud, mientras no se mejoren las condiciones imperantes.

Se obtuvieron diferentes resultados con los diferentes caldos y medios de cultivo empleados en este trabajo para el aislamiento de - Salmonella y Shigella. Se demostró estadísticamente que las diferencias encontradas se debían exclusivamente al azar y por tanto, - cualquier combinación de caldo y medio de cultivo que se emplee, dará resultados satisfactorios en la detección de los microorganismos de interés para este estudio.

VIII - RECOMENDACIONES

Considerar que la alta contaminación fecal encontrada en el presente estudio en las conchas colectadas en la Bahía de Jiquilisco, es un parámetro que indica la posibilidad de que cualquier alimento que se extraiga de ella presentará el mismo riesgo potencial de causar enfermedades entéricas.

Mejorar el abastecimiento de agua y el saneamiento ambiental de esta zona, para evitar en su propio origen el problema de las enfermedades entéricas, que son causadas principalmente, por consumir agua contaminada con heces fecales.

Evitar en lo posible la contaminación de los esteros con materia fecal. Los municipios aledaños a ellos, deben someter sus desperdicios a un tratamiento previo antes de eliminarlos hacia las aguas de las bahías.

Instaurar en los núcleos poblacionales aledaños a los esteros, sistemas de eliminación de excretas que eviten que estas se pongan en contacto directo con las aguas de ellos.

Eliminar los factores que contribuyen a la contaminación de las "Conchas", para que el consumo de estas sea incrementado. Lo cual sería una medida tendiente a erradicar la desnutrición de nuestro pueblo, debido a que estos moluscos tienen un gran valor nutritivo.

Adecuar la tecnología necesaria a nuestro país, para sustituir la costumbre de colocar las "Conchas" en "chiqueros" (actualmente - en uso por algunos lugareños que se dedican a su captura y/o comercialización), por la construcción de tanques de purificación. Mientras no se tengan dichos tanques, una medida efectiva para consumir moluscos sanos, sería la de mantenerlos en aguas limpias o cloradas por 4 días antes de su consumo.

Proteger la salud de los consumidores de moluscos, realizando análisis que determinen su calidad sanitaria. Los análisis bacteriológicos recomendados son : la técnica del IMIP de coliformos acompañada por la del aislamiento de Salmonella.

Realizar estudios multidisciplinarios de tipo socio-económico y ecológicos, que den los lineamientos básicos para el desarrollo de una explotación racional de este recurso.

IX - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) American Public Health Association. 1962. Recommended procedure for the bacteriological examination of shell fish and shell fish waters (Revision of recommended methods of procedure. Report of the Standard Methods Comitee for the Examination of shell fish). American Journal of Public Health, 37 (9) : 1121-1129.
- 2) APHA, AWWA, WPEF, 1963. Métodos Estandar para el examen de Aguas y aguas de desecho. Edit. Interamericana, S. A. México, D.F.
- 3) Barker, W. H. 1977. Perspectivas de la epidemiología y control de las enfermedades entericas agudas. Bol. Ofic. Sanit.Panam. 80 (2) : 93-104.
- 4) Barnes, R.D. 1969. Zoología de los Invertebrados. 2a. Edic. - Edit. Interamericana, S. A. México, D. F.
- 5) Béhar, M. 1975. Importancia de la alimentación y la nutrición en la patogenia y prevención de los procesos diarreicos, Bol. Ofic. Sanit. Panam. 78 (4) : 334-342.
- 6) Berg, R. W. and A. W. Anderson, 1972. Salmonellae and Edwardsiella tarda in Gulf Feces: a Source of Contamination in Fish Processing Plants. Appl. Microbiol. 24 : 501-503.
- 7) Buchanan, R.E. & N.E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Eight edition. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- 8) Burdon, K. L. y R. P. Williams, 1971. Microbiología. Publicaciones Cultural, S. A. México, D. F.
- 9) Burrows, W. 1969. Tratado de Microbiología. N. E. Interamericana, S.A. de C.V. México, D.F.
- 10) Carpenter, P. L. 1969. Microbiología. Editorial Interamericana, S. A. México, D. F.

- 11) Colwell, R.R. and J. Liston. 1960. Microbiology of shell fish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific Oyster (Crassostrea gigas) appl. Microbiol. 8 : 103-109.
- 12) Cordano, A.M. y R. Virgilio. 1976. Relaciones ecológicas de Salmonella en Chile. Bol. Ofic. Sanit. Panam. 81 (1) : 44-49.
- 13) Corn Refiners Association, Inc. 1971. Standard Microbiological Methods of the Member Companies Corn Refiners Association, Inc. Washington D.C.
- 14) De Araujo, H., N.L. 1975. Situación actual de las infecciones entéricas. Bol. Ofic. Sanit. Panam. 78 (4) 294-306.
- 15) Difco Laboratories. 1953. Difco Manual 2a. Edition, Difco Laboratories. Detroit, Michigan U.S.A.
- 16) Dondero, N.C. et al. 1977. Salmonella in surface waters of Central New York State. Appl. Microbiol. 33: 791-801.
- 17) Downie, N.M. v R.W. Heath. 1973. Métodos Estadísticos Aplicados. Harper y Row Publisher. Suc. New York.
- 18) Du Pont, H.L. 1975. Estudios necesarios para enriquecer el conocimiento de las infecciones entéricas y reducir sus consecuencias en términos de morbilidad y mortalidad. Bol. Ofic. Sanit. Panam. 78 (4) : 346-349.
- 19) Dutka, B. and J. Bell. 1973. Isolation of Salmonellae from moderately polluted waters. J. Water Pollut Control Fed. 45: 316-324.
- 20) Edwards, P.R. and M.H. Ewing. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. 3ra. Edition. Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minn.
- 21) Elliot, P.R. 1966. Bacteriological Analytical Manual. Bureau of Regulatory Compliance, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Food and Drug Administration.

- 22) Estrada, M.E. y J.R. Alegria, 1975. Análisis Microbiológico de una muestra de "Concha" Anadara tuberculosa Sowerby, obtenida en un mercado capitalino. Informe preliminar, Biblioteca Depto. Biología, Fac. CC. y HH. Univ. de El Salvador.
- 23) Facultad de Medicina, 1967. Manual de Microbiología Médica. -- Depto. de Microbiología, Fac. de Medicina, Univ. de El Salvador.
- 24) Faich, G.A. et al. 1974. Tendencias de la disentería de Shiga en El Salvador. Bol. Ofic. Sanit. Panam. 76 (4) : 331-336.
- 25) Fernández, B. & T. Brunker. 1977. Estudio bacteriológico de Bivalvos del Golfo de Nicoya, Costa Rica. I. Condición del Molusco recién colectado. Rev. Biol. Trop. 25: 101-108.
- 26) Frazier, W.C. 1972. Microbiología de los alimentos. 2a. Edición, Edit. Acribia. Saragoza, España.
- 27) Gallagher, T. and D. Spino. 1968. The Significance of numbers of Coliform bacteria as an indicator of enteric pathogens - Water Res. 2: 169-175.
- 28) Gangarosa, E. J. 1976. Perspectivas del Problema global de las enfermedades entéricas, 1975. Bol. Ofic. Sanit. Panam. 80 (2) : 397-402.
- 29) Gebhardt, L.P. 1972. Microbiología. 4a. Edición. M.E. Interamericana, S.A. de C.V. México, D.F.
- 30) Geldreich, E.E. 1965. Detection and significance of fecal Coliform Bacteria in Stream Pollution Studies. Journal WPCF 37 (12) : 1722-1726.
- 31) Gierloff-Emden, H.G. 1976. La Costa de El Salvador. Minist. de Educ. Direc. de Publicaciones, San Salvador.
- 32) Grados, B.O. 1975. El Laboratorio en los programas de control de las infecciones entéricas. Bol. Ofic. Sanit. Panam. 78 (4) : 318-322.

- 33) Grannet K. and B.B. Nielsen. 1969. Salmonella Types Isolated from the Gulf of Aarhus compared with types from infected - human. Beings, Animals, and Feed Products in Denmark. Appl. Microbiol. 18 : 985-990.
- 34) Hernández, R.A. y M.G. Calderón, 1974. Inventario Preliminar de la Flora y Fauna Acuática de la Bahía de Jiquilisco. Serv. de Rec. Pesq. Direc. Gral. de Rec. Nat. Renov. Minist. de - Agr. y Ganad. Soyapango, El Salvador, C.A.
- 35) Hickman, C.P. 1967. Principios de Zoología. Edic. de la Univ. de Chile, Edic. Ariel, S.A., Barcelona, España.
- 36) Lewis, K.H. and R. Angelotti. 1964. Examination of Foods for Enteropathogenic and Indicator Bacteria. Review of Methodology and Manual of Selected. Procedures, U.S. Dept. of - Health Education, and Welfare Public Health Service, Washington, D.C. Publication, No. 1142.
- 37) López Zepeda, E. 1977. The ecological impact of cotton cultivation in El Salvador : The example of Jiquilisco. Tesis de Maestría. York University, Toronto, Canada. 110 páis.
- 38) Lynch, M.J. et al. 1972. Métodos de Laboratorio. 2a. Edic. N.E. Interamericana, S. A. de C.V. México, D.F.
- 39) Ministerio de Agricultura y Ganadería. 1972. Plan Racional de Manejo en los Manglares. Alcance No. 1, San Salvad.
- 40) Ministerio de Agricultura y Ganadería. 1975. Anuario Pesquero de El Salvador. Servicios de Informática y Rec. Pesq. -- Direc. Gral. de Rec. Nat. Renov., Minist. de Agric. y Ganad. Soyapango, El Salvador, C. A.
- 41) Martínez, J.M. 1973. Estudio epidemiológico de disentería bacilar. Bol. Ofic. Sanit. Panam. 75 (3) : 213-224.
- 42) Mendoza, H.P. 1975. Diagnóstico clínico y terapéutica. Rehidratación oral e intravenosa. 1. Salmonelas : S. typhimurium y S. typhi, 2- Shigelas : S. dysenteriae 1; 3- Vibrio cholerae; 4- Infecciones entéricas por otras causas, incluyendo el cuadro denominado "diarrea de los viajeros". Bol. Ofic. Sanit. Panam. 78 (4) : 307-317.

- 43) Merck, E. Manual de Microbiología. E. Merck, Darmstadt (R.F. de Alemania).
- 44) Morris, P.A. 1966. A Field Guide to Pacific Coast Shells (including Shells of Hawaii and Gulf of California), 2a. Edition. National Audubon Society and National Wildlife Federation Houghton Miffling Company Boston, U.S.A.
- 45) Organización Panamericana de la Salud. 1970. El Control de las Enfermedades Transmisibles en el hombre. Pub. Cient. 252. Organización Panamericana de la Salud, Ofic. Sanit. Panam. - Washington, D.C.
- 46) Paniagua, A.F. et al. 1976. Estudio epidemiológico de Shigella dysenteriae 1 en dos comunidades de la Provincia de Guanacaste, Costa Rica, 1975. Bol. Ofic. Sanit. Panam. 31 (5) : - 494-502.
- 47) Presnell, M.W. et al. 1967. Clostridium botulinum in marine sediments and in the oyster (Crassostrea virginica) from Mobile Bay. Appl. Microbiol. 15 (3) : 668-669.
- 48) Presnell, M. and J. Miescier. 1971. Coliforms and fecal coliforms in oyster-growing area. J. Water Pollut Control Fed: 43: 407-416.
- 49) Rodríguez, C.R. y E. Fernández E. 1968. Estudio bacteriológico de la calidad sanitaria de los ostiones consumidos en la ciudad de México, Rev. Lat-Amér. Microbiol. Parasitol. 10 (2) : 93-100.
- 50) Rubio, M. R. 1967. Breve estudio sobre microbiología y conservación del pescado y otros productos marinos. Tesis Doctoral. Fac. de Química y Farmacia. Univ. de El Salvador. 2º páq.
- 51) Scrimshaw, N.S. y V.R. Young. 1976. Las necesidades de la nutrición humana. Investigación y ciencia. edic. en español de Scientific American. 1(2) : 31-45.
- 52) Sherwood, H.P. y S. Thomson, 1953. Bacteriological examination of Shell-fish as a basis for sanitary control. Monthly Bull of the minist. of Health and the Public Health Lab. Serv. 103-111.

- 53) Spino, D.F. 1966. Elevated-Temperature Technique for the isolation of Salmonella from streams. *Appl. Microbiol.* 14 : 591-596.
- 54) Stanley, S.S. 1971. *Atlas of Diagnostic Microbiology*. Published by Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois.
- 55) Storer, T.I. y R.L. Usinger, 1971. *Zoología General*, 7a. Edic. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España.
- 56) Taylor, H.I. and D. Schelhart. 1968. Isolation of Shigellae, V. Comparison of Enrichment Broths with Stools. *Appl. Microbiol.* 16: 1383-1386.
- 57) Trollier, J.J. and W.C. Frazier. 1962. Repression of Staphylococcus aureus by Food Bacteria II. Causes of Inhibition. *Appl. Microbiol.* 11: 153-165.
- 58) U.S. Department of Health, Education, and Welfare. 1969. Bacteriological Analytical Manual. Second edition, Washington, D.C. 20204.
- 59) Vanderpost, J.M. and J.B. Bell. 1977. Bacteriological Investigation of Alberta Meat-Packing Plant Wastes With emphasis on -- Salmonella Isolation. *Appl. Microbiol.* 33: 538-545.
- 60) Ward, B. Q. and B.J. Carroll. 1965. Presence of Clostridium botulinum Type E in estuarine waters of the Gulf of México, -- *Appl. Microbiol.* 13 : 502.
- 61) Wortman, S. 1976. *Alimentación y Agricultura*. Investigación y Ciencia, 6^{ed}, en español de Scientific American 1 (2) : 7-17.

X - APENDICE

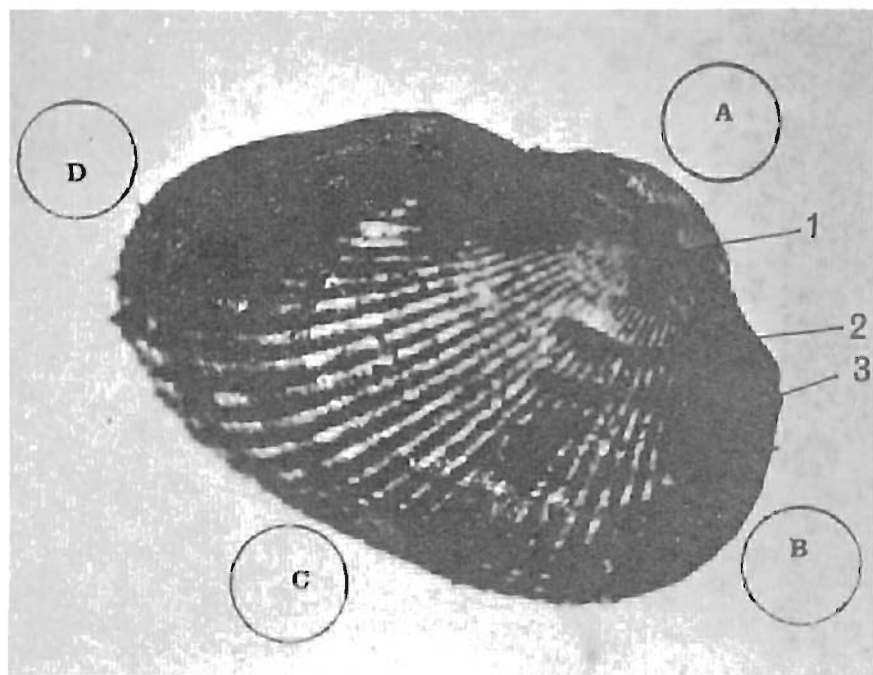


Fig. 1. Vista lateral de la superficie -- externa de una valva derecha. A- Parte dorsal. B-Parte anterior.C- Parte Ventral. D-Parte Posterior. 1-Umbo. 2- Líneas de crecimiento - 3- Costillas.

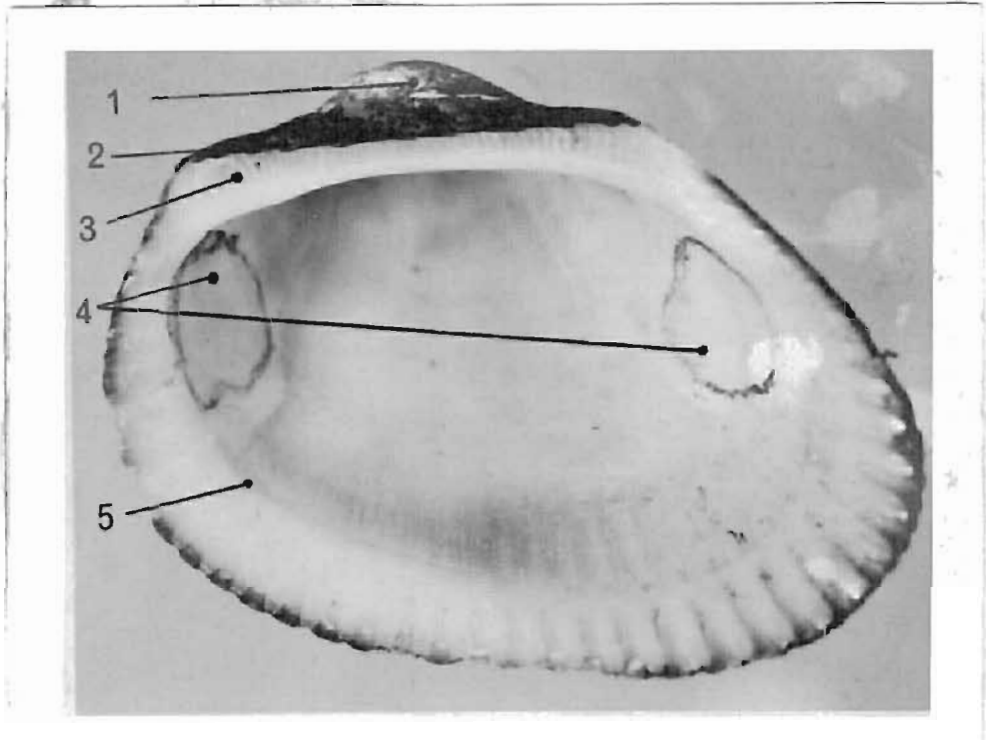


Fig. 2. Vista lateral de la cara interna de una valva. 1-Umbo. 2- Ligamento de la Charnela. 3- Dientes de la Charnela. 4- Impresiones de inserciones musculares. 5- Línea Paleal.

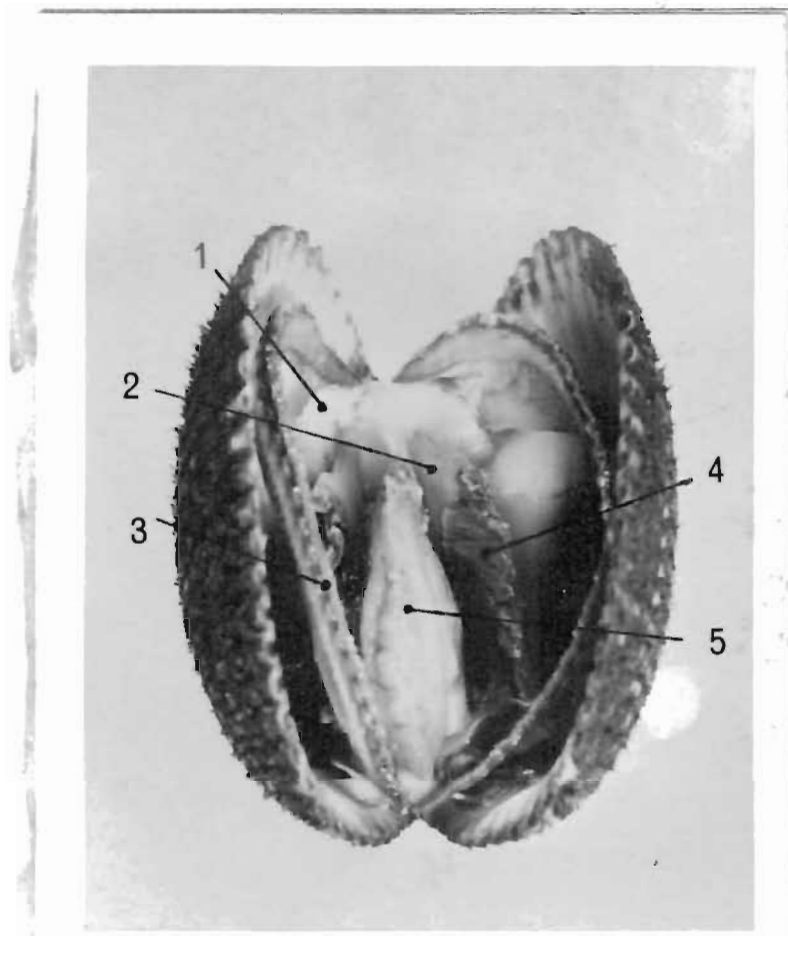


Fig. 3. Vista ventral de Valvas y Cuerpo de la "Concha". 1- Músculo aductor posterior. 2- Palpo. 3- Borde del Manto. 4- Branquias. 5- Pie.

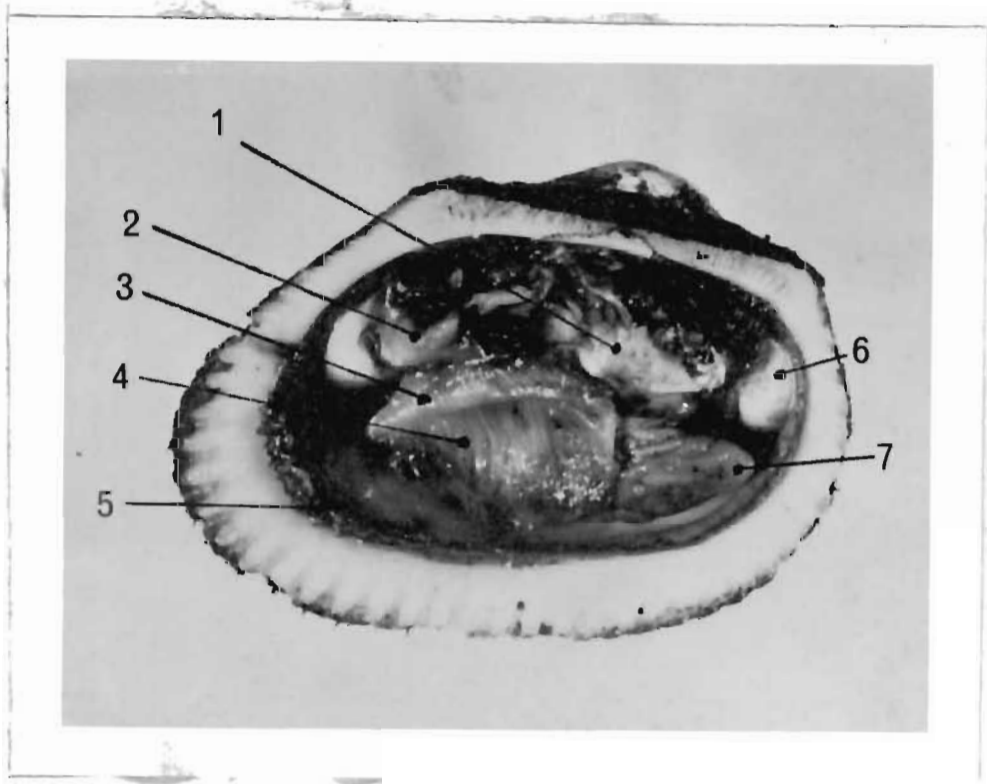


Fig. 4. Vista Lateral del Cuerpo de la "Concha". 1- Masa Visceral. 2- Músculo aductor posterior. 3- Palpo. 4- Branquia. 5- Manto. 6- Músculo aductor anterior. 7- Pie.

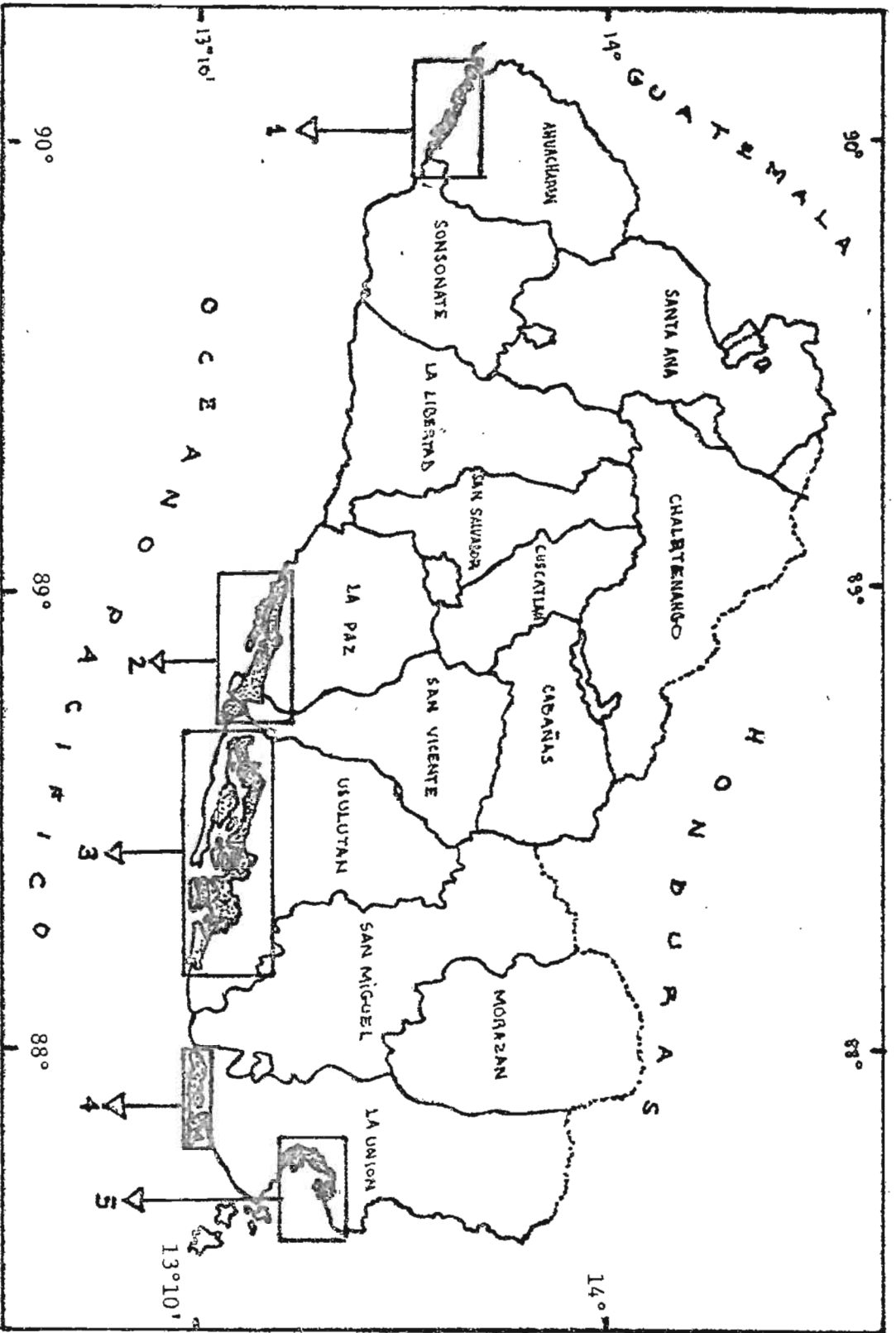


Fig. 5. "Bosques Salados" más importantes de El Salvador, en los cuales se reproduce la "Concha".
 (Fuente. M.A.G. Plan Racional de Manejo de los Manglares, 1972).

- | | |
|----|------------------------|
| 1) | "Barra de Santiago" |
| 2) | "Estero de Jaltepeque" |
| 3) | "Bahía de Jiquilisco" |
| 4) | "Estero el Tamarindo" |
| 5) | "Bahía de la Unión" |

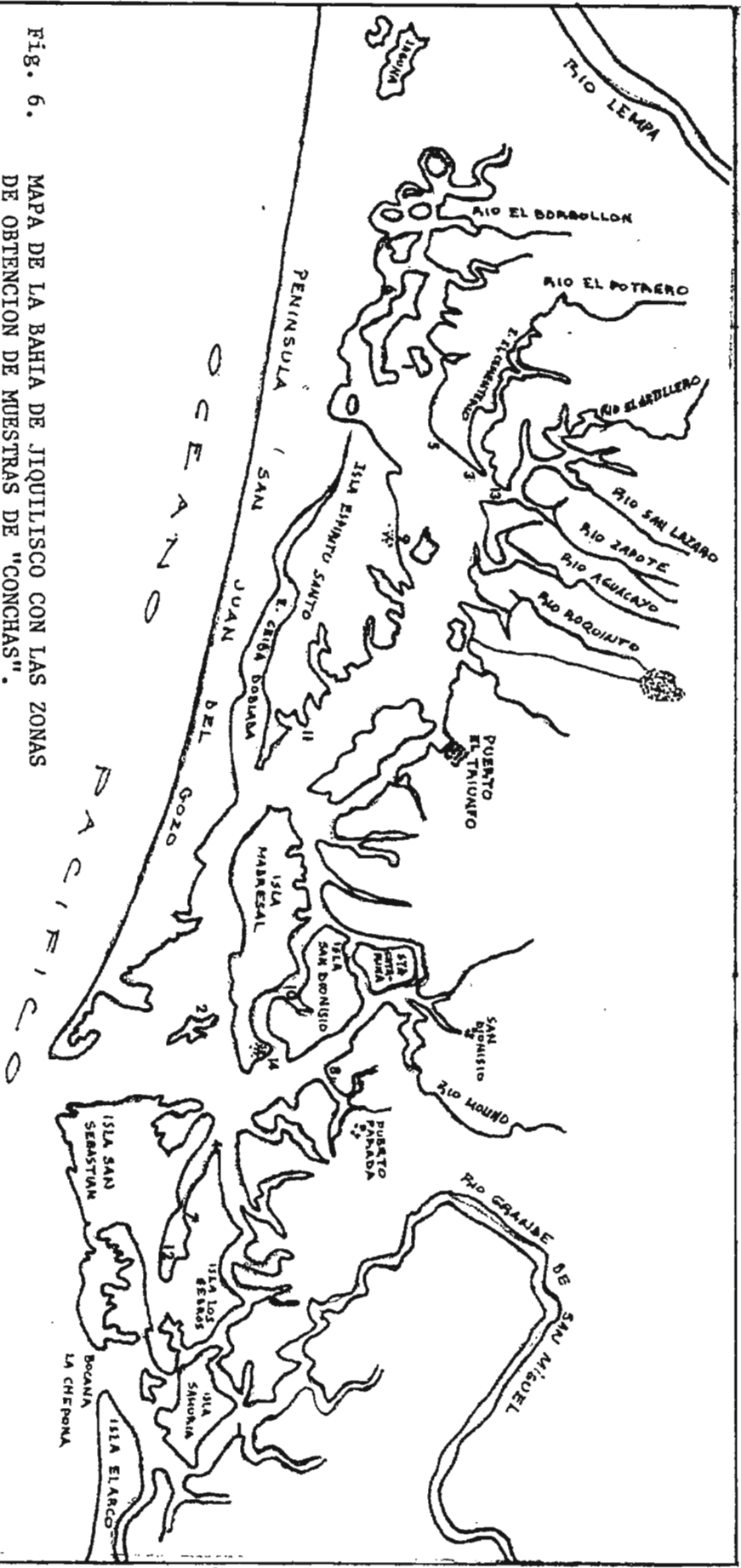


Fig. 6. MAPA DE LA BAHIA DE JIQUILISCO CON LAS ZONAS DE OBTENCION DE MUESTRAS DE "CONCHAS".

- | | |
|--------------------|---------------------|
| 1- Isla El Manglar | 8- El Guayabón |
| 2- Isla pajarito | 9- Isla de Méndez |
| 3- Tres Enganches | 10- Canal del Chile |
| 4- La Caramba | 11- La venadóna |
| 5- Guayabo | 12- Rinconada |
| 6- Pelota de Limón | 13- El Potrero |
| 7- Rincón Grande | 14- Rancho Viejo |

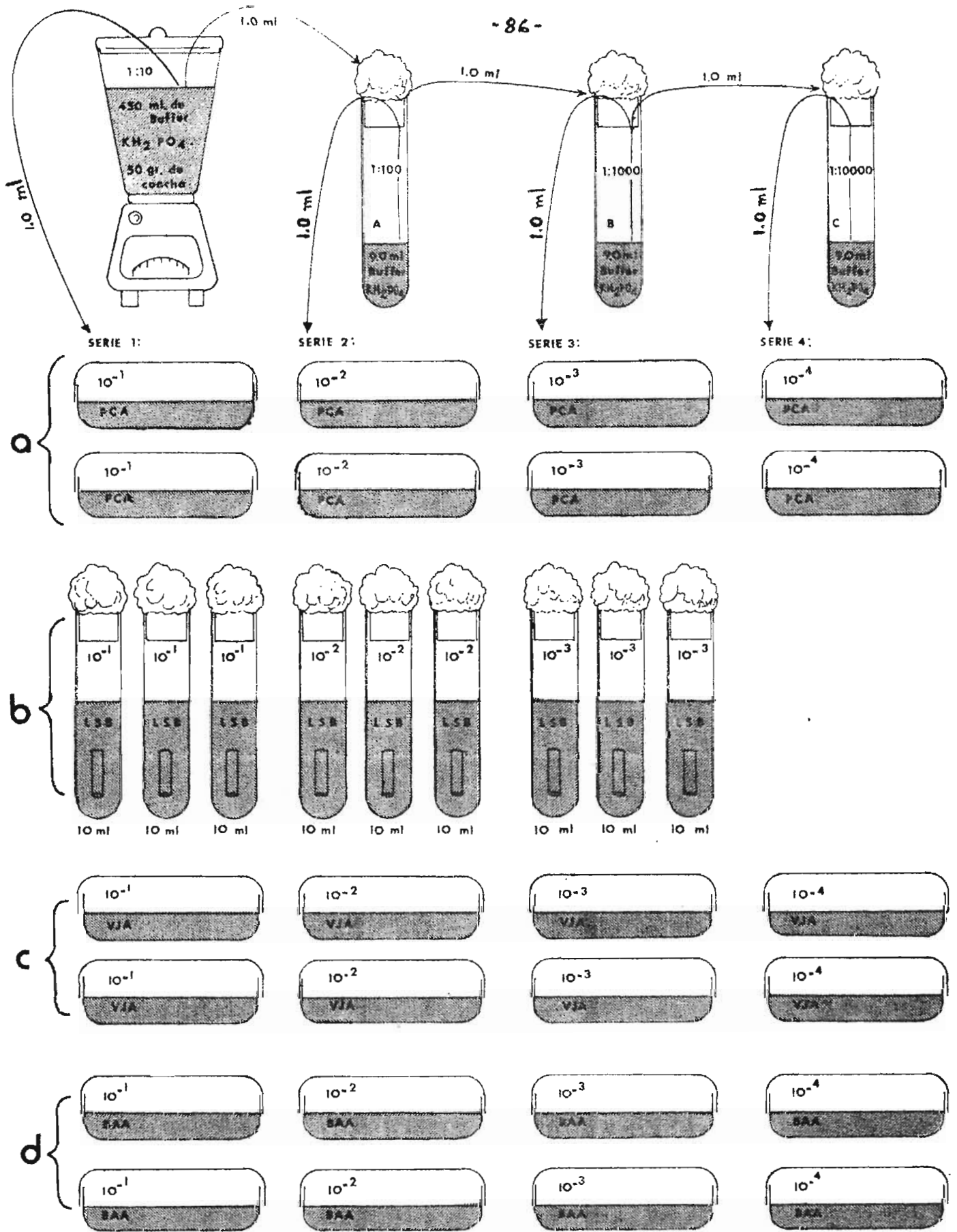


Fig. 7. ESQUEMA DE INOCULACION DE MEDIOS DE CULTIVO, para realizar las experiencia: a) Re-
cuento total, b) Coliformes (Técnica de tubos múltiples de fermentación), c) Estafí-
lococos coagulasa positiva, d) Clostridium. Se agrega 450 ml. de Buffer a 50 gr. de
"conchas", se licúa por 2 mts. se logra dilución de 1:10, se mezcla 1 ml. de esta di-
lución con 9.0 ml. de Buffer del tubo A y se obtiene dilución de 1:100; por este -
procedimiento se hacen dos diluciones hasta llegar a 1:10000 en el tubo C. A ca-
da uno de los elementos de cada serie se le pone 1 ml. de su respectiva dilución.

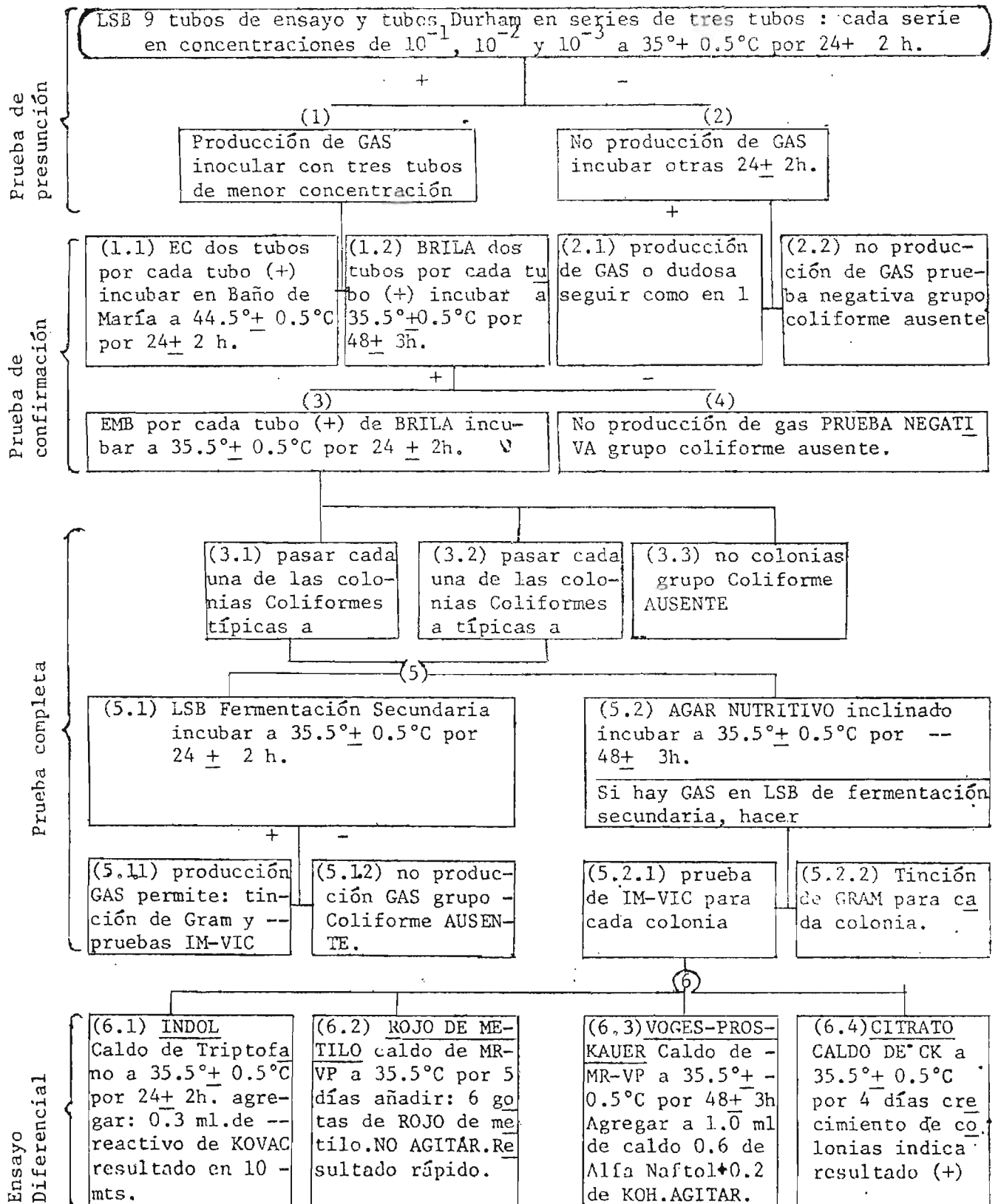


Fig. 8. ESQUEMA DE ANALISIS PARA LA DETECCION DE COLIFORMES. Análisis recomendado por APHA (1963). El numeral (1.1) es opcional, pero sirve para determinar con rapidez y efectividad la presencia de coliformes procedentes de animales de sangre caliente. Los tubos de ensayo de los numerales (1.1), (1.2) y (5.1) llevan tubos Durham en su interior. La prueba de Voges-Proskauer (6.3) presenta un resultado rápido, pero se esperan 4 horas para reafirmarlo.

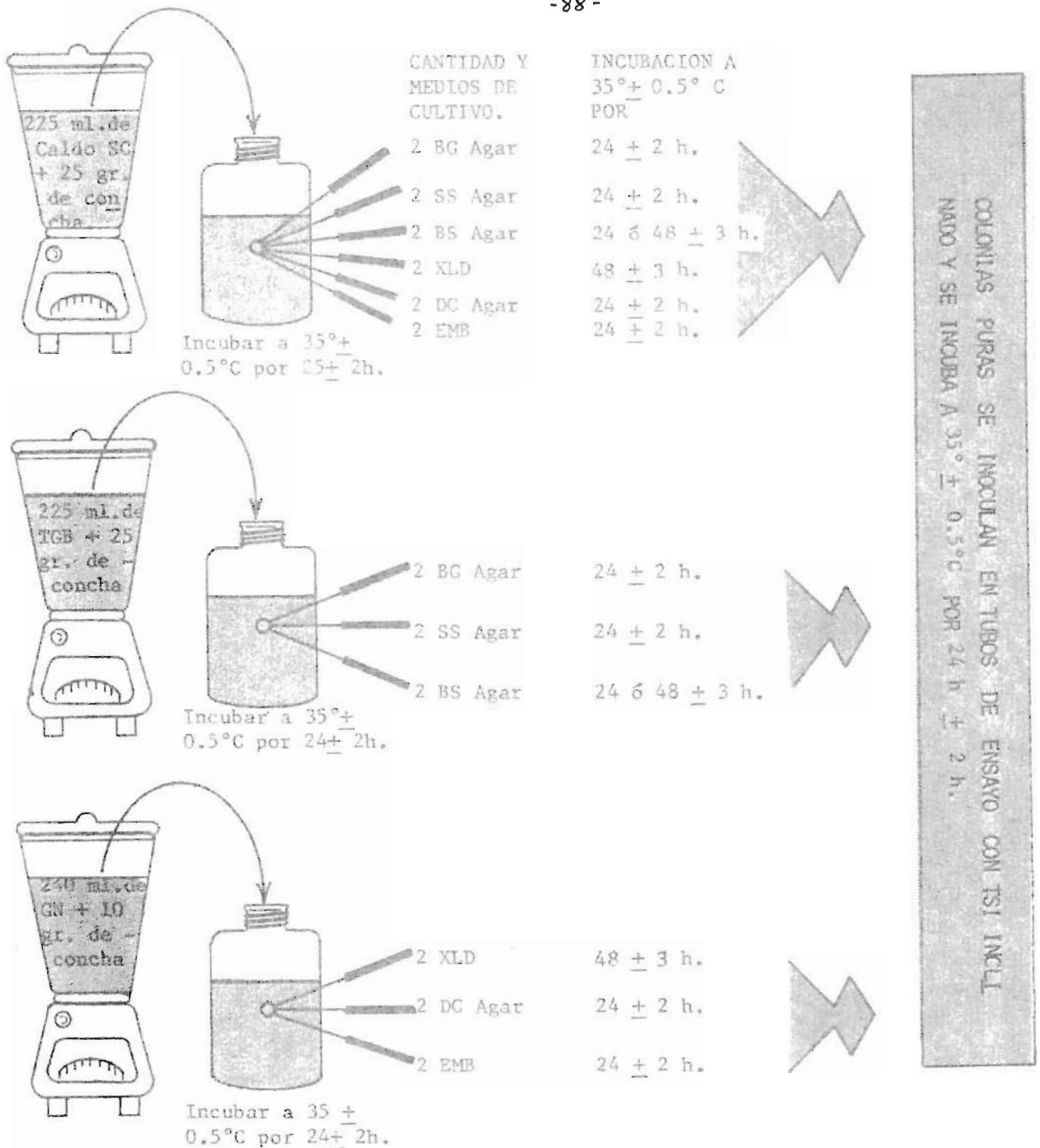


Fig. 9. Esquema del análisis para determinar presencia de Salmonella y Shigella. La muestra se licua con los diferentes caldos. Se trasvasa a los diferentes botes, se incuba a 35° ± 0.5° C por 24 ± 2 h. Se inoculan 2 cajas de Petri de cada uno de los agares selectivos y se incuban a 35° ± 0.5° C según el tiempo estipulado. Cada una de las colonias puras se pasa a TSI.

TABLA DE MATERIALES PARA ANALISIS DE DOS MUESTRAS CADA QUINCE DIAS.-

Medio a usar.	Cantidad y capacidad en ml. de erlenmeyers a usar.	Cantidad de cristalería a usar.	ml. de medio para cada uno de cristalería.	ml. de medio total a preparar	Gr. de medio por 100 ml.	Gr. de medio a usar	Esterilización.-	
							°C	Minutos
PCA (Difco)	2 x 1000	18 p	20	360	2.4	8.6	121	15
LSB (Merck)	1 x 500	40 t+td	10	400	3.6	14.4	121	15
VJA (más telurito de potasio) (BBL)	1 x 1000	18 p	20	360	6.1	22.0	121	15
BAA (Difco)	1 x 1000	18 p	20	360	5.8	20.9	121	15
SCB (Merck)	2 x 500	2 b	225	450	1.5	6.8	121	15
TBG (+)	2 x 500	2 b	225	450	-	-	-	-
GN (BBL)	2 x 500	2 b	240	480	3.9	18.7	116	10
EC Medium (Difco)	1 x 250	16 t+td	6	100	3.7	3.7	121	15
BRILA (Merck)	1 x 250	16 t+td	6	100	4.0	4.0	121	15
EMB (Difco)	1 x 1000	25 p	16	400	3.6	14.4	121	15
NA (Difco)	1 x 1000	40 t i	6	240	2.3	5.5	121	15
BT (Difco)	1 x 250	16 t	6	100	1.0	1.0	-	-
MR-VP (BBL)	1 x 500	32 t	6	200	1.7	3.4	121	15
CK (Merck)	1 x 250	16 t	6	100	.6	.6	121	15
BGA jar (Difco)	1 x 500	10 p	16	160	5.8	9.3	121	15
SS Agar (Difco)*	1 x 500	10 p	16	160	6.0	9.6	-	-
BS Agar (Difco)*	1 x 500	10 p	16	160	5.2	8.3	-	-
XLD (Difco)*	1 x 500	10 p	16	160	5.7	9.1	-	-
DC Agar (Difco)*	1 x 500	10 p	16	160	4.5	7.2	-	-
TSI (Difco)	1 x 1000	30 t i	15	450	6.5	29.3	121	15

CUADRO 1. En esta tabla se mencionan los diferentes medios y la casa que los distribuye, así como la cantidad y capacidad de los matraces erlenmeyers que se emplean para prepararlos; se especifica la cantidad y tipo de cristalería que se usa, la cantidad de medio de cultivo para cada unidad y para su total. La información de cuantos gramos de medio se añaden a 100 ml. de agua destilada para hidratarlo y la del total de medio que se ocupa, sirven para determinar la cantidad en gr. que hay que pesar. Se indica si los medios se esterilizan y cuantos °C y tiempo se mantienen en autoclave. (p = cajas petri), (b = botes), (t = tubos de ensayo), (t+td = tubos con tubos Durham), (t i = tubos inclinados), (t = preparado según fórmula).

SOLUCION MADRE O AMORTIGUADORA

34.0 gr. de fósforo monobásico de potasio.

(KH_2PO_4) disolver en

500.0 ml. de agua destilada.

Ajustar a pH 7.2 aproximadamente con 175 ml. de NaOH 1N y se diluye en un litro de agua destilada. Esta solución se debe mantener en refrigeración.

SOLUCION DILUIDA AMORTIGUADA

1.25 ml. de solución madre, aforarlo en

1.0 L. de agua destilada.

Las diluciones de esta agua amortiguada, se distribuyen en porciones que permiten obtener después de 15 minutos a 121°C de esterilización, volúmenes de 99± 2.0 ml. o de 9± 0.2 ml.

CUADRO 2. Fórmulas y Técnica para preparar la solución madre o amortiguadora para diluciones (APHA, 1963).

TELURITO DE POTASIO.

Telurito de Potasio (se guarda en refrigeración)

0.1 gr de Telurito de Potasio

10.0 ml de agua destilada.

Por cada 100 ml preparados de agar selectivo para Staphylococcus según Vogel-Johnson (VJA) se le agregan, antes de poner el medio en las cajas de Petri, 2.0 ml de Telurito de Potasio.

PRUEBA DE LA COAGULASA.

Consiste en la combinación de células de cultivo bacteriano con plasma citratado de humano o de conejo.

A- En lámina

- 1- Se coloca una gota de solución salina en cada uno de los extremos de la lámina.
- 2- Se emulsiona una pequeña cantidad del cultivo sospechoso en cada gota de solución salina.
- 3- Se agrega una de plasma en una de ellas.

La prueba positiva se manifiesta por la formación de pequeños coagulos en menos de un minuto.

B- En Tubo

- 1- Se pone con una pipeta 0.5 ml de plasma en cada uno de los tubos pequeños.
- 2- Se inocula uno de ellos con una asada del cultivo sospechoso.
- 3- Se incuba en Baño de María por $37^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
- 4- Se observa cada 15 minutos hasta por 24 ± 2 horas.

La coagulación total o parcial del coagulo se interpreta como una prueba positiva.

CUADRO 3 . Fórmula para preparar el Telurito de Potasio y Método de la prueba de la Coagulasa (Facultad de Medicina, Manual de Microbiología Médica, 1967).

REACTIVO DE TINCION DE GRAM

A- OXALATO DE AMONIO-VIOLETA CRISTAL

2.0 gr. de violeta cristal (85% de colorante), disolver en 20.0 ml. de alcohol etílico al 90%. Una solución 10 veces menor que ésta se combina en igual cantidad que la siguiente solución:

0.2 gr. de oxalato de amonio, disolver en 20.0 ml. de agua destilada.

B- SOLUCION DE LUGOL (modificación de Gram)

1.0 gr. de yodo en cristales

2.0 gr. de yoduro de potasio, disolverlos en 300.0 ml. de agua destilada

Triturar el yodo y el yoduro de potasio en un mortero hasta obtener una mezcla homogénea y agregar el agua poco a poco.

C- ANTICOLORANTE (SAFRANINA)

2.5 gr. de safranina, disolver en 100.0 ml. de alcohol etílico al 95%.

Se agregan 10 ml. de solución de alcohol-safranina a 100 ml. de agua - destilada, se agita la solución, se filtra y se conserva en frasco de vidrio ámbar. Se le puede agregar un cristal de alcáñfor como preservativo.

D- ALCOHOL ETILICO AL 95%

TECNICA DE TINCION DE GRAM

- 1- Fijar frotis con calor
- 2- Cubrir la preparación con solución de oxalato amonio-violeta cristal, dejar actuar por un minuto.
- 3- Lavar con agua de chorro
- 4- Agregar solución de lugol y dejar un minuto
- 5- Lavar con agua de chorro
- 6- Decolorar por 30 segundos con alcohol etílico, con agitación ligera.
- 7- Lavar con agua de chorro
- 8- Cubrir con el anticolorante (safranina) por 30 segundos
- 9- Lavar con agua y secar al aire
- 10- Examinar con objetivo de inmersión.

RESULTADO

Células que se decoloran y aceptan la tinción de safranina son Gram (-)

Células que no se decoloran y aceptan la tinción del violeta cristal son gram (+).

CUADRO 4. Fórmulas de Reactivos y Técnica Para Realizar la Coloración de Gram (modificación de Hucker) (Fuente : APHA, 1963).

1- REACTIVO DE KOVAC (se guarda en refrigeración)

1.25 gr. de paradimetil-amino benzaldehido

19.0 ml. de Alcohol amílico (n)

6.0 ml. de ácido clorhídrico

Disolver el paradimetil-amino benzaldehido en el alcohol amílico;añadir el HCL. Para tener seguridad de que el reactivo está en buenas condiciones de uso, se debe probar sobre una muestra conocida de Indol. A 5.0 ml. de cultivo se le añaden 0.3 ml. de reactivo.

Color rojo oscuro, reacción positiva (+)

Color original, reacción negativa (-)

Color anaranjado, reacción intermedia (+) por presencia de escatol.

2- REACTIVO DE VOGES-PROSKAUER

a) Solución de Alfa naftol (se guarda en refrigeración)

5.0 gr. de Alfa naftol

100.0 ml. de alcohol etílico de 95%

Esta solución dura 2 a 3 semanas sin deteriorarse.

b) Solución de KOH

40.0 gr. de KOH

100.0 ml. de agua destilada

A 1.0 ml. de cultivo se le añaden 0.6 ml. de Alfa naftol y 0.2 ml. de KOH, se agita, reacción en 15 minutos, pero para dar por negativo el resultado se esperan 4 horas como máximo.

Color rojo a carmesi reacción positiva (+)

Sin cambio reacción negativa (-)

3- SOLUCION INDICADORA DE ROJO DE METILO

0.1 gr. de rojo de metilo

300,0 ml. de alcohol etílico de 95%

200.0 ml. de agua destilada

Disolver el rojo de metilo en el alcohol, después se le agrega el agua. a 5.0 ml. de cultivo se le añaden 5 gotas de reactivo. No agitar.

Color rojo reacción positiva(+)

Color amarillo reacción negativa (-)

4- CALDO DE CITRATO DE KOSSER (CK) Merck

Crecimiento en tubo, se denota por enturbiamiento de éste.

Enturbiamiento en tubo, reacción positiva (+)

Tubo límpido, reacción negativa (-)

1- SOLUCION DE I-KI (Guardar en bote ámbar)

20.0 gr. de KI (Ioduro de potasio)

24.0 gr. de Iodo sublimado

100.0 ml. de Agua destilada esterilizada

2- SOLUCION DE VERDE BRILLANTE (Guardar en bote ámbar)

0.1 gr. de Verde Brillante

100.0 ml. de Agua destilada esterilizada

3- CALDO DE TETRACIONATO

5.0 gr. de Peptona

1.0 gr. de Mezcla de Sales Biliares

10.0 gr. de Carbonato de Calcio (CaCO_3)

30.0 gr. de Tiosulfato de Sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 - 5\text{H}_2\text{O}$)

1000.0 ml. de Agua destilada

Los Ingredientes del Caldo se agitan y se mezclan uniformemente, se calientan a ebullición y se enfrían a temperaturas menores de 45°C . El Caldo así preparado, se almacena en refrigeración en Temperaturas entre $5^\circ\text{a } 8^\circ\text{C}$. Antes de su uso, se le añaden a un litro de caldo, 20.0 ml. de Solución I-KI y 10.0 ml. de Solución de Verde brillante.

CUADRO 6. Fórmula para preparar el Caldo de Enriquecimiento tetracionato verde brillante-bilis (TBG). (Según: K.B. Ghazarian, Profesor de Microbiología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad de El Salvador, 1976).

Medio de cultivo	Características de la colonia	Géneros
1) BG Agar Brilliant Green Agar	Rosa pálido, transparente con halo rojo.	Lactosa-negativos: <u>Salmonella</u>
2) SS Agar <u>Salmonella-Shigella</u> (se conserva solo - una semana en refrigeración).	Incoloras transparentes Transparentes con centro negro	<u>Shigellas</u> y may <u>Salmonellas</u> . <u>Proteus</u> y alg. <u>Salmonellas</u> .
3) BS Agar Bismuto Sulfito Agar	Color negro, borde claro, precipitado negro, con brillo metálico - alrededor de las colonias (ojo de conejo o de pez).	<u>Salmonellas</u> con excepción de <u>S. paratyphi A.</u> - <u>S. pullorum</u> .
4) XLD Agar-Xilosa- Lisina-Desoxicolato	Con el color del medio de cultivo, transparente a veces con centro negro. Con el color del medio de cultivo, transparentes. Anaranjadas, ligeramente opacas.	<u>Salmonella</u> . <u>Shigella</u> , <u>Providencia</u> y <u>Pseudomonas</u> . <u>S. typhi</u> .
5) DC Agar Agar-Desoxicolato- Lactosa	Incoloras	Lactosa-negativos: <u>Salmonella</u> , <u>Shigella</u> , <u>Proteus</u> , <u>Pseudomonas</u> .
6) EMB Agar-Eosina-Azul de Metileno-Lactosa-Sacarosa.	Transparentes, ambarinas	<u>Salmonella</u> , <u>Shigella</u>

CUADRO 7. Identificación de características morfológicas de colonias Salmonella-Shigella creciendo en medios de cultivo selectivo. (Fuente : Merck, Manual de Microbiología).

Espece	Zona columnar	Superficie inclinada	Formación de H ₂ S
<i>S. typhi</i>	A	OAL	+ Solamente en la parte superior de la columna de medio de cultivo, frecuentemente, formación de anillo, a veces, sólo al cabo de 48 horas.
<i>S. paratyphi-A</i>	AG	OAL	-
<i>S. cholerae-suis</i>	AG	OAL	-
<i>S. pullorum</i>	AG	OAL	+ } Columna de medio de cultivo, negra.
<i>S. paratyphi-B</i>	AG	OAL	
<i>S. typhi-murium</i>	AG	OAL	
<i>S. enteritidis</i>	AG	OAL	
<i>S. gallinarum</i>	A	OAL	
<i>Sh. dysenteriae</i>	A	OAL	-
<i>Sh. schmitzii</i> (ambigua)	A	OAL	-
<i>Sh. boydii</i>	A	OAL	-
<i>Sh. flexneri</i>	A	OAL	-
<i>Sh. flexneri</i> tipo 6, var. Newcastle	A/AG	OAL	-
<i>Alcalescens</i>	A	AL/A***	-
<i>Sh. sonnei</i>	A	A	-
<i>Dispar</i>	A	A	-
<i>Ent. aerogenes</i>	AG	A	-
<i>Ent. cloacae</i>	AG	A	-
<i>E. coli</i>	AG	A	-
<i>Citrobacter</i>	AG	A	+
<i>Klebsiella</i>	AG	A	-
<i>Pr. vulgaris</i>	AG**	A***	+ } Sucio,
<i>Pr. mirabilis</i>	AG**	AL/A***	+ } verde negruzco
<i>Pr.morganii</i>	AG**	OAL	-
<i>Pr. rettgeri</i>	A(AL)	OAL	-
<i>K. pneumoniae</i>	A/AG	OAL	-
<i>Ps. aeruginosa</i>	OAL	OAL*	-
<i>Al. faecalis</i>	OAL	OAL	-

CUADRO 8 Interpretación de especies con los resultados de la prueba TSI. AL, viraje a rojo por formación de álcali. OAL, sin alteración del color original del medio de cultivo, o rojo por formación de álcali. A, viraje a amarillo, por formación de ácido. AG, viraje a amarillo y formación de gas. +, ennegrecimiento por formación de pigmento. **, varias cepas: AL, eventualmente sin producción de gas. ***, sobre Agar Kliger : OAL (Fuente : Merck, Manual de Microbiología).

Número de tubos positivos de :			NMP por Gramo	Número de tubos positivos de :			NMP por Gramo
0.1 gr.	0.01 gr.	0.001 gr.		0.1 gr.	0.01 gr.	0.001 gr.	
0	0	0	0.0	2	0	0	9.1
0	0	1	3.0	2	0	1	14.0
0	0	2	6.0	2	0	2	20.0
0	0	3	9.0	2	0	3	26.0
0	1	0	3.0	2	1	0	15.0
0	1	1	6.1	2	1	1	20.0
0	1	2	9.2	2	1	2	27.0
0	1	3	12.0	2	1	3	34.0
0	2	0	6.2	2	2	0	21.0
0	2	1	9.3	2	2	1	28.0
0	2	2	12.0	2	2	2	35.0
0	2	3	16.0	2	2	3	42.0
0	3	0	9.4	2	3	0	29.0
0	3	1	13.0	2	3	1	36.0
0	3	2	16.0	2	3	2	44.0
0	3	3	19.0	2	3	3	53.0
1	0	0	3.6	3	0	0	23.0
1	0	1	7.2	3	0	1	39.0
1	0	2	11.0	3	0	2	64.0
1	0	3	15.0	3	0	3	95.0
1	1	0	7.3	3	1	0	43.0
1	1	1	11.0	3	1	1	75.0
1	1	2	15.0	3	1	2	120.0
1	1	3	19.0	3	1	3	160.0
1	2	0	11.0	3	2	0	93.0
1	2	1	15.0	3	2	1	150.0
1	2	2	20.0	3	2	2	210.0
1	2	3	24.0	3	2	3	290.0
1	3	0	16.0	3	3	0	240.0
1	3	1	20.0	3	3	1	460.0
1	3	2	24.0	3	3	2	1100.0
1	3	3	29.0	3	3	3	>1100.0

CUADRO 9. Tabla del NMP por gramo de muestra analizada, para diversas combinaciones de resultados positivos, cuando se usan tres tubos de cada dilución con volúmenes de 0.1, 0.01 y 0.001 ml. Si en lugar de las porciones anteriores, se usan de 1.0, 0.1 y 0.01 ml. el NMP se calcula y se registra dividiendo entre 10 la cifra correspondiente del NMP de esta tabla; si se usan porciones de 0.01, 0.001 y 0.0001 ml. las cifras del NMP de la tabla se multiplican por 10 (fuente: Bacteriological Analytical Manual, Jan.1969).