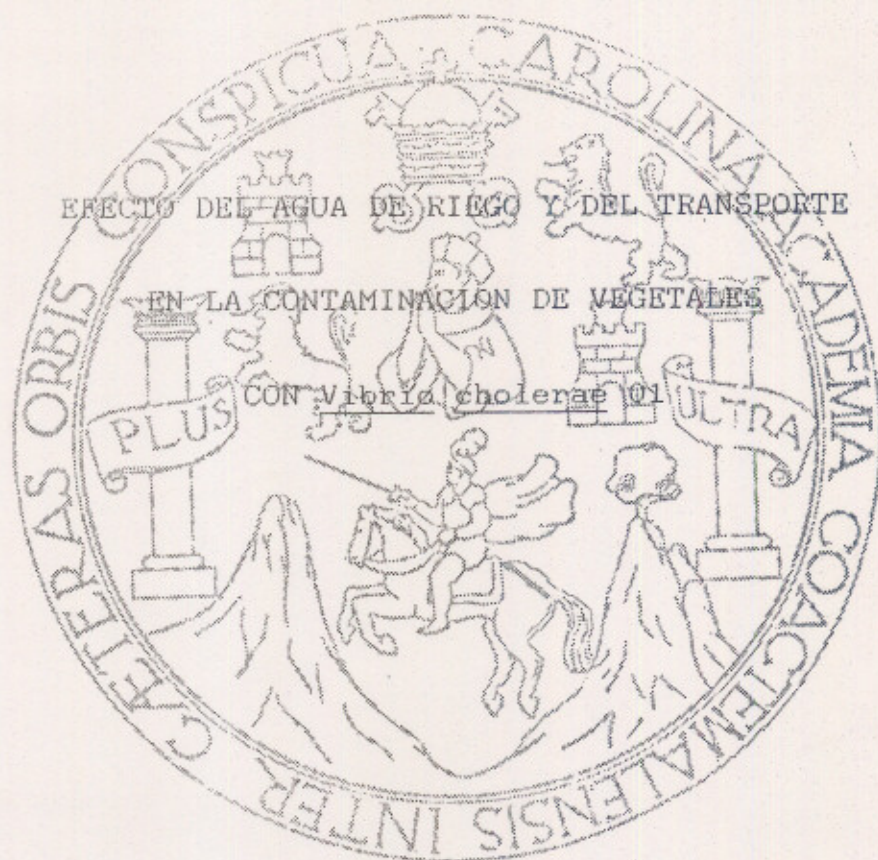


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



INFORME DE TESIS

Presentado por

Clodette Marina Rousselin Avendaño,

para optar al título de

Química Bióloga

Guatemala, mayo 1994

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Dk
06
T(17/66)

JUNTA DIRECTIVA DE LA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANA	LICDA. CLEMENCIA DEL PILAR GALVEZ DE AVILA
SECRETARIO	LIC. JOSE FRANCISCO MONTERROSO SALINAS
VOCAL I	LJC. MIGUEL ANGEL HERRERA
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	BR. JORGE LUIS GALINDO AREVALO
VOCAL V	BR. EDGAR ANTONIO GARCIA DEL POZO

DEDICO ESTA TESIS

A: Dios, por ser la luz que ilumina mi camino.

A: Mi patria, Guatemala.

A: La Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A: Mis padres, por su amor, su comprensión y su apoyo constante.

A: Mis hermanos: Lisette, Erick Rolando y Pablo Humberto.

A: Mis compañeras y amigas: Nancy García, Sonia González, Ligia

Reyes, María Paula De León y Karla Elgueta.

AGRADECIMIENTOS

- A: Licda. Floridalma Cano por su asesoría y su apoyo constante.
- A: Aury Díaz por su valiosa cooperación y ayuda.
- A: Los profesionales y personal técnico de los Programas de Enfermedades Infecciosas y Ciencias Agrícolas del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, INCAP, por su colaboración y su ayuda.
- A: Lic. Federico Nave por su valiosa orientación y ayuda.
- A: Nehemías Arana y Victor Azañón por su constante ayuda y su amistad.

INDICE

	PP.
I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	5
A. El cólera	5
B. Vías de transmisión del cólera	10
C. Cultivo de vegetales	11
D. Contaminación microbiana de vegetales	14
IV. Justificación	22
V. Objetivos	24
VI. Hipótesis	25
VII. Materiales y Métodos	26
VIII. Resultados y Discusión	37
IX. Conclusiones	43
X. Recomendaciones	44
XI. Referencias	45
XII. Anexos	53

1. RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del agua de riego, contaminada con V. cholerae 01 serotipo Inaba biotipo El Tor, sobre el grado de contaminación externa de algunos vegetales que se consumen crudos tales como el apio, la lechuga y el rábano, así como corroborar la presencia de una contaminación interna de los mismos. Además, se pretendió evaluar si el aumento de la temperatura, aumentaba la contaminación externa de los vegetales, a través de su exposición directa al sol, simulando su transporte.

Para el efecto, durante el cultivo de apio, lechuga y rábano se utilizó el riego continuo con agua previamente contaminada con un inóculo que varió de 1×10^2 hasta 1×10^6 vibrios/ml en el agua de riego. Dicho cultivo se llevó a cabo en un invernadero de acuerdo a las condiciones agronómicas necesarias. La cosecha se efectuó en el tiempo correspondiente para cada vegetal. Estos fueron cosechados y divididos en dos grupos. El primer grupo fue analizado en el momento de la cosecha con el propósito de determinar el grado de contaminación externo e interno. El segundo grupo fue expuesto al sol para observar los posibles cambios en el grado de contaminación externa.

Los resultados demuestran la presencia de contaminación externa, la cual depende la ultraestructura del tejido de cada vegetal, siendo de 1.6×10^6 UFC/g en las hojas de apio, seguido de 1.3×10^6 UFC/g en las hojas de lechuga, 1×10^5 UFC/g en el tallo del apio y 9×10^2 UFC/g en el tubérculo del rábano. Además, la

bacteria sobrevive mejor a nivel de las hojas, siendo el rábano el que presentó la contaminación menor debido a que posee una superficie lisa que permite que el agua de riego contaminada resbale. Por otro lado, ninguno de los vegetales analizados presentó contaminación interna, lo que permite aseverar que la bacteria no es capaz de vencer las barreras físicas de las mismas, excepto en el caso en que el tejido sea dañado. En cuanto a los vegetales expuestos al sol, los resultados demostraron que existe diferencia estadísticamente significativa, para un $p < 0.05$, en el grado de contaminación externa de un vegetal recién cosechado y uno expuesto al sol. Sin embargo, estos se marchitan con el tiempo, por lo que los vendedores acostumbran rociarlos con agua de origen dudoso. Así, el grado de contaminación externa de los vegetales regados con agua contaminada con V. cholerae 01, sobrepasa la dosis infectiva al ingerir unas cuantas hojas de apio o lechuga, y de 25 a 30 unidades en el caso del rábano. Esto indica que los vegetales llevan consigo una carga importante de vibrios que permite que sean considerados como productos de alto riesgo en la transmisión de la enfermedad.

Por lo anterior, el aplicar métodos adecuados de lavado como la adición de un desinfectante es importante como una medida preventiva para asegurar su calidad sanitaria antes de su consumo.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

II. INTRODUCCION

La transmisión, diseminación y permanencia de las infecciones intestinales como el cólera, se ven favorecidas por la infraestructura sanitaria deficiente de los países en vías de desarrollo como Guatemala (1).

El cólera es una enfermedad diarreica aguda causada por Vibrio cholerae O1 toxigénico. Los casos severos de cólera se caracterizan por diarrea acuosa abundante, vómitos y deshidratación severa, la que puede llevar al paciente a una muerte súbita en pocas horas. El agente causal del cólera de la actual epidemia latinoamericana pertenece al serotipo Inaba biotipo El Tor. Sin embargo, se ha presentado posteriormente el serotipo Ogawa. Los científicos asumen que esto se da como resultado de una posible mutación en el material genético de la bacteria (1-3).

Las principales fuentes de transmisión del cólera son el agua (ríos, lagos, pozos y fuentes intra-domiciliares) y los alimentos contaminados con heces de pacientes coléricos o portadores sanos. Esta contaminación puede llegar a los alimentos durante su manipulación, o a través del agua utilizada en su riego o preparación. Los vegetales que se consumen crudos son alimentos que se consideran de alto riesgo en la transmisión del cólera debido a que el agua de riego utilizada puede estar contaminada con aguas residuales. El agua de riego interviene en la calidad sanitaria de los vegetales, pues si contiene organismos enteropatógenos, éstos pueden contaminar los vegetales. La contaminación microbiana de vegetales puede suceder también durante

la cosecha, transporte, distribución y almacenamiento. Generalmente la contaminación es externa; sin embargo, existen reportes de contaminación interna de vegetales. No obstante, en el caso de Vibrio cholerae no se ha investigado esta posibilidad (2).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del agua de riego contaminada con V. cholerae O1 serotipo Inaba biotipo El Tor sobre el grado de contaminación externa de algunos vegetales que se consumen crudos tales como el apio, la lechuga y el rábano. Siendo los vegetales uno de los principales componentes de la dieta diaria de la población fue necesario verificar la sobrevivencia de la bacteria en dichos tejidos y su presencia en la parte interna de los mismos, mostrando así la importancia de la calidad sanitaria del agua de riego.

III. ANTECEDENTES

A. EL COLERA

1. DEFINICION Y AGENTE CAUSAL

El cólera es una enfermedad diarreica aguda acompañada de deshidratación severa, causada por V. cholerae O1 toxigénico. Los casos severos se caracterizan por diarrea profusa y vómitos, dolores musculares y colapso; la pérdida de líquido puede ser tan severa que una persona puede morir en pocas horas. Se caracteriza por ser una enfermedad de fácil transmisión por vía feco-oral. El honor del descubrimiento de su agente causal, el bacilo Vibrio cholerae se otorgó a Koch en 1883, y mucho antes se sabía que este bacilo era transmisible (1,2).

El cólera tiene un espectro clínico muy amplio y solamente dos por ciento de personas infectadas desarrollan síntomas severos. La deshidratación, vómitos, calambres musculares y pérdida del estado mental, son síntomas típicos asociados con los casos severos. Un diez y ocho por ciento son casos moderados a leves, donde los síntomas presentes son similares a diarreas causadas por otros enteropatógenos. Un ochenta por ciento son asintomáticos (2).

2. CLASIFICACION DEL AGENTE CAUSAL

La familia Vibrionaceae agrupa a bacterias acuáticas, tanto de agua salada como de agua dulce. Esta familia incluye al género Vibrio, el cual está conformado por, al menos 30 especies. De las especies de Vibrio, la asociada con la enfermedad del cólera es Vibrio cholerae del serogrupo 01 y con capacidad de producir la toxina colérica (3).

V. cholerae es un bacilo Gram negativo, curvo, con un solo flagelo polar, cubierto por una envoltura. Esta especie está dividida en, al menos 70 serogrupos basándose en su aglutinación directa por antisueros contra el antígeno O de la pared celular. Las cepas que pertenecen al serogrupo 01 y son capaces de producir la toxina colérica, son las asociadas con el cólera epidémico (Anexo 1). Además de producir toxina, las cepas del serogrupo 01 están caracterizadas en biotipo y serotipo. Existen dos biotipos: Clásico y El Tor, los que difieren por la hemaglutinación de eritrocitos de pollo, tipos de hemólisis, reacción de Voges Proskauer (VP), susceptibilidad fagocítica, y susceptibilidad a la polimixina B (Anexo 2) (1,4).

Se cree que el biotipo Clásico fue el responsable de las pandemias ocurridas antes de 1950 (Anexo 3). La presente séptima pandemia es causada por V. cholerae 01 biotipo El Tor. Cada biotipo puede ser clasificado en su serotipo: Ogawa o Inaba, basándose en la aglutinación con el antisuero

específico. Esto debido a que el antígeno O1 está compuesto por los factores A, B, y C. El serotipo Inaba consiste en A y C mientras que el Ogawa es A y B; cuando los tres factores están presentes, se denomina Hikojima (Anexo 4) (1-5).

Desde el punto de vista de salud pública, las cepas de V. cholerae O1 que producen toxina colérica son consideradas importantes por su potencial epidémico (2).

3. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y DE CULTIVO DE Vibrio cholerae

Es un bacilo Gram negativo, aerobio facultativo. Es susceptible a pH ácido; pH menor de 5.0 es letal. Es pequeño (0.5 x 1.5 - 3 um); en aislamiento primario se presenta como bacilos rectos y formas curvas. La temperatura óptima de crecimiento es de 35° - 37° C, aunque se ha informado que una temperatura de 42° C le es muy favorable para su crecimiento (6).

Los vibriones son microorganismos halófilos (requieren de cloruro de sodio para su crecimiento), a excepción de dos especies, llamadas por esta razón vibrios "no halófilos": V. cholerae y V. mimicus. Sin embargo, la presencia de cloruro de sodio siempre es favorable para su crecimiento. Crece bien en medios de cultivo comunes. Su tolerancia a la alcalinidad y su crecimiento rápido se ha utilizado como base para su aislamiento. Para una mejor recuperación del bacilo colérico usualmente se utiliza un caldo de enriquecimiento (agua

peptonada alcalina) el cual es sembrado después de 6-8 horas de incubación en un medio de aislamiento primario. El uso del medio selectivo y diferencial llamado TCBS (tiosulfato, citrato, sales biliares, sucrosa) ayuda considerablemente en el aislamiento primario ya que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivo y la mayoría de Gram negativo, excluyendo al género Vibrio. En este medio la bacteria presenta colonias grandes, aplanadas en los bordes y amarillas debido a la fermentación de la sucrosa y el cambio de pH respectivo (7,8).

Para el cultivo de V. cholerae a partir de alimentos, el FDA (Food and Drug Administration) recomienda pesar asépticamente 25 gramos de la muestra, como mínimo, en un recipiente estéril y adicionar 225 ml de Agua Peptonada Alcalina (dilución 1:10). En el caso de los vegetales que contienen altas concentraciones de bacterias entéricas debe hacerse otras diluciones (10^{-2} - 10^{-3}) para evitar el sobrecrecimiento de enterobacterias. Luego de incubar las diluciones a 35°C por 6 - 8 horas, se siembra en TCBS. Finalmente, las colonias deben de ser identificadas en base a pruebas bioquímicas, serológicas y a la determinación de la toxina colérica para asegurarse de que se trata de Vibrio cholerae (9,10).

4. ACCION DE LA TOXINA COLERICA

V. cholerae 01 produce una potente enterotoxina extracelular llamada "colerágeno". Es una proteína cuyo peso molecular aproximado es 85 kDa. Es lábil al calor y posee dos áreas funcionales: subunidades A y B. El segmento más pequeño de la subunidad A es llamado A1, pesa 27 kDa y es la parte activa de la toxina. La subunidad B consiste en 5 péptidos idénticos de 11.6 kDa de peso por medio de los cuales se efectúa el enlace con los gangliósidos receptores GM1 de la mucosa en el intestino delgado (1,10,11).

La enterotoxina activa al sistema adenilato ciclasa de las células de la mucosa del intestino humano. Como consecuencia intracelularmente se acumula adenosin-monofosfato cíclico (AMPc) que altera el transporte activo de iones a nivel de la membrana celular. Debido a esto, se da una secreción activa de líquidos y electrolitos hacia el lumen del intestino con disminución de la absorción. Así, la toxina cataliza la salida masiva de fluido (10).

V. cholerae puede contener otros factores de virulencia además de la toxina colérica. Recientemente, han sido descritos, dos nuevos factores toxigénicos, "zonula occludens toxin" (ZOT), y "accessory cholera enterotoxin" (ACE) los cuales contribuyen al desorden metabólico, a nivel del intestino delgado, lo que provoca la diarrea (12).

B. VIAS DE TRANSMISION DEL COLERA

Las heces de pacientes coléricos son la primer fuente de potencial contaminación ambiental masiva. Los portadores crónicos son raros y no se sabe que jueguen algún papel en la persistencia de la enfermedad (1).

Los pacientes con cólera excretan alrededor de $10^6 - 10^9$ organismos por mililitro de evacuación. Un paciente que produce 10 litros de evacuación por día puede teóricamente producir 10^{13} organismos; ya que la dosis infectiva es de aproximadamente 10^6 organismos, el número de organismos excretados por un paciente en un día es suficiente para infectar 1 - 10 millones de personas. Debido a que la dosis infectiva es alta, el cólera no se difunde por contacto directo de persona a persona, siendo las fuentes principales de infección el agua y los alimentos contaminados por heces humanas conteniendo bacilos coléricos (Anexo 5) (1,11-15).

La transmisión hídrica ha sido el mecanismo más importante y determinante de las epidemias de cólera a través de los siglos, incluyendo la actual epidemia en Latinoamérica. En este ciclo, el agua de los pozos superficiales, de las cañerías, reservorios intra-domiciliarios, agua de los arroyos, ríos, lagunas y lagos, se pueden contaminar con las heces de personas enfermas o portadores sanos. El agua contaminada puede acarrear miles o cientos de miles de bacilos por cada mililitro, pudiendo infectar al ser humano si sobreviven la

barrera de la acidez gástrica (2).

A su vez, el agua contaminada es la fuente directa de contaminación de los alimentos, así como de los utensilios de cocina. Sin embargo, la contaminación de los alimentos puede darse también a través de manipuladores portadores del bacilo colérico o bien al tener contacto con reservorios naturales (8,10).

C. CULTIVO DE VEGETALES

Los vegetales son plantas herbáceas de las cuales una o más partes pueden ser utilizadas, en su forma natural como alimento del hombre, es decir, sin sufrir ninguna transformación industrial. De hecho, los vegetales constituyen un complemento necesario en la alimentación del hombre por su gran valor nutritivo, pues contienen sodio, potasio, proteínas, grasas, celulosa y vitaminas (Anexo 6). Además presentan una función reguladora de la digestión intestinal (16,17).

En el cultivo de vegetales influyen varios factores los que también inciden en la contaminación microbiana. Entre estos los más importantes son (18):

1. SUELO:

El suelo provee un sostén físico para las plantas y también aporta el agua y nutrientes que le son necesarios. Los cuatro componentes principales del suelo, partículas minerales,

materia orgánica, fase líquida (agua), y fase gaseosa (aire), varían en cantidades para cada suelo. Estos componentes determinan la estructura, textura, densidad y velocidad de infiltración del agua; características que influyen el crecimiento y producción de los cultivos. También es importante mencionar el gran número de bacterias que se presentan en el suelo, las cuales exceden los 1000 millones/g de suelo. Estos microorganismos se clasifican de acuerdo con su fuente de energía. Los tipos definidos son las bacterias heterotróficas y las autótrofas. Las primeras cubren sus necesidades a partir de la materia orgánica y por lo tanto, actúan en la descomposición. Las otras obtienen la energía por oxidación de las sustancias inorgánicas presentes (nitrificantes). Dada la importancia de las bacterias es muy conveniente resaltar que su presencia en el suelo es fundamental, puesto que sin ellas la fijación del nitrógeno y la nitrificación no ocurriría (17-19).

2. AGUA:

El agua es un componente imprescindible de todas las células y tejidos vivos. En el caso de los vegetales, sirve como solvente para transportar los nutrientes del suelo, el dióxido de carbono del aire y las sustancias elaboradas por la propia planta desde el sitio de absorción o producción al lugar de utilización. Además, el agua es un medio importante en el que se realizan una gran variedad de reacciones químicas, entre las que se incluye la fotosíntesis (18,20).

El agua entra en el vegetal por la raíz y llega a formar, en promedio, el 80 por ciento de su constitución. El vegetal absorbe agua continuamente y la devuelve en forma de vapor mediante la transpiración que se efectúa por sus estomas (16).

El suelo es un almacén de agua con capacidad de absorción que está íntimamente ligada con su permeabilidad. El agua sube por ósmosis llevando consigo elementos orgánicos y sales minerales. A nivel de las hojas verdes, el agua es desdoblada en sus elementos hidrógeno y oxígeno, los que junto con el carbono atmosférico son utilizados por la planta verde para sintetizar moléculas de hidrato de carbono (18-21).

Existen diversas etapas en el ciclo de cultivo en las que un déficit de agua puede provocar una disminución significativa en el rendimiento. Desafortunadamente, las lluvias no aportan el agua de forma uniforme; además, las infiltraciones y su evaporación reducen la cantidad de agua disponible para las plantas. Esto conlleva a la utilización de sistemas de riego para lograr una irrigación adecuada para el conveniente desarrollo de los vegetales (21).

Existen diversos sistemas de riego: i) riego aéreo o por aspersión, ii) riego por goteo o flujo diario, y iii) riego subterráneo. Estos sistemas se basan en la conducción del agua a presión a través de tuberías hasta llegar a la parcela en donde el agua sale por emisores (aspersores o goteros).

Cuando no se tiene acceso a estos sistemas de riego, los agricultores utilizan un sistema manual, el cual consiste en hacer surcos a lo largo del cultivo y depositar en ellos cierta cantidad de agua que permita la humedad necesaria para el desarrollo de la planta. Si se trata de un invernadero, el riego se realiza a través del uso de una regadera manual y se aplica con cierta constancia según la necesidad del cultivo (22-25).

D. CONTAMINACION MICROBIANA DE VEGETALES

1. FACTORES FAVORABLES AL CRECIMIENTO MICROBIANO EN VEGETALES:

Del análisis microbiológico de los vegetales crudas se obtienen muy diversos tipos de microorganismos, provenientes del hábitat natural de la planta (tierra, agua, aire, fertilizantes). Entre éstos están los hongos, las levaduras, los virus y las bacterias. En microbiología de alimentos se le da importancia a los tipos predominantes y a los que pueden causar putrefacción o ser una amenaza desde el punto de vista de salud pública (26).

Existen ciertos factores que pueden favorecer el crecimiento microbiano en los vegetales, tales como:

i) Contenido de nutrientes: por su contenido nutricional los vegetales permiten el crecimiento de mohos, levaduras y bacterias; en consecuencia, pueden ser descompuestos por

cualquiera de estos microorganismos. Las bacterias suelen dominar por su crecimiento más rápido (19,26).

ii) pH: el intervalo de pH de la mayoría de los vegetales está dentro de los límites que favorecen el crecimiento de un gran número de bacterias, las cuales toleran cambios de hasta 3 y 4 unidades. Sin embargo, todo cambio superior a una unidad afecta su tasa de crecimiento (27).

iii) Agua disponible: al contrario de lo que sucede con los organismos superiores cuyos tegumentos especializados retienen agua, el metabolismo de las bacterias depende de un ambiente en que ésta exista. Los vegetales tienen un alto contenido de agua y el contenido relativamente bajo de carbohidratos y lípidos indica que mucha de esta agua se encuentra en forma libre, lo cual favorece el crecimiento bacteriano (19,26).

iv) Temperatura: la mayoría de las bacterias pueden crecer por encima de una temperatura de 30°C, si bien existe una zona muy estrecha en la que el crecimiento es óptimo. En general, la mayoría de las bacterias son mesófilas, es decir que su temperatura de óptimo crecimiento es de 30°C a 44°C (27).

En general, las bacterias, patógenas o no, podrían sobrevivir dentro y fuera de las hortalizas ya que éstas poseen las características necesarias para constituir un hábitat natural para las mismas (28,31).

2. VIAS DE INGRESO DE LOS MICROORGANISMOS

Los microorganismos se concentran cerca de las áreas donde crecen las plantas y porque es allí donde la bacteria encuentra las condiciones necesarias para desarrollarse. Existe evidencia que una contaminación bacteriana puede ocurrir no sólo en la superficie (llamada por ello contaminación externa) sino también en el tejido interno de las plantas (contaminación interna) lográndose ésta última, única y exclusivamente, al atravesar la epidermis de los vegetales. Samish y col. afirman que existen bacterias que en su mayoría son bacilos móviles, Gram negativo dentro de tejidos vegetales normales y sanos (28).

La capa externa de las plantas está constituida por una epidermis con una cutícula más o menos espesa según los órganos. Esta capa no puede ser atravesada directamente por las bacterias, solamente en el caso en que lo hagan a través de aberturas naturales o artificiales (heridas). La epidermis de las plantas está formada por una gruesa capa unicelular. En ella se presentan pequeñas aberturas naturales denominadas estomas que pueden encontrarse en la epidermis inferior y superior, como sucede frecuentemente, sólo en la inferior. Los estomas están formados por células especializadas conocidas como células protectoras, las cuales son sensibles tanto a la luz como a la relación de humedad entre el interior de la hoja y la atmósfera circundante. Las células protectoras abren o cierran el estoma como resultado de los cambios en la presión

interna de turgencia. Un incremento de esta presión hace que las células protectoras abran el estoma y una disminución produce su cierre. A través de los estomas se intercambian dióxido de carbono, oxígeno y vapor de agua de la atmósfera. La bacteria puede penetrar al estoma ayudada por una película (gota) de agua, donde se reproduce en condiciones ecológicas adecuadas (18,19).

Las bacterias también pueden ingresar a través de los poros de agua, los cuales son estructuras que se encuentran agrupadas en los bordes de ciertas hojas (sobre todo en el extremo de las nervaduras) en donde se acumula líquido proveniente de un retardo en la evaporación (19).

Las heridas mecánicas y aquellas causadas por insectos son consideradas como aberturas artificiales. Estas son de gran importancia ya que permiten y facilitan la penetración de bacterias hacia adentro del tejido vegetal (19).

Una vez dentro de la planta, el movimiento de la bacteria puede realizarse con el flujo de la corriente de savia o bien pueden ser ayudadas por la propulsión de sus células móviles (por los flagelos) a distancias cortas (19).

3. FUENTES DE CONTAMINACION DE LOS VEGETALES:

a. SUELO:

El suelo puede anidar bacterias patógenas al ser éstas acarreadas por el agua de riego utilizada. *V. cholerae* O1 puede

sobrevivir en la tierra de 4-10 días en clima tropical y subtropical (32).

b. AGUA DE RIEGO:

La calidad sanitaria de un agua de riego debe evaluarse en base a su potencialidad para producir efectos dañinos al suelo y al rendimiento de los cultivos; y en la salud del consumidor. Debe tomarse en cuenta la calidad química (composición iónica y mineral), agronómica y sanitaria. La primera está determinada por el tipo y la concentración de los constituyentes disueltos que tenga (Anexo 7). La segunda, está determinada por el suelo, el método y el agua de riego, el pH, el clima, las condiciones de drenaje y su grado de contaminación (18,21,31-35).

En Guatemala no existe un sistema adecuado de evacuación y tratamiento de aguas residuales; éstas pueden contaminar tanto los terrenos como los ríos y lagos aledaños a las comunidades. Al regar continuamente con estas aguas da como resultado una acumulación de patógenos en el suelo y por ende una posible contaminación tanto interna como externa de los vegetales. Además, el empleo de agua de deshecho para la irrigación en la agricultura es recomendado basado en el valor que tiene dicha agua debido a sus constituyentes usados como supuestos fertilizantes. De esta manera, el agua de riego puede constituir un vehículo favorable para la transmisión de bacterias enteropatógenas, dentro de las cuales podemos citar

principalmente: Escherichia coli, Vibrio cholerae,
Salmonella sp, Shigella sp (25,35,37).

c. MANIPULACION Y TRANSPORTE

Llegado a término el cultivo de los vegetales, se procede a cosecharlos; para ello se separa dicho vegetal de su raíz en el momento en que se "corta" (cosecha). Este es, generalmente, lavada con la misma agua de riego, y luego trasladada del campo al lugar de venta. Después de la cosecha, los productos por ser aún tejidos vivos, continúan sus procesos biológicos de respiración, transpiración y otros. Esto implica cambios fisicoquímicos de distinto orden, tendientes todos hacia una degradación final del producto. A este proceso de cambios se le denomina "deterioro". Para detener dicho proceso, los vegetales deben ser sometidos a bajas temperaturas (refrigeración) para prolongar el tiempo de vida y la frescura del mismo. Sin embargo, los vegetales que se expenden en los mercados no gozan de estas condiciones; éstos son expuestos al sol por varias horas mientras dura la venta. Si la venta no es completa, éstos son almacenados bajo techo en casa de los comerciantes. Al día siguiente son rociados con agua para dar un aspecto de frescura y expuestos al sol nuevamente. Si el vegetal es rociado con agua contaminada se provoca la consecuente contaminación de los mismos; si el vegetal ya viene contaminado desde su cultivo, el número de bacterias

contaminantes se verá incrementado (1,25,38).

4. SUPERVIVENCIA DE V. cholerae EN VEGETALES

Los factores que favorecen la supervivencia de V. cholerae 01 en alimentos son bajas temperaturas, alto contenido orgánico, pH cercano al neutro (un pH menor de 5 le es letal), ausencia de microbiota competitiva y alta humedad. El lavado y la luz del sol afectan a la bacteria. V. cholerae sobrevive mejor en el agua que en los alimentos. La supervivencia de V. cholerae 01 bajo varias condiciones en alimentos ha sido altamente investigada; el crecimiento más rápido de éste ocurre en alimentos alcalinos y húmedos. En alimentos húmedos, puede sobrevivir de 2 a 14 días y mejor a 5°C - 10°C que a 30°C - 31°C (1,39-45).

Los vegetales que se consumen crudos con un pH superior a 4.5 constituyen un factor de riesgo debido al contacto potencial con agua de superficie y suelo contaminados con excretas humanas de pacientes coléricos o de portadores sanos. La calidad del agua de riego es un factor determinante ya que puede ser el vehículo directo de contaminación. Efectivamente, estudios analíticos recientes en Latinoamérica han revelado contaminación fecal de los vegetales en porcentajes que varían entre 50 y 100 por ciento. Por ello, se ha deducido que la contaminación de los vegetales con V. cholerae se puede producir durante su producción, procesamiento y

comercialización (1,30,46-50).

El tiempo de sobrevivencia de *V. cholerae* en los vegetales que se han contaminado, crudos o cocidos, no excede de una semana a temperatura ambiente; sin embargo, se aumenta a diez días a temperatura de refrigeración (Anexo 8) (1).

IV. JUSTIFICACION

La epidemia del cólera que ha afectado a los diversos países latinoamericanos ha tenido repercusiones tanto en la economía como en la salud. Las condiciones de vida en algunos de estos países han favorecido la transmisión y diseminación del cólera, prolongando así su permanencia.

Los alimentos, particularmente aquellos que se consumen crudos como el apio, la lechuga y el rábano, pueden ser vehículos potenciales de transmisión del cólera.

Los vegetales constituyen uno de los principales componentes de la dieta diaria. *V. cholerae* 01, agente causal del cólera, puede llegar a estos alimentos durante su cultivo a través del agua de riego y el uso de excretas humanas como abono y/o durante la cosecha y comercialización, al lavar los vegetales con aguas de ríos contaminados, o por la aspersión con agua de origen dudoso, para mantener el aspecto fresco de los productos; ésto supone cierto grado de contaminación externa de los mismos. Por ello se recomienda que antes de consumir vegetales, se aplique un tratamiento de desinfección que sea efectivo para asegurar su calidad sanitaria. Existen reportes sobre contaminación interna de vegetales. Sin embargo, no se ha investigado el caso de *V. cholerae* 01 Inaba El Tor.

Es por ésto necesario determinar el grado de contaminación al que están sujetos los vegetales que se consumen frescos, a través de técnicas bacteriológicas tanto cualitativas como cuantitativas. Esto se hace con el objeto de fomentar el uso de agua de riego sanitariamente segura.

V. OBJETIVOS

A. Determinar el efecto del agua de riego, contaminada con V. cholerae 01, en el grado de contaminación externa de algunos vegetales que se consumen crudos tales como el apio, la lechuga y el rábano.

B. Establecer si existe algún grado de contaminación interna de los vegetales tales como apio, lechuga y rábano, los cuales han sido regados continuamente con agua contaminada con V. cholerae 01.

C. Determinar la diferencia en el grado de contaminación de los vegetales regados con agua contaminada con V. cholerae 01 en el momento de su cosecha y después de su transporte, al ser expuestos al sol por un tiempo.

VI. HIPOTESIS

A. El riego continuo de los vegetales tales como apio, lechuga y rábano, con agua contaminada con V. cholerae 01, trae como consecuencia una elevada contaminación externa de los mismos.

B. Existe un riesgo de contaminación interna de los vegetales (apio, lechuga y rábano) con V. cholerae 01, al ser expuestos al riego continuo con agua contaminada con este agente.

C. Existe diferencia en el grado de contaminación, con V. cholerae 01, de los vegetales (apio, lechuga y rábano) recién cosechados y aquellos expuestos al sol por un tiempo prolongado durante su transporte.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. UNIVERSO DE TRABAJO

1. Población muestral:

Constituida por los vegetales: apio, lechuga y rábano (Anexo 9-11), los cuales fueron regados a lo largo de su crecimiento y desarrollo con agua contaminada con V. cholerae 01, durante aproximadamente cuatro meses.

2. Muestras

Se tomaron 30 muestras de cada uno de los vegetales (apio, lechuga y rábano), las cuales fueron divididas en dos grupos: 15 de ellos fueron analizados con el fin de determinar el grado de contaminación externa e interna al cosecharlos. Los 15 restantes fueron expuestos al sol por un promedio de 4 horas diarias por 5 días, analizando 3 muestras por día de exposición, con el fin de establecer si hay diferencias en el grado de contaminación con respecto a los analizados después de la cosecha.

B. RECURSOS

1. HUMANOS

- a. Autor: Br. Clodette Marina Rousselin Avendaño
- b. Asesor: Licenciada Floridalma Cano
- c. Revisor (INCAP): Dr. José Ramiro Cruz
- d. Colaboradores:
 - Nehemías Arana Bocanegra
 - Víctor Azañón
 - Personal profesional y técnico del Programa de Enfermedades Infecciosas, Laboratorios Leonardo Matta, del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP).

2. INSTITUCIONALES

Laboratorios de Microbiología del Programa de Enfermedades Infecciosas del Instituto de Nutrición y Salud del INCAP y Biblioteca de la misma institución.

3. FISICOS

a. EQUIPO

Espectrofotómetro Coleman 295; Perkin-Elmer
Incubadora Thelco; Precision scientific company; 32 M
Balanza analítica AND - Electronic Balance - FX 3200
Campana bacteriológica Lab. Con. co.
Licuadora Osterizer Modelo L-21

Herramientas agrícolas para vegetales (azadón y escarda)
Baño de María Precision scientific company. DES. 117720
Refrigeradora - Westinghouse Frost free - 16
Frascos de vidrio de boca ancha tipo tarro de 500 ml
Varilla de vidrio de 3 mm de diámetro y 20 cm de largo
Cajas de Petri plásticas estériles de 15 por 100 mm
Pipetas estériles de 1 ml con graduación de 0.001 ml
Pipetas de 5 y 10 ml con graduación de 0.1 ml
Asas bacteriológicas de nicromel de 3 mm de diámetro
Tubos de ensayo de 16 por 150 mm y 20 por 150 mm
Tubos de ensayo de 10 por 75 mm
Stomacher 400/Laboratory Blender-Tekmar/Seward
Tijeras y pinzas estériles
Lámpara (para observar reacciones serológicas)
Mecheros Bunsen o Fisher
Potenciómetro marca Beckman - Zeromatic SS-3
Bolsas de polietileno de 28 x 37 cm con tapa resellable
Erlenmeyers de 100, 500 y 1000 ml
Beakers de 100, 500 y 1000 ml
Probeta de 1000 ml de capacidad

b. MEDIOS DE CULTIVO

Agar TCBS (tiosulfato, citrato, sales biliares y sucrosa)BBL
Agar MH (Muller-Hinton) DIFCO
Agua Peptonada Alcalina (peptona-DIFCO y cloruro de sodio-
MERCK)

Caldo BVB (Bilis Verde Brillante) OXOID
Caldo EC (E. coli) DIFCO
Caldo Lauryl-triptosa (simple y doble) OXOID
Caldo MR-VP (Rojo de Metilo y Voges Proskawer) BBL
Citrato - DIFCO
MIU (Movilidad, Indol y Urea) DIFCO

c. REACTIVOS

Antisuero polivalente de V. cholerae 01 (INCAP)
Antisuero Inaba (INCAP)
Antisuero Ogawa (INCAP)
Indicador rojo de metilo
Reactivos para la prueba de Voges Proskawer (KOH al 40 por ciento y alfa-naftol)
Reactivo de Oxidasa (N,N,N,N,-tetrametil-p-fenilendiamina)
Reactivo de Kovacs (p-dimetilaminobenzaldehido)
Solución salina al 0,85 por ciento
Solución de desoxicolato de sodio al 0.5 por ciento

C. METODOLOGIA

1. SELECCION DEL AGUA DE RIEGO

Se analizaron tres aguas de riego utilizadas en la finca experimental del INCAP, ubicada en el kilómetro 41,

Caserío San Antonio Pachalí, Sacsuy, San Juan Sacatepéquez, situada a 1570 metros sobre el nivel del mar. En ella se encuentran tres nacimientos de agua y un río pequeño; este último es el riachuelo Patatzala, por el cual fluye un volumen de agua cuyo caudal es utilizado para riego en el verano.

Se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

- pH: utilizando un potenciómetro
- Contaminación fecal: se les determinó a cada una la presencia de coliformes fecales por la técnica del NMP (número más probable) (34).

Se seleccionó aquella que permitió el crecimiento de V. cholerae 01 y que estuvo contaminada fecalmente, con el objeto de reproducir condiciones reales.

2. INOCULO DE CONTAMINACION DEL AGUA DE RIEGO CON V. cholerae 01:

a. Cepa contaminante: se confirmó primero, la pureza e identificación de la cepa a ser utilizada como patógeno contaminante del agua de riego: V. cholerae 01 Inaba El Tor, 1800-82 (cepario INCAP). La cepa estaba almacenada en caldo tripticasa soya con 20 por ciento de glicerol a -70°C . Se procedió a inocular en APA (agua peptonada alcalina) el concentrado de la bacteria y se incubó 6 horas a $35^{\circ}\text{C} - 36^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se inoculó en agar TCBS y agar no selectivo (Agar Sangre o Muller Hinton) por 24 horas a 37°C . Luego se procedió a realizar las pruebas bioquímicas confirmatorias

(oxidasa; desoxicolato de sodio al 0.85 por ciento, llamada prueba del cordón) y serología.

b. Estandarización del inóculo de contaminación con V. cholerae (35):

i. Se realizó una suspensión bacteriana, en agar Muller Hinton, a partir de un cultivo puro de 24 horas, equivalente a la turbidez del estándar de McFarland No.1. Esta suspensión se ajustó a una transmitancia de 80 por ciento a una longitud de onda de 640 nm.

ii. Se realizaron diluciones decimales de 10^{-2} - 10^{-6} .

iii. Se sembró 1 ml de cada dilución en tres placas de agar TCBS por medio de la técnica de esparcido en superficie distribuyéndola uniformemente en volúmenes de: 0.3; 0.3 y 0.4 ml en cada placa respectivamente. Se incubó a 36°C por 24-48 horas.

iv. Se cuantificaron las colonias crecidas en el agar. El número de colonias se multiplicó por el factor de dilución para conocer cuantos vibrios/ml había en la suspensión.

3. DETERMINACION DE LA VIABILIDAD DEL V. cholerae 01 EN EL AGUA DE RIEGO:

a) Se agregó al agua de riego un inóculo de V. cholerae 01 de manera que quedara una concentración de 10^6 bacterias/ml.

b) Se confirmó diariamente el número de vibriones

presentes en el agua de riego para evaluar su viabilidad. Para el efecto se tomó una muestra de agua y se procederá a hacer diluciones de 10^{-2} a 10^{-6} . Dichas diluciones se sembraron en medio TCBS, incubándose a 36°C por 24 horas. La cuantificación se realizó en base al reflejo de la cantidad de colonias crecidas en el agar.

4. CULTIVO DE VEGETALES (apio, lechuga y rábano):

a) Diseño y montaje de un invernadero

b) Se preparó un suelo apropiado el cual estaba constituido por tierra negra, materia orgánica y piedra poma, en una proporción de 2:1:1 respectivamente. Se le agregaron fertilizantes y pesticidas para evitar y obtener mayor rendimiento.

c) Tanto el apio como la lechuga y el rábano se reproducen por semilla; sin embargo, el cultivo de lechuga y apio se realizó en dos fases: semillero y trasplante, siendo la primera la más delicada y difícil pues la semilla tarda de 1 a 2 semanas en germinar y además lo hace de manera escalonada y caprichosa. Por el contrario, el cultivo definitivo es muy sencillo (18).

d) El riego se aplicó diariamente sobre el cultivo. Cada vegetal recibió aproximadamente 200 ml diarios de agua contaminada con un inóculo de 10^6 vibrios/ml. La contaminación del agua se mantuvo constante durante el estudio. Se utilizó una regadera manual de aluminio.

5. COSECHA DE LOS VEGETALES (18):

APIO: según la variedad, 90 - 120 días después del trasplante; se extrajo por completo el vegetal desde su raíz hasta sus hojas más superficiales.

LECHUGA: de acuerdo con la variedad, 50 - 80 días después del trasplante; se realizó a raz del suelo, de tal manera que la raíz queda dentro del mismo.

RABANO: de acuerdo con la variedad, a los 25 - 60 días después de la siembra; al igual que el apio se extrajo por completo desde la raíz hasta las hojas superficiales.

6. DETERMINACION DE V. cholerae 01 EN VEGETALES:

a. Contaminación externa (34,35):

i. Se pesaron 50 gramos de lechuga (hojas externas) sumergiéndolas en 450 ml de APA, agitando vigorosamente para llevar a cabo un buen lavado externo. De igual manera se hizo con el rábano y el apio.

ii. Al agregar el APA se obtuvo una dilución de 1:10. Se prepararon diluciones de 10^{-2} a 10^{-6} .

iii. Las diluciones se incubaron en APA a 37°C por 6-8 horas. Esto se realizó en los casos en los que se quiera ver

nada más presencia de la bacteria. Se debió omitir en el caso de la cuantificación.

iv. Se inocularon las diluciones en agar TCBS e incubaron 18-24 horas a 37°C.

v. Las colonias a observar fueron aquellas sucrosa positivo, de color amarillo. Estas se picaron y pasaron a TSI y a MH.

vi. Se realizaron pruebas bioquímicas: TSI (A/A, -, -); Prueba del cordón positiva; Oxidasa positiva; Gram negativo.

vii. Se confirmó lo anterior con los tests serológicos: Antisueros polivalentes de V. cholerae 01 y antisueros específicos Ogawa e Inaba.

b. Contaminación interna:

Se procedió de forma diferente para cada vegetal (32,34):

APIQ: se eliminó la capa externa del mismo con la ayuda de un pelador. Esto se hizo de los cuatro lados del tallo, obteniendo el centro de éste. La marcha a seguir fue la misma que en la determinación externa, excepto porque se trató de un licuado y no de agua de lavado.

LECHUGA: se quitó progresivamente cada una de sus hojas hasta llegar al centro del vegetal. Se siguió la marcha de la

determinación externa, utilizando un licuado de la misma.

RABANQ: se cortó de forma cuadrangular y se tomó el cuadrado del centro para analizar, utilizando de igual manera la misma técnica mencionada anteriormente.

c. Evaluación del efecto del transporte en los vegetales:

Para ello, los vegetales fueron expuestos al sol por largos períodos de tiempo (4 horas de 8:00 AM a 12:00 PM por 5 días), y se evaluó el grado de contaminación externa e interna. Del total de vegetales se tomaron 3 por día y se analizaron, de tal manera que se pudo establecer la diferencia en la contaminación dependiendo de los días de exposición. La técnica a ser utilizada fue la misma expuesta en los incisos a y b.

D. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS ESTADISTICO

1. Para comparar el efecto del agua de riego en la contaminación externa de los vegetales analizados (apio, lechuga y rábano) se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, la cual permitió establecer comparaciones múltiples entre los mencionados.

2. Para comparar el efecto de los tratamientos de riego y transporte, para la determinación de la contaminación externa, se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney.

Para llevar a cabo el análisis estadístico, los vegetales fueron cosechados y distribuidos al azar en dos grupos, los cuales correspondían a la determinación de su grado de contaminación en el momento de la cosecha y después de ser expuestos al sol. El análisis también se hizo al azar ya que los vegetales eran elegidos de acuerdo a su peso con el fin de obtener los 50 gramos requeridos. Las respuestas fueron dadas en UFC (Unidades Formadoras de Colonias) de V. cholerae 01/gramo de cada vegetal.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSION

El cultivo de los vegetales apio, lechuga y rábano, se realizó en un invernadero de acuerdo a las condiciones agronómicas establecidas, incluyendo la condición de riego con agua contaminada con Vibrio cholerae 01. El riego de estos vegetales se realizó diariamente en el primer mes de cultivo y cada cuarenta y ocho horas en los dos meses restantes. El agua utilizada se contaminó cada ocho días con un inóculo de 1×10^6 vibrios/ml. Esta concentración fue monitoreada diariamente la cual fue disminuyendo de 1×10^6 ad 1×10^2 vibrios/ml a los ocho días. La cosecha de los vegetales mencionados se efectuó en el tiempo correspondiente: un mes para el rábano y tres meses para la lechuga y el apio, obteniéndose 30 unidades de cada vegetal. Los vegetales cosechados fueron divididos en dos grupos de 15 unidades cada uno. El primero fue designado para el análisis de cuantificación externa y presencia de contaminación interna. El segundo fue designado para evaluar los cambios en la contaminación externa después de que éstos fueran expuestos al sol.

Los resultados de cuantificación de Vibrio cholerae 01 de la superficie de las muestras de apio, lechuga y rábano demostraron la presencia de contaminación externa. El grado de dicha contaminación varió de acuerdo al tipo de vegetal y estructura del mismo. El apio fue el que presentó una contaminación mayor, sobre todo a nivel de

las hojas. Así, la contaminación fue del orden de 1.6×10^5 UFC/g para las hojas de apio, seguido de 1.3×10^5 UFC/g en la lechuga; 1×10^5 UFC/g en el tallo de apio; y 9×10^2 UFC/g en el tubérculo del rábano (Tabla 1) (Gráficas 1-4).

A través de la prueba de Kruskal-Wallis se demostró que existe diferencia estadísticamente significativa, para un $p < 0.05$, por lo que al menos un grupo es diferente a los demás. Posteriormente, se realizaron Comparaciones Múltiples, con las cuales se comprobó que existe una diferencia estadísticamente significativa, para un $p < 0.05$, en el grado de contaminación externa entre las hojas de apio y su tallo, entre las hojas de la lechuga y el apio con respecto al rábano. Por otro lado, no se comprobó que existiera alguna diferencia en cuanto al grado de contaminación entre el tallo del apio y el rábano, entre las hojas y el tallo del apio respecto a las hojas de la lechuga (Tabla 2) (Gráfica 5).

En efecto, la diferencia en el grado de contaminación externa de estos vegetales se debe especialmente a que las bacterias pueden sobrevivir mejor sobre las hojas a nivel de la cutícula (tejido protector de la epidermis de las hojas), y a que la ultraestructura del tejido difiere, es decir, puede ser lisa o rugosa. Así, la concentración de bacterias varía según el vegetal analizado. Una superficie lisa no conserva el agua que incide sobre ella debido a que ésta resbala por la fuerza de la gravedad (caso del rábano y del tallo del apio). Por el contrario, la superficie rugosa permite el acúmulo de

cierta cantidad de agua y consecuentemente un acúmulo de bacterias (caso de las hojas del apio y de la lechuga) (17-24).

En el caso del rábano, las bacterias no sólo deben sobrepasar toda adversidad dentro de la tierra sino también llegar hasta la raíz, puesto que ésta se encuentra bajo tierra. Además, se debe de tomar en cuenta tanto la dilución del agua que se da desde el momento de la aplicación del riego hasta su dispersión en la tierra, como también el pH de la misma. Esto afecta directamente el grado de contaminación del rábano ya que estas condiciones no favorecen la sobrevivencia de la bacteria a este nivel. Es así como las concentraciones de bacterias aisladas en las hojas de apio y lechuga, en el tallo de apio y el rábano difieren considerablemente según su superficie (25-32).

La determinación del grado de contaminación interna de los vegetales se realizó en el mismo grupo evaluado para la contaminación externa, tomándose en cuenta todas las precauciones, como se describe en la metodología, para evitar una contaminación de la parte interna proveniente de la superficie externa. Los análisis demostraron la ausencia de Vibrio cholerae 01 como contaminante interno del tallo del apio, el centro de la lechuga y el tejido interno del rábano, respectivamente.

Los resultados obtenidos demuestran que el riego con agua contaminada con V. cholerae 01 originó la contaminación únicamente en la parte externa. Por lo que se deduce que la

bacteria no es capaz de llegar a la parte interna de los vegetales, mientras no pueda vencer las barreras físicas. En el caso de que el vegetal sufra daño de las hojas o de su tejido, la bacteria sí podría llegar a la parte interna del mismo. Esto fue demostrado en el rábano, pues se analizaron tres muestras que presentaban fisuras naturales las cuales aparecieron como consecuencia de su crecimiento ("reventados"). Estos mostraron un grado de contaminación interna similar a la externa de 6×10^2 UFC/g de vegetal (18,19).

En base a lo expuesto anteriormente, se afirma que se necesitaría de unas cuantas hojas de apio o de lechuga para alcanzar la dosis infectiva de 1×10^6 . Esto indica que cuando los vegetales son regados con agua contaminada pueden llevar una carga importante de vibrios que permite que sean considerados como productos de alto riesgo en la transmisión de la enfermedad, aunque no presenten contaminación interna. En el caso del rábano, éste presentó la menor contaminación. Tomando en cuenta que el peso de un rábano es de aproximadamente de 25 gramos, su contaminación externa asciende al orden de 2×10^4 vibrios/rábano. Por lo que se necesitaría consumir alrededor de 25 a 30 rábanos crudos en ensalada para acercarse a la dosis infectiva.

El grupo de vegetales que fue directamente expuesto al sol después de ser cosechado y que se sabe presentaba contaminación

externa, se colocó en un recipiente al aire libre bajo el sol por cuatro horas diarias durante cinco días, a temperatura ambiente, simulando ser transportados desde su lugar de cosecha hasta su lugar de venta. Esto con el propósito de observar si el efecto del sol, al aumentar la temperatura, permite la multiplicación del agente contaminante y por ende el aumento del grado de contaminación externa de los vegetales. A través de los resultados de los análisis diarios de la superficie de las hojas externas de la lechuga, de las hojas y el tallo del apio y del tubérculo del rábano, tomando como muestra dos a tres vegetales de cada uno, cada día (según su peso), se observó que la concentración de vibrios disminuyó. Esta disminución fue estadísticamente significativa según la prueba de U de Mann-Whitney, para un $p < 0.05$, mostrando que el grado de contaminación de los vegetales expuestos al sol en relación con aquellos recién cosechados varía considerablemente. La contaminación inicial del orden de 1×10^5 UFC/g (lechuga y apio) y 1×10^2 UFC/g (rábano) en el primer día de exposición, descendiendo hasta menos de 10 UFC/g de cada vegetal en los últimos tres días de exposición. Efectivamente, en todos los casos las medianas decrecieron hasta menos de 10 UFC/g de cada vegetal (Tabla 3) (Gráficas 1-4). Lo cual indica que la exposición al sol del vegetal no aumenta la población bacteriana presente sobre el tejido externo de éste sino todo lo contrario. Esto puede deberse a la pérdida de humedad como consecuencia directa de la pérdida diaria de agua por transpiración foliar (mecanismo de

absorción de agua de los vegetales). Sin embargo, la falta de humedad provoca el marchitamiento de los vegetales, lo que implica la pérdida de sus valores nutritivos y la consecuente eliminación como productos de consumo. Por ello, los vendedores acostumbran rociar el vegetal, con agua de procedencia dudosa, con el pretexto de mantener una apariencia de frescura ante la mirada del consumidor. Esto puede aumentar el grado de contaminación de dichos vegetales cuando éstos ya han sido contaminados con el agua de riego utilizada para su cultivo (1,39,43).

En base a los resultados obtenidos, se comprueba que el riego continuo de los vegetales, a lo largo de su cultivo, con agua contaminada con *V. cholerae* 01 trae como consecuencia una elevada contaminación externa de los mismos, por lo que estos vegetales pueden ser un vehículo potencial de transmisión del cólera. Siendo así, es importante que la preparación de estos vegetales a nivel del hogar, principalmente cuando éstos se ingieren crudos, incluya un buen lavado con agua limpia y la adición de un desinfectante para eliminar el riesgo de transmisión del cólera en el caso de que éstos puedan estar contaminados (13,16,24-27,30,32,48).

IX. CONCLUSIONES

A. El riego continuo con agua contaminada con V. cholerae 01, en una concentración que varía de 1×10^2 a 1×10^6 bacterias/ml, de los vegetales analizados (apio, lechuga y rábano) trae como consecuencia su contaminación externa.

B. El grado de contaminación externa varió dependiendo de la ultraestructura del tejido, así el de mayor grado de contaminación fueron las hojas de la lechuga (1.3×10^5 UFC/g) y del apio (1.6×10^5 UFC/g), seguido del tallo del apio (1×10^5 UFC/g) y del rábano (9×10^2 UFC/g).

C. El grado de contaminación externa de los vegetales regados con agua contaminada con V. cholerae 01, sobrepasa la dosis infectiva al ingerir unas cuantas hojas en el caso del apio y de la lechuga, y de 25 a 30 unidades en el caso del rábano.

D. Los vegetales (apio, lechuga y rábano) sometidos al riego continuo con agua contaminada con V. cholerae 01 no mostraron ningún grado de contaminación interna, por lo que esta bacteria no es capaz de vencer las barreras físicas de éstos a menos que exista daño tisular.

E. La exposición al sol de los vegetales apio, lechuga y rábano contaminados externamente con V. cholerae 01 incide en el grado de contaminación de éstos, disminuyéndola hasta menos de 10 UFC/g lo cual no es cuantificable.

X. RECOMENDACIONES

A. Trabajar en la aplicación y desarrollo de tecnologías apropiadas que contribuyan a mejorar la calidad sanitaria del agua de riego.

B. Aplicar métodos adecuados de lavado y desinfección antes de consumir los vegetales, principalmente los que se ingieren crudos, para asegurar su calidad sanitaria antes de su consumo.

C. Deshechar las hojas, los tallos o los tubérculos de aquellos vegetales que se consumen crudos y que presenten daño tisular como resultado del cultivo, de la cosecha o del transporte, puesto que es probable que presenten una contaminación interna cuya eliminación se dificulta.

XI. REFERENCIAS

1. Popovic T. et al. Cholera in the Americas; Foodborne Aspects. Atlanta: Division of bacterial and mycotic diseases. Center for Disease Control (CDC). J Food Prot 1992; 220:52-110.
2. Mata L. El Cólera; Historia, Prevención y Control. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica, 1992. 500 p.
3. Kelly MT, Hickman-Brenner FW, Farmer JJ. Vibrio; Manual of Clinical Microbiology. 5 ed. Washington D.C: American Society for Microbiology. 1991. 600 p.
4. Davis BD, Dulbecco R, Eisen H. Tratado de Microbiología. 3a ed. México: Salvat Editores, 1990. 489 p.
5. Sakazaki R. Vibrio infections. In: Foodborne Infections and Intoxications. 2 ed. New York: Riemann & Bryan, 1979. 385 p. (p.173-209).
6. Elliot EL, Kayner CA, Tamplin ML. Metodología de la Administración de Alimento y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para la recuperación, identificación y enumeración de las especies patogénicas de Vibrio incluyendo V. vulnificus, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus y otras especies de Vibrio. Washington: FDA, 1991. 75p.

7. WHO/CDC. Small risk of cholera transmission by food imports. In: Weekly epidemiological record. 1991; 2:45-51.
8. Power DA, McCuen PJ. Manual of BBL products and laboratory procedures. 6th ed. USA: Becton-Dickinson Microbiology Systems. 1988. 256p.
9. Yamamoto K, et al. Evidence that a non-O1 Vibrio cholerae produces enterotoxin that is similar but not identical to cholera enterotoxin. Infect Immun 1983; 41:896-901.
10. Guerrant RL, et al. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology; a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of Vibrio cholerae and Escherichia coli. Infect Immun 1984; 10:320-327.
11. OPS/OMS. Riesgos de transmisión del cólera por los alimentos. Washington: OPS/OMS, Doc. Tec. No. 704, 1991. 55p.
12. Blake PA, et al. Cholera in Portugal; Modes of transmission. Am Epidem 1977; 105:337-343.
13. Swerdlow D, et al. Waterborne transmission of epidemic cholera in Trujillo, Peru; Lessons for a continent at risk. Lancet 1992; 340:28-33.

14. Madden JM, McCardell BA. Vibrio cholerae. In: Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker Inc, 1992. 500 p. (p. 525-538).
15. Shuval HI, et al. Epidemiological evidence for helminth and cholera transmission by vegetables irrigated with wastewater; Jerusalem-a case study. Water Sc and Tech 1985; 17:433-442.
16. Tamaro D. Manual de horticultura. 9a ed. México: Gustavo Gili, 1981, 350 p.
17. Castelló R, et al. Biblioteca Práctica Agrícola y Ganadera-Los fundamentos de la Agricultura-Tomo II. 3a ed. España: Océano/Centrum, 1991: 450 p. (p. 93-173).
18. Castelló R, et al. Biblioteca Práctica Agrícola y Ganadera-Práctica de los Cultivos-Tomo III. 3a ed. España: Océano/Centrum, 1991: 480 p. (p. 153-173).
19. Halfagré F, Barden JA, García R. Horticultuta. 2a ed. México: AGT Editor, 1984. 605p.
20. Flores H. Cultivo de Hortalizas. Guatemala: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación; Unidad de formación de recursos humanos. Area de reproducciones e instrucciones a distancia, 1989. 293p.

21. Hatley RJ, Soffe RJ. Primrose Mc. Connell's: The Agricultural Notebook. 18 ed. New York, USA: Butterworths. 1988. 689p.
22. Bowen JE. Sistemas modernos de riego. Agricultura de las Américas 1990; 4:6-20.
23. Sandoval J. Principios de riego y drenaje. Guatemala: Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala-USAC. 1980. 88p.
24. Gurovich LA. Fundamentos y diseño de sistemas de riego. Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), 1985. 480p.
25. Gudiel VM. Manual Agrícola. 6a ed. Guatemala: SUPERB, 1987. 300 p.
26. Gould WA. Micro-contamination of horticultural products. Hort Science 1983; 8:12-15.
27. Samish Z, et al. The microflora within the tissue of fruits and vegetables. J Food Sc 1980; 28:259-266.
28. OPS/OMS/FAO. Informe final-Consulta técnica en inocuidad y comercialización de alimentos frente a la epidemia del cólera en las Américas. Argentina: Desarrollo de Programas de Salud. 1992. 26p.

29. DePaola A, et al. Elevated temperature method for recovery of V. cholerae from oysters (Crassostres gigas). Appl Environ Microbiol 1987; 53:1181-1182.
30. Microorganisms in foods. Their significance and methods of enumeration, 2 ed. London: ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) 1983. 213 p.
31. Baumann P, Schubert RH. Facultatively anaerobic Gram negative rods, Family II. Vibrionaceae. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins. 1984. 600p. (p. 516- 550).
32. West PA, Colell RR. Identification and Classification of Vibrionaceae; an overview. New York: John Wiley & Sons, 1984. 400p. (p. 285-363).
33. Han GK, Khie TD. A new method for the differentiation of V. comma and Vibrio El Tor. Am J Hyg 1963; 77:184-186.
34. Mejunkin F. Agua y Salud. México: AGT Editor, 1986. 200p. (p. 113-121).
35. Ayers RS, Wesxot DW. Water quality for agriculture. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1985. 82p.

36. WHO. Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture. Technical report series. Ginebra: WHO. 1989; 74:778-779.
37. De Portillo, Reyes I. Calidad bacteriológica del agua que abastece a la población del municipio de Champerico. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala-USAC (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1982. 85p.
38. Garg N, Churey JJ, Splittsoesser DP. Effect of processing conditions on the microflora of fresh cut vegetables. J Food Prot 1990; 53:701-703.
39. Kolvin JL, Roberts D. Studies on the growth of V. cholerae biotype El Tor and biotype Classical in foods. J Hyg Camb 1982; 89:243.
40. Barua D. Supervivencia del vibrión colérico en los alimentos, el agua y los fomites. Ch.4. Principios y Práctica de la lucha contra el cólera. Ginebra: OMS, 1970.
41. Gerichter CB, et al. Viability of V. cholerae biotype El Tor and of cholera phage on vegetables: Israel: J Med Sci 1975; 11:889.
42. Spira WM, et al. Gauze filtration and enrichment procedures for recovery of V. cholerae from contaminated waters. Appl Environ Microbiol 1981; 42:730-733.

43. Feachem RG. Environmental aspects of cholera epidemiology: A review of select reports of endemic and epidemic situations during. Trop Dis Bull 1980; 78:675-698.

44. Feachmen RG, et al. Sanitation and disease: health aspects of excreta and wastewater management. Trop Dis Bull 1983;25:410-413.

45. Samayoa A. Implicaciones en la transmisión de las enfermedades diarreicas, de los productos hortícolas de hoja verde que se consumen frescos. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala-USAC (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1988. 62p.

46. Castro ME. Características bacteriológicas de productos hortícolas del género Apium comercializados y consumidos en forma fresca. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala - USAC (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1986. 120p.

47. Cano F, García de Gómez D. Manual de técnicas microbiológicas para el análisis de alimentos y agua. Honduras: Dirección General de Salud; División de control de alimentos, 1992. 63p.

48. Barrett TJ, et al. Use of Moore swabs for isolating V. cholerae from sewage. J Clin Microbiol 1980; 11:385-388.

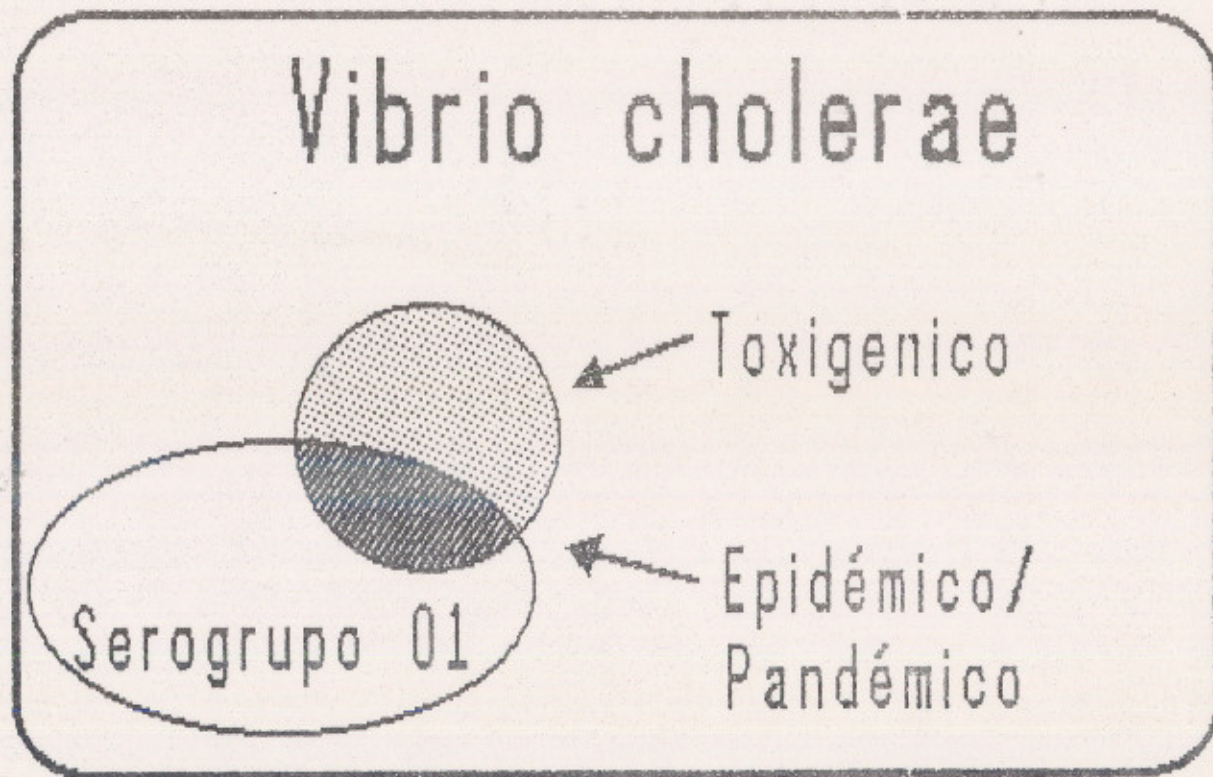
49. INCAP/CDC/OPS. Métodos de laboratorio para V. cholerae; Manual para el curso internacional de capacitación en "Aislamiento e identificación de V. cholerae". Guatemala: INCAP, 1992. 80 p.

50. FAO/OMS. Importancia de la inocuidad de los alimentos para la salud y el desarrollo. Ginebra: FAO/OMS. Doc. Tec. No. 505, 1984.

XII. ANEXOS

	PP.
1. <u>V. cholerae</u> : Interrelación del serogrupo 01, habilidad para producir toxina y para causar enfermedad.	54
2. Diferenciación de los biotipos de <u>V. cholerae</u> 01.	55
3. Pandemias del cólera 1800-1991.	56
4. Diferenciación de los serotipos de <u>V. cholerae</u> 01	57
5. Vías de transmisión del cólera.	58
6. Contenido nutricional y composición química y calorimétrica de las hortalizas.	59
7. Sales comunes en el agua de riego.	60
8. Sobrevivencia de <u>Vibrio cholerae</u> 01 en hortalizas.	61
9. Apio	62
10. Lechuga	63
11. Rábano	64
12. Tablas (1 - 3)	65
13. Gráficas (1 - 5)	68

V. cholerae: Interrelación del Serogrupo 01, habilidad para producir toxina y para causar epidemia



ANEXO 1

Ref. 1

Popovic T. et al. Cholera in the Americas; Foodborne Aspects. Atlanta: Division of bacterial and mycotic diseases. Center for Disease Control (CDC). J Food Prot 1992; 220: 52-110.

ANEXO 2

DIFERENCIACION DE LOS BIOTIPOS DE V. cholerae 01

CARACTERISTICA	CLASICO	EL TOR
Prueba de Voges Proskawer	-	+
Aglutinación de eritrocitos de pollo	-	+
Hemólisis de eritrocitos de carnero	-	+
Inhibición por la Polimixina B	sí	no
Sensibilidad al colerafago:		
Clasico IV	sí	no
El Tor 5	no	sí

Ref: Davis E.D., Dulbecco R., Eisen H. Tratado de microbiología.
3a ed. México: Salvat Editores, 1990.

ANEXO 3

PANDEMIAS DEL COLERA 1800 - 1991

PANDEMIA	Años de duración	Años interpandemias	COBERTURA
Primera 1817	5-6		Viejo Mundo
Segunda 1829	5	6	Global
Tercera 1852	8	18	Global
Cuarta 1863	10	3	Global
Quinta 1881	15	8	Global
Sexta 1899	24	3	Viejo Mundo
Séptima 1961 1991	30	38	Global

Ref: Mata L. El Cólera: Historia. Prevención y Control. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica, 1992.

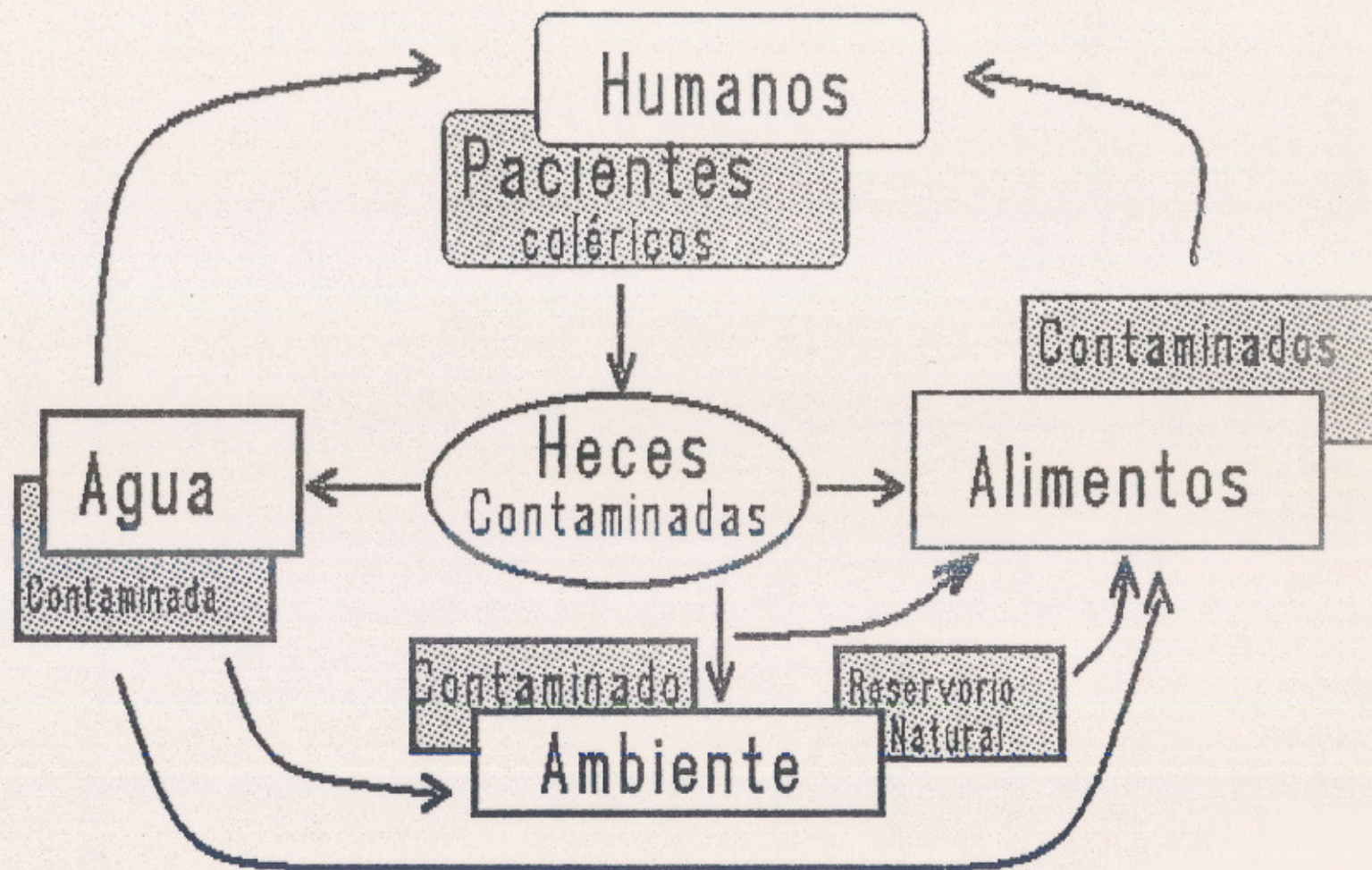
ANEXO 4

DIFERENCIACION DE LOS SEROTIPOS DE V. cholerae 01

SEROTIPO	ANTIGENOS SOMATICOS PRESENTES	AGLUTINACION	
		Anti-Inaba	Anti-Ogawa
Inaba	A y C	+	-
Ogawa	A y B	-	+
Hikojima	A , B y C	+	+

Ref: Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H. Tratado de microbiología.
3a ed. México: Salvat Editores. 1990.

Vías de transmisión del cólera



58

Anexo 5

Ref. 1 Popovic T. Cholera in the Americas; Foodborne Aspects. Atlanta: Division of bacterial and mycotic diseases. Center for Disease Control (CDC). J Food Prot 1992; 220: 52-110.

ANEXO 6

CONTENIDO DE NUTRIENTES DE LAS HORTALIZAS

VEGETALES frescos	VIT. A (factor de crecimiento)	VIT. B (anti-reumático)	VIT. C (anti-escorbútica)
Lechuga	++	+	+
Rábano	-	+	-
Apio	+	+	-

COMPOSICION QUIMICA Y CALORIMETRICA DE LOS ALIMENTOS

VEGETALES	100g de alimento proporcional al organismo			
	PROTEINAS	GRASAS	HIDRATOS DE CARBONO	CALORIAS
HORTALIZAS	grs.	grs.	grs.	grs.
Lechuga	1,3	0,5	3,0	24
Apio	1,0	0,4	12,0	58
Rábano	1,2	0,2	6,0	30

Ref: Tamaro D. Manual de Horticultura. 9a edición. México: Gustavo Gili, 1981.

ANEXO 7

SALES COMUNES EN EL AGUA DE RIEGO

NOMBRE	FORMULA	PESO EQUIVALENTE
Cloruro de calcio	CaCl ₂	55.50
Sulfato de calcio	CaSO ₄	68.07
Yeso	CaSO ₄ .2H ₂ O	89.09
Carbonato de calcio	CaCO ₃	50.04
Cloruro de magnesio	MgCl ₂	47.62
Sulfato de magnesio	MgSO ₄	60.19
Carbonato de magnesio	MgCO ₃	42.16
Cloruro de sodio	NaCl	58.45
Sulfato de sodio	Na ₂ SO ₄	71.03
Carbonato de sodio	Na ₂ CO ₃	53.00
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	84.01
Cloruro de potasio	KCl	74.56
Sulfato de potasio	K ₂ SO ₄	87.13
Carbonato de potasio	K ₂ CO ₃	69.10
Bicarbonato de potasio	KHCO ₃	100.11

Ref: Castelló R. et al. Biblioteca Práctica Agrícola y Ganadera - Los fundamentos de la Agricultura - Tomo II. 3a edición. España: Océano / Centrum, 1991: pp. 93 - 134.

ANEXO 8

SOBREVIVENCIA DE *V. cholerae* EN HORTALIZAS

HORTALIZA	TIEMPO DE SUPERVIVENCIA A	
	TEMP. AMBIENTE	REFRIGERADOR
Apio, hojas	3d - 5d	1s - 2s
Tallo	3d - 5d	1s - 2s
Perejil crudo	3d - 5d	1s
Lechuga, hojas	3d - 5d	1s - 2s
Rábano	1d - 2d	2d - 5d
Brócoli	1d - 2d	2d - 3d
Repollo, hojas	4d - 7d	1s - 2s
Papa, exterior	1d - 2d	1s
cocida	5d - 7d	2s
Pepinos, exterior	5d - 7d	1s - 2s
rodajas	5d - 7d	1s - 2s

d= días
s= semanas

Ref: OPS/OMS. Riesgos de transmisión del cólera por los alimentos. Washington : OPS/OMS, Doc. Tec. No.704, 1991. pp 55.

ANEXO 9

APIO



Nombre botánico: *Apium graveolans*

Familia: Umbelíferas

El apio es una planta con raíz vertical, fibrosa, oscurorrojiza por fuera y blanca por dentro (11). Para su cultivo se necesita agua en abundancia, y por este motivo conviene un terreno fresco, muy rico en sustancias vegetales y abonado adecuadamente (de preferencia con una combinación de estiércol, y abonos químicos) (12).

Se reproduce por semilla, la cual germina entre diez y veinte días. El sistema de siembra es de transplante. Se le cultiva para el aprovechamiento de sus peciolo y tallos que se consumen en estado fresco, en ensaladas y cocido en diferentes platillos a los que imparte un sabor especial. Es bajo en calorías con buen contenido de vitamina A, calcio, magnesio, fósforo y potasio (11 - 14).

ANEXO 10

LECHUGA



Nombre botánico: Lactuca sativa

Familia: Compuestas

La planta está constituida por una roseta de hojas grandes según la variedad pueden ser de hojas sueltas o arrepolladas, formando una cabeza de hojas en el centro. Entre las variedades de lechuga que se cultivan en Guatemala, en su orden, son las denominadas de cabeza o arrepolladas, del país de hojas lisas. La semilla germina de cinco a diez días la cual se transplanta luego para lograr un desarrollo óptimo. La duración del cultivo, de la siembra a la recolección para las variedades de lechugas de verano es de 50 a 60 días. Se le cultiva para el aprovechamiento de sus hojas que se consumen en estado fresco, teniendo buen contenido de vitamina A, vitamina B1 y vitamina B2 (11 - 14).

RABANO



Nombre botánico: Raphanus sativus

Familia: Crucíferas

Con el nombre genérico de rábano se suelen comprender las crucíferas que pertenecen a la especie Raphanus sativus. Se distinguen dos subespecies: a) Raphanus sativus major (rábano) que es el más voluminoso, tiene la pulpa compacta y dura. Es de sabor más agudo y picante b) Raphanus sativus parvus (rabanito) es pequeño y se puede cultivar y consumir durante todo el año. En cuanto a su cultivo necesita de un terreno rico, bien preparado, blando y fresco. Se cosecha después de los 25 a los 60 días de la siembra. Se reproduce por semilla, la cual germina en dos a cuatro días y se hace por siembra directa.

Se le cultiva para el aprovechamiento de su raíz carnosa que es de forma redonda, oblonga larga y el color de la piel roja, blanca o negra (11 - 14).

TABLA No.1

GRADO DE CONTAMINACION EXTERNA
DE LOS VEGETALES RECIEN COSECHADOS

	RABANO $\times 10^2$ UFC/g	LECHUGA $\times 10^6$ UFC/g	APIO-TALLO $\times 10^6$ UFC/g	APIO-HOJAS $\times 10^6$ UFC/g
	6.6	1.03	0.4	1.0
	8.0	1.16	0.7	1.2
	8.2	1.20	0.7	1.2
	8.4	1.21	0.7	1.3
	8.5	1.23	0.8	1.4
	8.8	1.25	0.8	1.5
	9.0	1.26	0.8	1.6
	9.0	1.27	0.9	1.6
	9.2	1.28	1.0	1.6
	9.5	1.30	1.0	1.8
	9.8	1.30	1.2	1.8
	10.0	1.30	1.4	2.0
	10.7	1.31		10.7
	11.0	1.33		11.0
		1.45		
MEDIANA	9.0	1.27	0.8	1.55
RANGO	6.6 - 11	1.03 - 1.45	0.4 - 1.4	1.0 - 11.0
n_i	14	15	12	14

$p < 0.05$

TABLA No.2
PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS
COMPARACIONES MULTIPLES

GRUPO	CASOS	RANK MEDIO
Apio - Tallo	12	22.5
Apio - Hojas	12	43.083
Lechuga	15	35.933
Rábano	14	7.5

GRUPO	ΔR	RELACION	COMPARADOR	DIFERENCIA
Apio tallo vrs Apio hojas	20.583	>	16.613	+
Apio tallo vrs Lechuga	13.433	<	15.761	-
Apio tallo vrs Rábano	15.000	<	16.009	-
Apio Hojas vrs Lechuga	9.150	<	15.761	-
Lechuga vrs Rábano	28.433	>	15.122	+
Apio Hojas vrs Rábano	35.583	>	16.009	+

+ sí hay diferencia estadísticamente significativa

- no hay diferencia estadísticamente significativa

($p < 0.05$)

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS
Biblioteca Cen

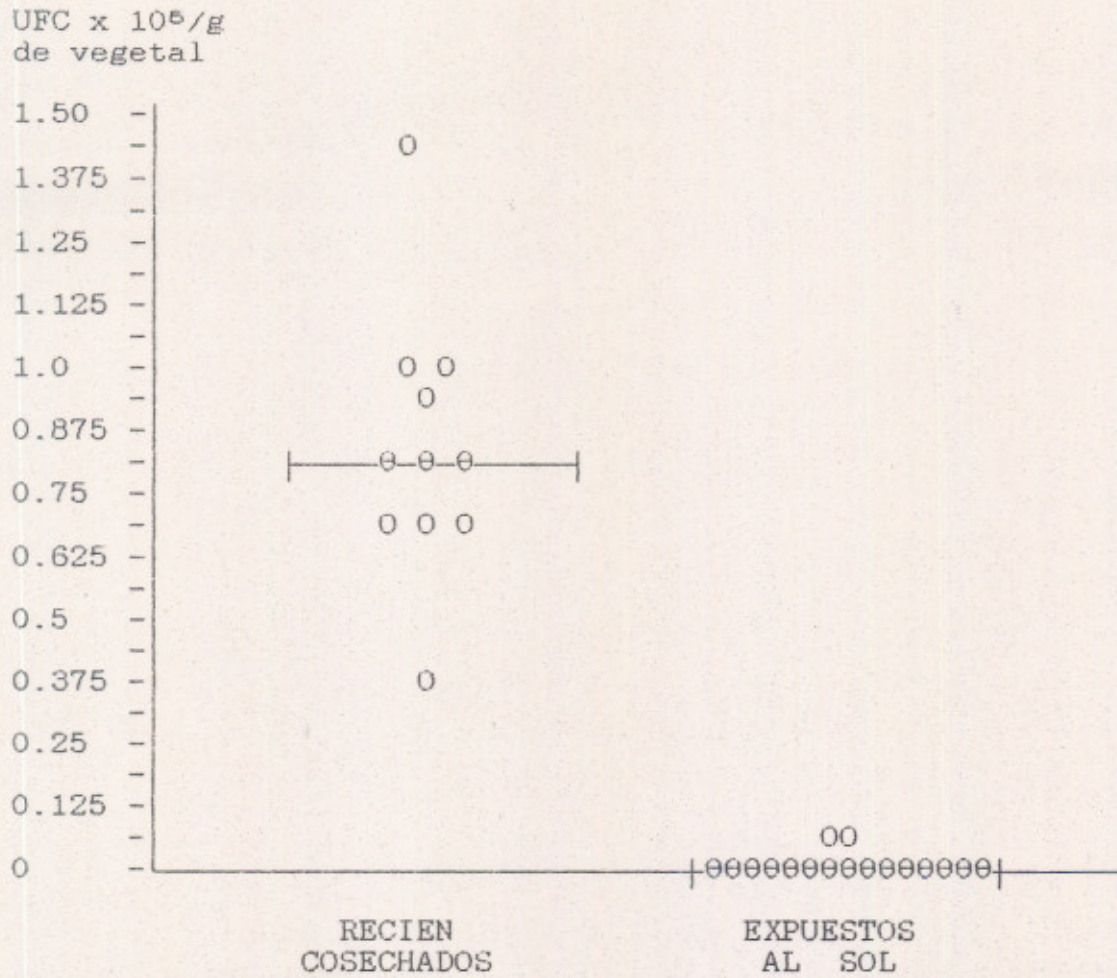
TABLA No.3

GRADO DE CONTAMINACION EXTERNA
DE LOS VEGETALES EXPUESTOS AL SOL

	RABANO x 10 ² UFC/g	LECHUGA x 10 ⁵ UFC/g	APIO-TALLO x 10 ⁵ UFC/g	APIO-HOJAS x 10 ⁵ UFC/g
	< 10	< 10	< 10	< 10
	< 10	< 10	< 10	< 10
	< 10	< 10	< 10	< 10
	< 10	0.0002	< 10	< 10
	< 10	0.0002	< 10	< 10
	< 10	0.0003	< 10	< 10
	< 10	0.007	< 10	< 10
	< 10	0.008	< 10	< 10
	< 10	0.010	< 10	< 10
	< 10	0.045	< 10	< 10
	< 10	0.046	< 10	< 10
	0.10	0.048	0.002	< 10
	0.12	0.050	0.003	0.1
	0.80	0.055	0.010	0.2
	2.40	0.055	0.020	1.0
MEDIANA	< 10	0.008	< 10	< 10
RANGO	<10 - 2.40	<10 - 0.055	<10 - 0.02	< 10 - 1.0
n _i	15	15	15	15

p < 0.05

GRAFICA No.1
 DISTRIBUCION DE DATOS DE LA CONTAMINACION
 EXTERNA DEL TALLO DEL APIO



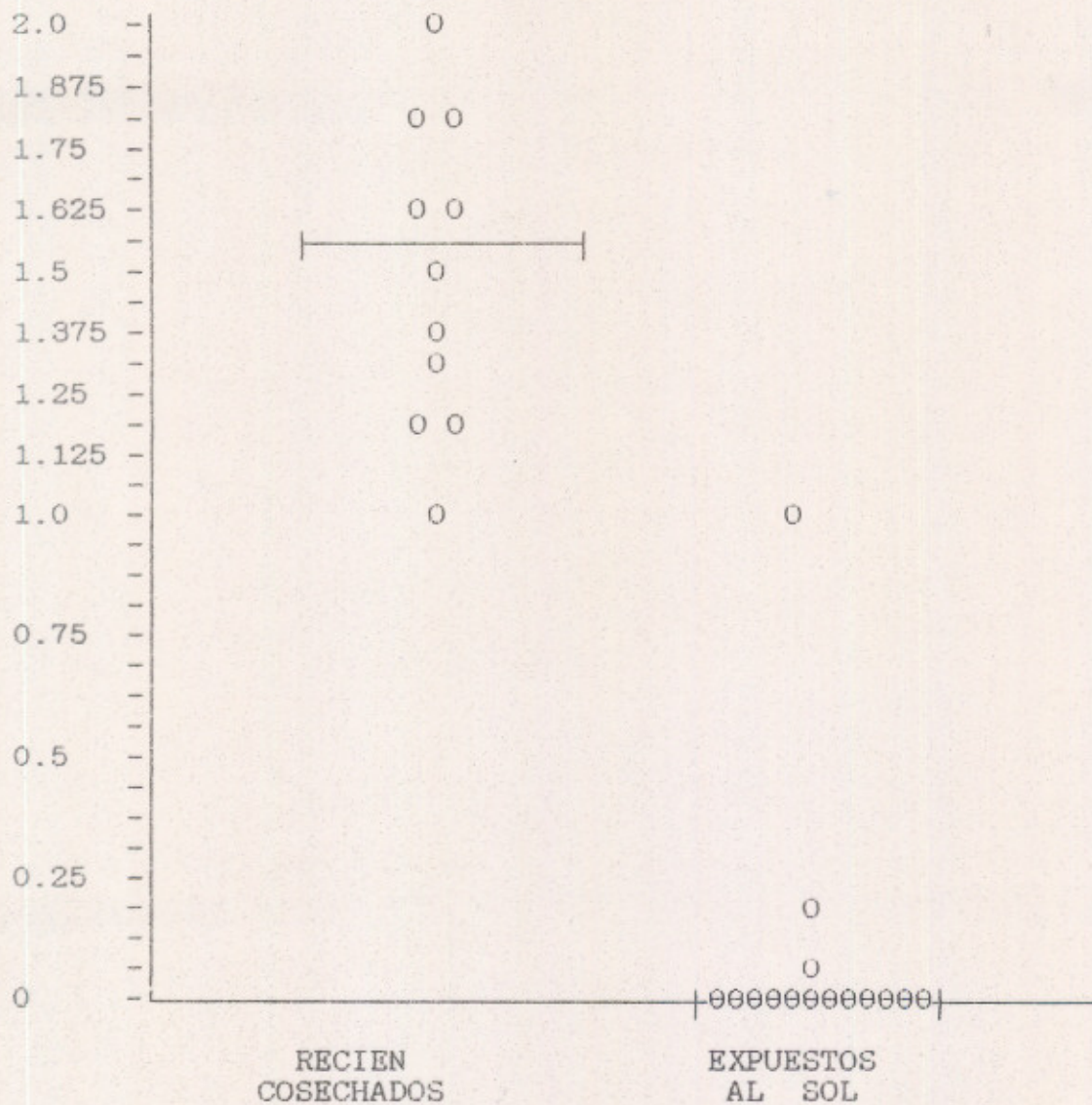
Mediana: |-----|

Datos: 0

GRAFICA No.2

DISTRIBUCION DE DATOS DE LA CONTAMINACION
EXTERNA DE LAS HOJAS DE APIO

UFC x 10⁵ /g
de vegetal



RECIEN
COSECHADOS

EXPUESTOS
AL SOL

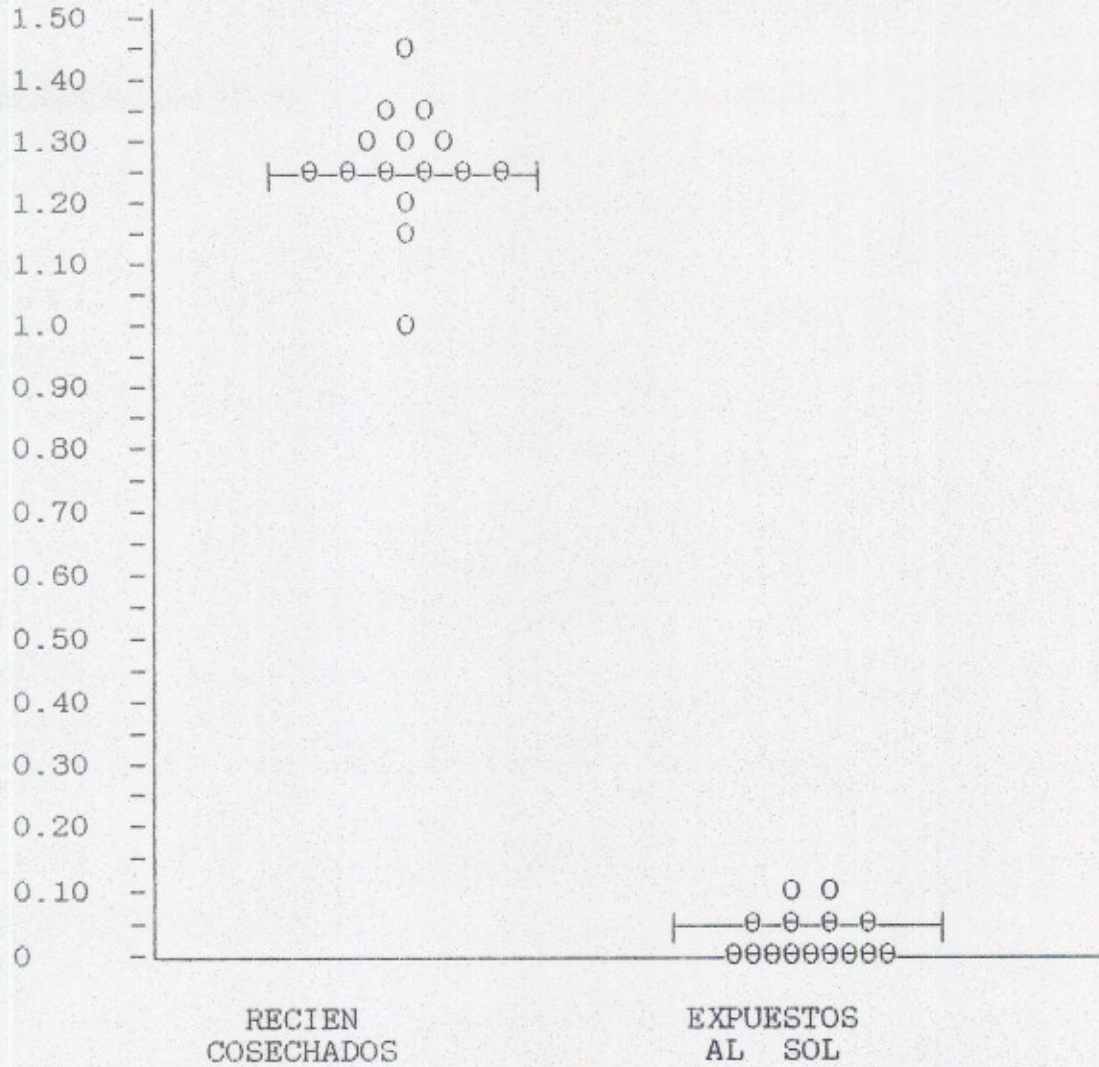
Mediana: |-----|

Datos: 0

GRAFICA No.3

DISTRIBUCION DE DATOS DE LA CONTAMINACION
EXTERNA DE LAS HOJAS DE LECHUGA

UFC x 10⁵ /g
de vegetal



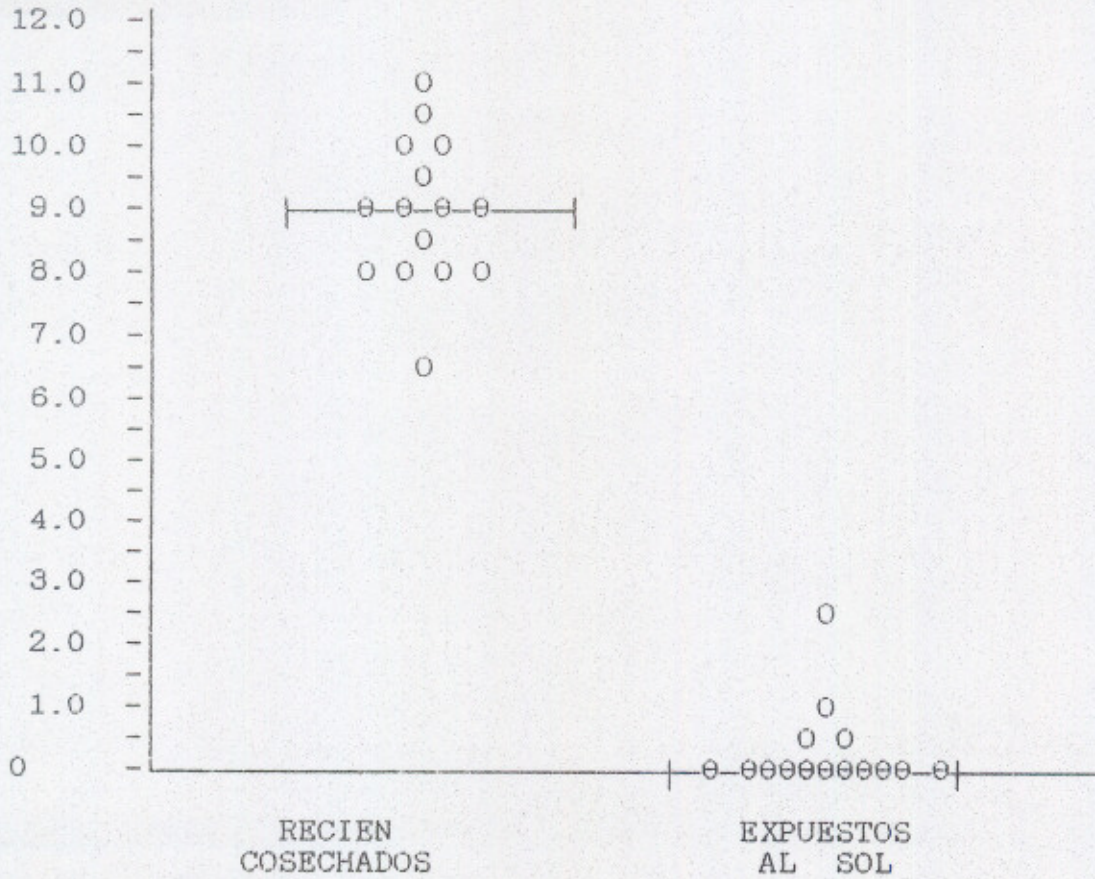
Mediana: |—————|

Datos: 0

GRAFICA No.4

DISTRIBUCION DE DATOS DE LA CONTAMINACION
EXTERNA DEL TUBERCULO DEL RABANO

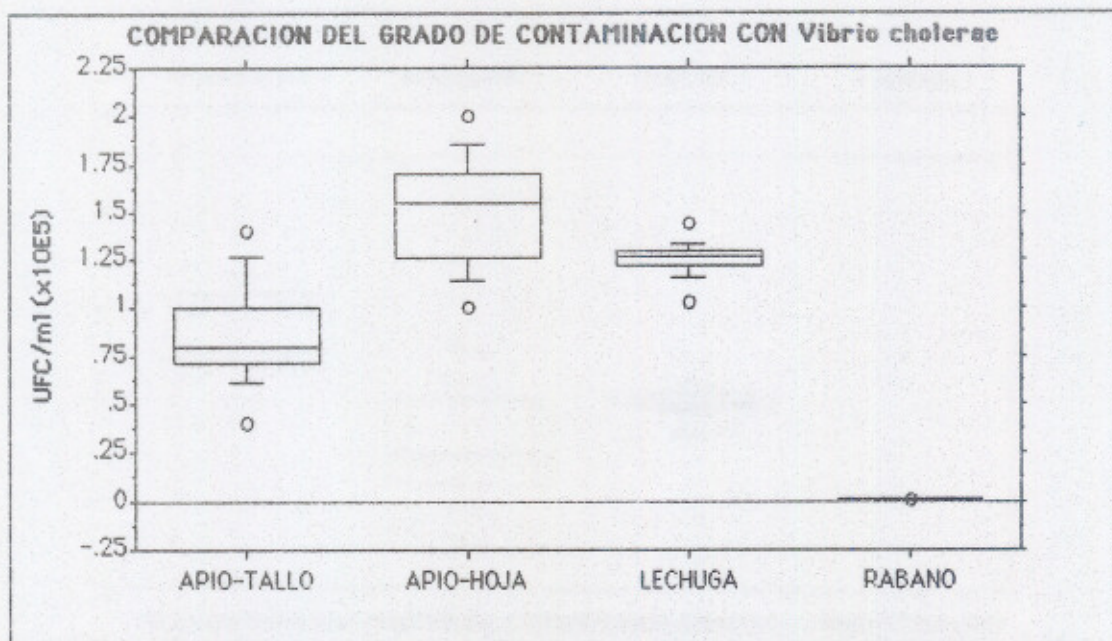
UFC X 10²/g
de vegetal

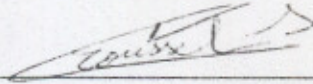


Mediana: |-----|

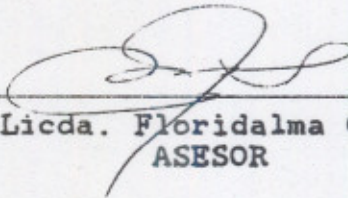
Datos: 0

GRAFICA No.5





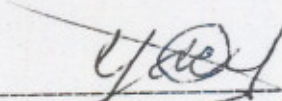
Clodette M. Rousselin
TESISTA



Licda. Floridalma Cano
ASESOR



Lic. Gustavo Gini
DIRECTOR DE ESCUELA



Licda. Clemencia Gilvez de Avila
DECANO