



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE INGENIERO EN INDUSTRIAS AGROPECUARIAS

Calidad microbiológica de lechuga lista para el consumo.

TRABAJO DE FIN TITULACIÓN

AUTOR: Andrade Roblez, Yanio Fernando

DIRECTORA: Hualpa Salinas, Diana Inés, Mg. Sc.

LOJA ECUADOR

2015

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Magister.

Diana Inés Hualpa Salinas

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: “Calidad microbiológica de lechuga lista para el consumo” realizado por Andrade Roblez Yanio Fernando ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la aprobación del mismo.

Loja, marzo de 2015.

f) Diana Inés Hualpa Salinas, Mg.

C.I: 1102806062

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo. Yanio Fernando Andrade Roblez declaro ser autor del presente trabajo de fin de titulación: Calidad microbiológica de lechuga lista para el consumo, siendo la Mg. Diana Inés Hualpa Salinas directora del presente trabajo; y eximo expresamente a Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y los resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f).....

Autor: Andrade Roblez Yanio Fernando

C.I: 1104468689

DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres por su ejemplo de superación y perseverancia.

A mis hermanos por todo su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por ser la fuerza de mi vida, y permitirme cumplir esta meta en mi vida.

A mis padres, Andrade Mario y Roblez Elsa, y a toda mi familia por su apoyo incondicional durante toda mi vida.

A mi directora de tesis, Mg. Diana Inés Hualpa Salinas por su valiosa colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, y a todos mis catedráticos por todo su esfuerzo y conocimiento impartido.

INDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
GLOSARIO.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
I. REVISIÓN LITERARIA	5
1.1 Lechuga.....	6
1.2 Vegetales listos para el consumo	6
1.3 Microorganismos indicadores	7
1.3.1 Aerobios mesófilos.....	7
1.3.2 Coliformes totales	8
1.3.3 <i>Escherichia coli</i>	8
1.4 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)	9
1.4.1 Intoxicación	9
1.4.2 Infección.....	9
1.4.3 Toxi-infección.....	10
II. OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	12
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1 Materia prima.....	14
3.2 Muestreo y preparación de la muestra.....	14
3.3 Recuento de aerobios mesófilos.....	14
3.4 Recuento de coliformes totales y <i>E. coli</i>	17
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	20
4.1 Aerobios mesófilos.....	20

4.2 Coliformes totales	21
4.3 <i>E. coli</i>	22
CONCLUSIONES.....	25
RECOMENDACIONES.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27
ANEXOS.....	31

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Preparación de reactivos.....	30
ANEXO B. Resultados de aerobios mesófilos.....	31
ANEXO C. Resultados de coliformes totales.....	34
ANEXO D. Resultados de <i>escherichia coli</i>	37
ANEXO E. Límites para microorganismos indicadores.....	38

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Recuento de aerobios mesófilos en lechuga lista para el consumo.....	20
Tabla 2. Recuento de coliformes totales en lechuga lista para el consumo.....	21
Tabla 3. Número de muestras con presencia de <i>E. coli</i> en lechuga lista para el consumo.....	22
Tabla 4. Microorganismos y límites establecidos por las normas tomadas como referencia.....	31
Tabla 5. Cuadro de resultados de aerobios mesófilos.....	34
Tabla 6. Cuadro de resultados de coliformes totales.....	36
Tabla 7. Tabla del Número Más Probable (NMP) por ml/g de muestra.....	37
Tabla 8. Cuadro de Presencia / Ausencia de <i>E. coli</i>	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Presencia de aerobios mesófilos (agar plate count).....	15
Figura 2. Determinación de aerobios mesófilos.....	16
Figura 3. Presencia de coliformes totales (Disco Colicomplete en caldo LST).....	18
Figura 4. Resultado positivo para <i>E. coli</i>	18
Figura 5. Determinación de coliformes totales y <i>E. coli</i>	19
Figura 6. Resultados del cumplimiento e incumplimiento microbiológico de muestras de lechuga lista para el consumo.	23

GLOSARIO

AM:	aerobios mesófilos
APC:	agar plate count
BPA:	buenas prácticas agrícolas
BPM:	buenas prácticas de manufactura
°C:	grados Celsius
CT:	coliformes totales
ETAs:	enfermedades transmitidas por alimentos
FD:	factor de dilución
g:	gramo
HACCP:	análisis de peligros y puntos críticos de control
L:	litro
LTS:	lauryl sulfato triptosa
mL:	mililitro
NaOH:	hidróxido de sodio
NMP:	número más probable
VLC:	vegetales listos para el consumo

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la calidad microbiológica de lechuga lista para el consumo de diferentes marcas que se comercializa en la ciudad de Loja, mediante la determinación de microorganismos indicadores de higiene. Se analizaron 25 muestras de lechuga lista para el consumo de diferentes tipos empacadas en fundas de polipropileno. Se determinó aerobios mesófilos por el método de recuento en placa, coliformes totales y *E. coli* por la técnica de número más probable usando discos Colicomplete (Biocontrol, Bellevue, WA). El recuento de AM fue de 5.14 a 5.98 log (UFC/g), para CT estuvo entre 2.82 a 4.82 log NMP/g y presencia de *E. coli* en 5 muestras. De acuerdo a normativas utilizadas como referencia el 32% de las muestras sobrepasó el límite permisible para AM, el 100% de las muestras presentaron recuentos de CT superiores a los límites establecidos; y, el 20% de las muestras tuvieron presencia de *E. coli*. Los resultados reflejan que existe contaminación en este tipo de vegetal y se debe considerar a estos alimentos como factor de riesgo de posibles enfermedades de transmisión alimentaria.

PALABRAS CLAVES: Aerobios mesófilos, coliformes totales, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

The main objective of the present research was to evaluate the microbiologic quality of ready-to-eat lettuce of different commercial brands which are sold in Loja, throughout indicator microorganism determination. 25 samples were analyzed of ready-to-eat lettuce of different types packed in polypropylene sleeves. Mesophilic aerobic bacteria were determined by plate count method, total coliforms and *E. coli* by the technique of most probable number was applied using colicomplete discs. The MA count was 5.14 to 5.98 log UFC/g, and TC was 2.82 to 4.82 log NMP/g, and *E. coli* presence in 5 samples. According to standards used as reference 32% of the samples exceeded the permissible limit for mesophilic aerobic, 100% of the samples showed total coliform counts above the established limits; and 20% of the samples had the presence of *E. coli*. The results show that there is contamination in this type of vegetable and should be considered for these foods as possible risk factor for foodborne illness.

KEYWORDS: Mesophilic aerobics, total coliforms, *Escherichia coli*.

INTRODUCCIÓN

Los vegetales son componentes dietéticos importantes al proporcionar nutrientes esenciales, como vitaminas, minerales, fibras, antioxidantes y muchos beneficios para la salud (Abdullahi y Abdulkareem 2010, De Giusti et al. 2010).

El aumento de la demanda de vegetales frescos ha dado lugar a un crecimiento en la cuota de mercado de vegetales listos para el consumo (VLC) (De Giusti et al. 2010). Los VLC son aquellos que han sido expuestos a operaciones simples (selección, lavado, pelado, corte, desinfección, enjuague, secado y envasado), con el fin de extender la vida útil y preservar las propiedades nutritivas y sensoriales (Da Cruz et al. 2006, Ritter et al. 2012). Estos pasos pueden no ser eficientes para eliminar la contaminación con parásitos y virus, y además de esto, el almacenamiento bajo refrigeración puede favorecer el crecimiento de patógenos psicótopos y microorganismos de deterioro (Oliveira et al. 2011, Jeddi et al. 2014).

Lamentablemente estos productos son expuestos a la contaminación microbiológica ya que los fertilizantes orgánicos que se usan a menudo consisten en abono y estiércol (Aycicek et al. 2006, Seo et al. 2010). Por lo tanto durante la cosecha, la microbiota superficial de vegetales comprende principalmente saprófitos Gram negativas, pero también se pueden encontrar microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*, causando síntomas de gastroenteritis, e incluso infecciones crónicas (Seo et al. 2010, Oliveira et al. 2011).

La calidad microbiológica de VLC ha sido motivo de preocupación por estar asociados con el incremento de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) (Mukherjee et al. 2006, Valentin-Bon et al. 2008, Sant'Ana et al. 2011), ya que se comercializan como producto desinfectado y las personas a menudo los consumen directamente de la bolsa sin tratamiento adicional (Kase et al. 2012). El manejo cuidadoso de la higiene del proceso es crucial para evitar la presencia de riesgos microbianos desde un procesamiento mínimo que no es un tratamiento final de conservación (Sant'Ana et al. 2011). En este sentido, el uso de microorganismos indicadores, tales como: Aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. Coli*, permiten evaluar el nivel de contaminación y la calidad sanitaria de estos alimentos (Valentin-Bon et al. 2008, Seo et al. 2010, Maistro et al. 2012, Maffei et al. 2013).

Este estudio se enmarca dentro del proyecto “Calidad microbiológica en verduras listas para el consumo”, que está ejecutando el Departamento de Ciencias Agropecuarias y Alimentos, la Sección departamental Ciencias y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja en colaboración con Food and Drug Administration (FDA).

Los resultados que se obtengan en el proyecto servirán para informar y concienciar a los productores sobre la importancia de garantizar mediante la mejora de los procesos, la calidad microbiológica de este tipo de productos.

I. REVISIÓN LITERARIA

1.1 Lechuga

La lechuga pertenece a la familia de las *Compositae*, especie *Lactuca sativa L.* Se utiliza casi exclusivamente para consumo en fresco, principalmente en ensalada (Sánchez Pineda de las Infantas 2004). Es una importante fuente de proteínas, vitaminas, fibras, minerales y constituir un alimento fresco de alto contenido de agua y bajo valor energético; además su consumo regular reduce el riesgo de ciertas enfermedades cardiovasculares, obesidad, cáncer, entre otros (Ignarro et al. 2007, Habibi Najafi y Bahreini 2012).

El consumo de estos vegetales es comúnmente visto como un factor de riesgo potencial para la infección por microorganismos que se albergan en la superficie; su tipo y el nivel varía de acuerdo con la condición del suelo, el tipo de fertilizantes, el agua de riego y la calidad del aire (Barker-Reid et al. 2009, Gomiero et al. 2011). De esta fuente se esperan mohos, levaduras y bacterias de ácido láctico. Pueden haber patógenos, sobre todo del tipo entérico (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Cyclospora*, *Giardia*) presentes cuando el suelo está contaminado con aguas residuales no tratadas (Loncarevic et al. 2005). Las enfermedades de las plantas, el daño de la superficie (antes, durante y después de cosechar), un retraso entre la cosecha y el lavado, un almacenamiento y condiciones de transporte desfavorables después de cosechar y antes de procesar pueden aumentar en gran medida los números microbianos, además de los tipos predominantes (Oliveira et al. 2012, Ritter et al. 2012).

1.2 Vegetales listos para el consumo

Son aquellos que han sido expuestos a operaciones simples en su proceso industrial (lavado, pelado, cortado, lavado con agua clorada, escurrido por centrifugado, pesado y empacado en películas plásticas de permeabilidad diferencial) (Ritter et al. 2012), con el objetivo de preservar su frescura, calidad nutricional y propiedades sensoriales (Da Cruz et al. 2006). Se espera que además de los aspectos de la salud, el procesamiento mínimo dirijan las expectativas de los consumidores para que sean alimentos seguros y fáciles de usar (Jacxsens et al. 2010). El aumento de la demanda y el consumo de VLC, están asociados con el incremento de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs), intensificando las preocupaciones con la seguridad de estos productos (Heaton y Jones 2008, Seo et al. 2010). Esto se debe a la

aplicación de estrategias ineficientes de buenas prácticas agrícolas (BPA), buenas prácticas de manufactura (BPM), análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) durante sistemas de producción, elaboración, envasado y distribución (De Giusti et al. 2010, Maffei et al. 2013, Uyttendaele et al. 2014).

1.3 Microorganismos indicadores

Se aplica a cualquier grupo taxonómico, fisiológico o ecológico de bacterias, cuya presencia o ausencia proporcione evidencia indirectas de la presencia en la muestra de algún aspecto singular anterior (Forsythe et al. 2003). Determinados microorganismos en los alimentos (Bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales, coliformes fecales como la *Escherichia coli*) son utilizados como indicadores, ya que con su presencia y cuantificación aportan información sobre la seguridad sanitaria del alimento, su grado de alteración, su nivel de envejecimiento y la eficiencia del proceso de elaboración (Seo et al. 2010, Maistro et al. 2012, Maffei et al. 2013).

1.3.1 Aerobios mesófilos.

Se desarrollan en presencia de oxígeno libre y a una temperatura comprendida entre 20 y 45°C con una zona óptima entre 30 y 40°C (Jeantet et al. 2010). En el recuento se estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos y no constituye un indicador de la posible presencia de patógenos (Seow et al. 2012). Estos microorganismos están presentes en el medio ambiente: suelo, abonos, agua de riego, aire, al contacto con animales e insectos en el campo, superficies de equipos y utensilios que no han tenido un proceso de desinfección adecuado (Uyttendaele et al. 2014). Es un indicador de la calidad microbiológica de un alimento, así como una medición del nivel de higiene aplicado en el manejo tanto en procesamiento, almacenamiento y distribución de un alimento (Almualla et al. 2010, Oliveira et al. 2011, Maistro et al. 2012).

1.3.2 Coliformes totales

El término coliforme carece de valor taxonómico; de hecho, representa un grupo de especies de diversos géneros de la familia *Entero-bacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, y *Klebsiella* (Loncarevic et al. 2005). Son bacterias de forma bacilar, gram negativas, aerobias y anaerobias facultativas, móviles e inmóviles, no esporuladas que producen gas y ácido a partir de lactosa, cuando se incuban de 24 a 48 horas a 35°C (Jeantet et al. 2010). Suelen estar presentes en las heces de los humanos y animales de sangre caliente y aves. Algunos se encuentran en ambiente y contaminan los alimentos. Las especies de *Klebsiella* y *Enterobacter* están en el suelo donde se multiplican y alcanzan altos niveles de población (Ray y Bhunia 2010). La determinación de CT no tiene necesariamente relación con una contaminación de origen fecal y consiguientemente, con la posible presencia en los alimentos de microorganismos patógenos de procedencia entérica, sino que es sólo una indicación de deficiencias o fallos en el tratamiento industrial de los alimentos (Seo et al. 2010, Oliveira et al. 2011).

1.3.3 *Escherichia coli*.

Las cepas de *E. coli* se ajustan a las características generales descritas para los grupos de coliformes (Jeddi et al. 2014). Desde el punto de vista bioquímico, se diferencian de otras coliformes por la producción de índol a partir de triptona, reducción de rojo de metilo debido a la producción de ácido, reacción de Voges-Proskauer, y la utilización de citrato como patrón de reacción de fuente de carbono (Jeantet et al. 2010). La temperatura mínima para su crecimiento es de 2.5 °C y la máxima de 45 °C. Este microorganismo está ampliamente distribuido en la naturaleza y es considerado como un indicador de contaminación fecal por estar presente en las heces de los humanos y animales de sangre caliente y aves (Seo et al. 2010, Maffei et al. 2013), causando diarrea, retortijones, náuseas, cefaleas u otros síntomas (Seow et al. 2012). Estos patógenos podrían representar un riesgo de salud muy importante para bebés, niños pequeños y personas con sistemas inmunológicos gravemente comprometidos (Cabello 2007).

1.4 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)

Estos trastornos físicos son el resultado del consumo de alimentos y de agua contaminados con células de bacterias patógenas viables o de alimentos que contienen toxinas producidas por bacterias y mohos tóxicos (Ragaert et al. 2007, Habibi Najafi y Bahreini 2012). Con base en las características de la enfermedad pueden presentarse de 3 formas:

1.4.1 Intoxicación

Ocurren cuando las toxinas o venenos de bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido. Algunas toxinas pueden estar presentes de manera natural en el alimento, como en el caso de ciertos hongos y animales (Forsythe et al. 2003). Es el caso de la denominada *E. coli* *Enterohemorrágica* productora de toxina shiga (shigatoxigénica o STEC), un microorganismo capaz de infectar el intestino y de provocar en él hemorragias, de ahí su nombre, y otras graves alteraciones como el Síndrome Hemolítico Urémico, que afecta a los glóbulos rojos y a los riñones, sobre todo, en los grupos más vulnerables, como son los niños pequeños (Ray y Bhunia 2010).

1.4.2 Infección

Son enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos contaminados con bacterias o virus enteropatógenos vivos, los alimentos relacionados con esta infección viral son alimentos frescos en general, moluscos crudos y alimentos listos para el consumo no sometidos a tratamientos que eliminan los virus antes de su consumo (Forsythe et al. 2003). Las células viables, aun cuando se hallen presentes en números reducidos, tienen la capacidad de establecerse y multiplicarse en el tracto digestivo de la persona y causar enfermedades como salmonelosis y hepatitis A (Abadias et al. 2008).

1.4.3 Toxi-infección

Es una enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos con cierta cantidad de microorganismos causantes de enfermedades, los cuales son capaces de producir o liberar toxinas una vez que son ingeridos (Ray y Bhunia 2010). Por lo regular, las células bacterianas esporulan, colonizan o mueren y liberan toxinas que producen los síntomas por ejemplo la gastroenteritis causada por *Clostridium Perfringens* (Seow et al. 2012).

Los síntomas de estas enfermedades varían de acuerdo al tipo de contaminación, y también por la cantidad del alimento contaminado consumido (Silva et al. 2007) siendo los más comunes vómitos y diarreas; también pueden presentarse dolores abdominales, dolor de cabeza, calambres, fiebre, síntomas neurológicos, visión doble, ojos hinchados y dificultades renales (Ray y Bhunia 2010, Oliveira et al. 2011).

II. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir a disminuir el riesgo de incidencia de las enfermedades de origen alimentario “ETAs” por vegetales listos para el consumo.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Conocer la prevalencia y los niveles de contaminación causada por microorganismos patógenos en lechuga lista para el consumo que se expende en la ciudad de Loja.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materia prima.

Para este estudio se trabajó con 5 clases de lechuga empacadas en bolsas de polipropileno lista para el consumo (lechuga criolla, lechuga romana, ensalada mexicana, mix de lechuga verde y cresa roja y lechuga criolla más zanahoria).

Las muestras fueron recolectadas de los supermercados de la localidad y corresponden a distintos lotes de producción, posterior a ello se trasladaron asépticamente al laboratorio de Microbiología de alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja, de tal forma que no se altere la microflora y las características de la muestra.

3.2 Muestreo y preparación de la muestra.

La obtención de las muestra se realizó en función de la cantidad de productos disponibles en el sitio de expendio basándose en la norma (INEN 1750), se seleccionó 3 unidades al azar de cada tipo de lechuga, de un lote no mayor a 50 unidades. Para la preparación de la sub-muestra de 50 g, se aplicó las recomendaciones establecidas por la norma (INEN 1529-2:2013), que indica que si el alimento está formado por capas o extractos y evitando contaminar las partes tomar muestras de cada una en la misma proporción en que se encuentran en el producto original.

3.3 Recuento de aerobios mesófilos.

El recuento se realizó mediante la técnica de vertido en placa con agar plate count según el método U.S FDA Bacteriological Analytical Manual (Maturin y Peeler 2001) .El fundamento se basa en colocar la muestra en un medio de cultivo, incubar en condiciones adecuadas de tiempo y temperatura, y contar la cantidad de bacterias por gramo de muestra, de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Se pesó asépticamente 50 g de muestra en un frasco de dilución con 450 mL de agua buferada estéril (Ver anexo A) para obtener la primera dilución 10^{-1} . A partir de la primera dilución se realizaron diluciones hasta 10^{-6} .
2. Se inoculó 1 mL de las diluciones por duplicado en cada placa. Para cada depósito se usará una pipeta distinta y esterilizada.
3. Inmediatamente, verter en cada una de las placas inoculadas aproximadamente 20 mL de agar plate count, fundido y templado a $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Ver anexo A).
4. Cuidadosamente, mezclar el inóculo de siembra con el medio de cultivo imprimiendo a la placa movimientos de vaivén: 5 veces en el sentido de las agujas del reloj y 5 veces en el contrario.
5. Como prueba de esterilidad verter agar en una placa que contenga el diluyente sin inocular. No debe haber desarrollo de colonias.
6. Dejar reposar las placas para que se solidifique el agar.
7. Invertir las placas e incubarlas a 35°C por 48 ± 2 horas.
8. Pasado el tiempo de incubación seleccionar las placas que presenten entre 25 y 250 colonias y utilizando un contador de colonias (Ver figura 1).
9. Anotar el número de colonias y la respectiva dilución.
10. Calcular el número de UFC, multiplicando las colonias obtenidas en cada placa por su respectivo factor de dilución.
11. Los resultados se expresarán en UFC/g.

En la Figura 1 se aprecia las colonias en agar plate count y en la Figura 2 se puede observar el procedimiento para la determinación de aerobios mesófilos.



Figura 1. Recuento de aerobios mesófilos (agar plate count).

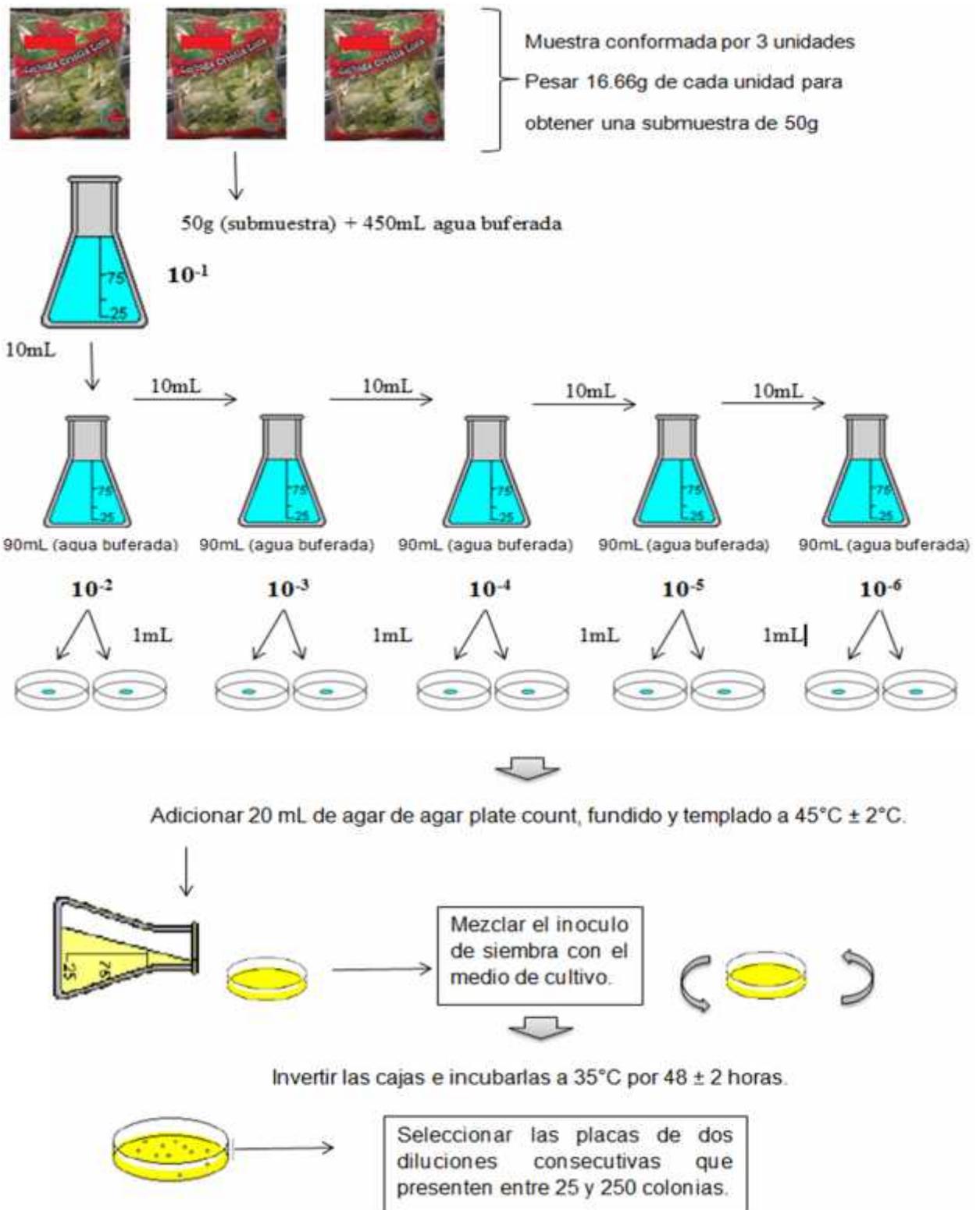


Figura 2. Determinación de aerobios mesófilos.

Fuente: FDA Bacteriological Analytical Manual (Maturin y Peeler 2001).

3.4 Recuento de coliformes totales y *E. coli*.

Se realizó mediante la técnica de tubos múltiples NMP (número más probable de bacterias) según U.S FDA Bacteriological Analytical Manual (Feng et al. 2002). El fundamento se basa en inocular la muestra en caldos selectivos (caldo lauryl sulfato y discos Colicomplete), e incubar en condiciones adecuadas de tiempo / temperatura, y enumerar la cantidad de bacterias coliformes por número más probable por gramo de muestra y la presencia / ausencia *E. coli*, de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Se pesó asépticamente 50 g de muestra en un frasco de dilución con 450 mL de agua buferada estéril para obtener la primera dilución 10^{-1} . A partir de la primera dilución se realizaron diluciones hasta 10^{-6} .
2. Inocular 1 ml de cada dilución a tres tubos conteniendo 10 mL de caldo lauryl sulfato triptosa. Proceder de igual manera con las demás diluciones.
3. Posteriormente en los tubos de cada una de las diluciones añadir asépticamente un disco Colicomplete.
4. Incubar los tubos de 35 a 37°C.
5. Lectura de tubos de cada dilución:
 - a) Coliformes totales:
 - Transcurridas 48 ± 2 horas de incubación, se procedió a examinar visualmente los tubos, la presencia de color azul en el disco o en los alrededores del medio confirman la presencia de coliformes totales (Ver figura 3).
 - De cada dilución anotar el número de tubos confirmados como positivos.
 - Elegir la dilución más alta en la que la presencia de coliformes es confirmada en tres tubos y las dos diluciones superiores más próximas.
 - Si ninguna de las diluciones presenta tres tubos positivos confirmados seleccionar las tres diluciones más altas con algún tubo positivo.
 - Anotar la relación de tubos positivos confirmados y ver en la tabla de referencia el respectivo NMP/g.
 - Para calcular el NMP/g cuando se inocula tres alícuotas de 1mL de más de tres diluciones decimales sucesivas, multiplicar el NMP por el factor adecuado: 10, 100, 1 000, etc. Es decir si los tubos seleccionados corresponden a las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , multiplicar por 10, multiplicar por 100 si las diluciones

seleccionadas son 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , multiplicar por 1000 si las diluciones seleccionadas son 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} y así sucesivamente.

- Reportar los resultados como NMP/g de muestra.



Figura 3. Presencia de coliformes totales (Disco Colicomplete en caldo LST)

- b) Para determinar la presencia de *E. coli*, después de 30 ± 2 horas desde el inicio de la incubación, se procedió a examinar los tubos bajo luz ultravioleta de onda larga (366 nm). Los tubos fluorescente indican resultado positivo para *E. coli*. Registrar la presencia/ausencia de *E. Coli* en la muestra (Ver figura 4).



Figura 4. Resultado positivo para *E. coli*

En la figura 5 se puede apreciar la metodología para el recuento de coliformes totales.

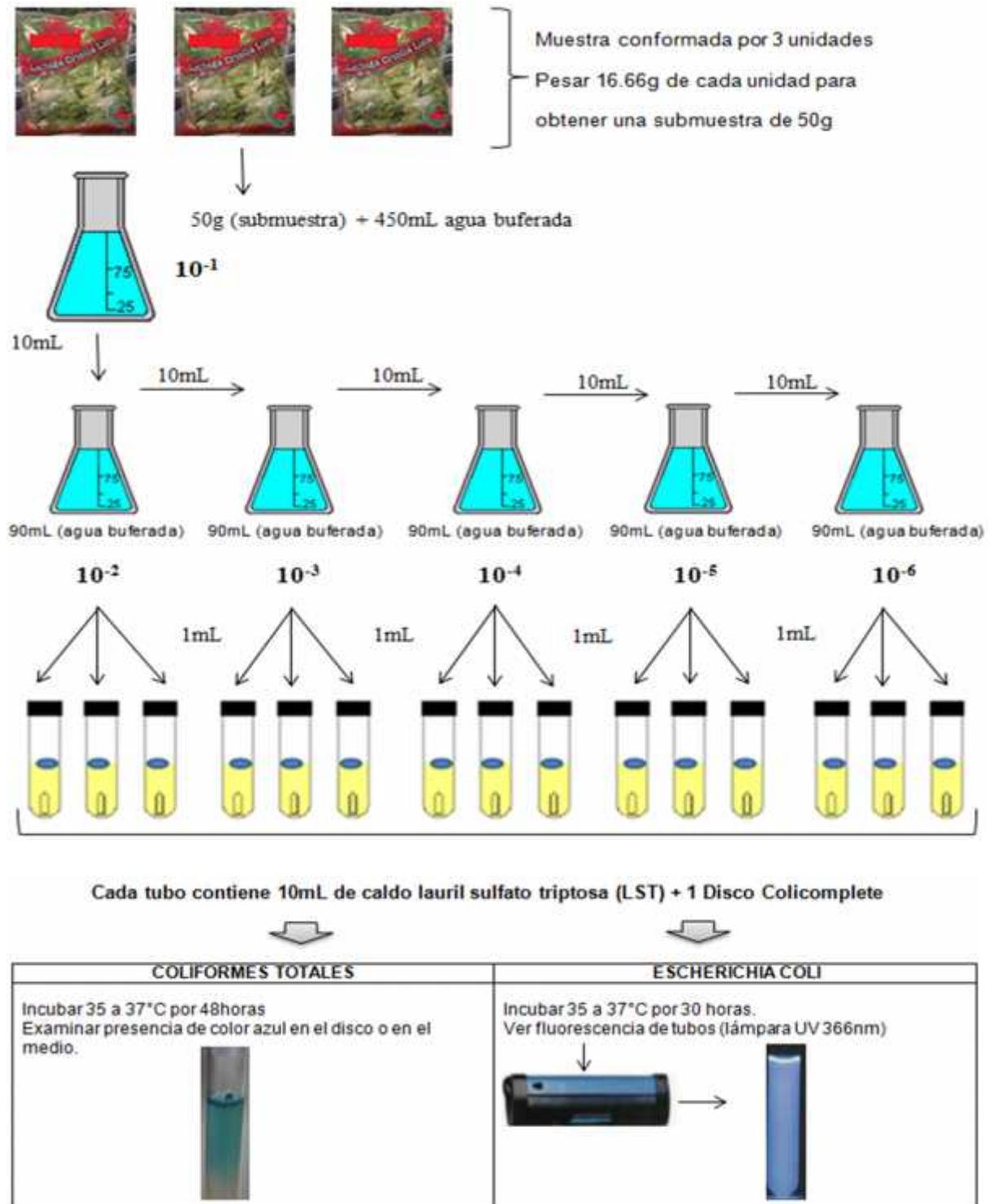


Figura 5. Determinación de coliformes totales y *E. coli*

Fuente: FDA Bacteriological Analytical Manual (Feng et al. 2002).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para evaluar la calidad microbiológica de lechuga empacada lista para el consumo se analizaron un total de 25 muestras, mediante la determinación de aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli*.

4.1 Aerobios mesófilos

El recuento de aerobios mesófilos en lechuga empacada lista para el consumo estuvo en un rango entre 5,14 a 5,98 log UFC/g (Ver tabla 1). Los resultados encontrados contrastan con los reportados por otros investigadores como Althaus et al. (2012), Maistro et al. (2012), Abadias et al. (2008) con recuentos que van desde 5,8; 5,9; 6 log UFC/g respectivamente en lechuga lista para el consumo. Otros autores como Valentin-Bon et al. (2008), Abdullahi y Abdulkareem (2010), Seo et al. (2010), Kase et al. (2012), Maffei et al. (2013), reportaron recuentos superiores a los presentados en este estudio (7,3; 7,14; 8,0; 8,2; 8,75 log UFC/g respectivamente).

Los altos recuentos de aerobios mesófilos implican una mala calidad de higiene (Oliveira et al. 2011, De Quadros Rodrigues et al. 2014), inmediata alteración y por ende una vida útil corta para el producto (Habibi Najafi y Bahreini 2012), además de la posibilidad de que existan patógenos pues estos son mesófilos (Abdullahi y Abdulkareem 2010, De Giusti et al. 2010, Seo et al. 2010, Seow et al. 2012, Maffei et al. 2013) .

Tabla 1. Recuento de aerobios mesófilos en lechuga lista para el consumo.(Ver anexo B)

Muestra	Reporte (log UFC/g)
A	5,33±0,67
B	5,49±0,52
C	5,63±0,44
D	5,98±0,89
E	5,14±0,07

n=5

En general se encontró que éstos microorganismos en la mayoría de las muestras fueron elevados, y al ser éstos indicadores de higiene sugiere que se debe revisar las etapas de procesamiento de estos productos, el agua utilizada, la desinfección de equipos, materiales e instalaciones, ya que estos factores pueden ser consideradas como fuentes potenciales de contaminación y aumentar la carga microbiana, además se puede evidenciar que éstos productos son difíciles de aplicar adecuadamente los procesos de desinfección.

4.2 Coliformes totales

El 100% de las muestras de lechuga analizadas presentaron recuentos de coliformes totales entre 2,82 a 4,82 log NMP /g (Ver tabla 2), una elevada carga microbiana de CT en productos listos para el consumo implica que estos alimentos pueden representar una fuente potencial de contaminación fecal y la presencia de microorganismos patógenos entéricos, entre ellos la *Escherichia coli* patógena (Abadias et al. 2008). Autores como (Jeddi et al. 2014 y Oliveira et al. 2011) encontraron en muestras de lechuga lista para el consumo valores entre 2 y 3 log NMP/g respectivamente, los mismos que se encuentran entre los valores obtenidos en este estudio, estos autores afirman que altos niveles de coliformes totales presentes en las muestras analizadas son consecuencia de materia prima contaminada por abonos orgánicos como estiércol y agua de irrigación con heces de humanos o de animales, además de un deficiente proceso de desinfección en el procesamiento del producto y la omisión o desconocimiento de las condiciones sanitarias básicas de manipulación.

Tabla 2. Recuento de coliformes totales en lechuga lista para el consumo.(Ver anexo C)

Muestra	Promedio (log UFC/g)
A	3,71
B	2,82
C	4,82
D	4,35
E	3,27
n=5	

Valentin-Bon et al. (2008), obtuvo recuentos entre 4,5 a 8.0 log NMP/g, en lechuga mínimamente procesada estos valores son superiores a los encontrados en este estudio lo que indica que las muestras analizadas presentaron mejores condiciones higiénicas, además estos autores manifiestan que los elevados niveles de CT en este tipo de vegetal, se deben a las grandes áreas de superficie y pliegues que al estar en contacto con el suelo con fertilizantes no tratados, insectos, agua de riego contaminada atrapa la suciedad haciéndolos más susceptibles a contaminaciones bacterianas y adherencias, lo que hace un difícil tratamiento de desinfección.

4.3 E. coli

Se determinó la presencia de *Escherichia coli* en 5 muestras de un total de 25 (Ver Tabla 3), Valentin-Bon et al. (2008), encontró resultados similares a este estudio, reportó presencia de *E. coli* en 5 muestras de un total de 26, manifestando que las posibles causas de contaminación se deben a un tratamiento deficiente en el proceso de desinfección de la materia prima con residuos de materia fecal y/o contaminación posterior al tratamiento.

Tabla 3. Número de muestras con presencia de *E. coli* en lechuga lista para el consumo. (Ver anexo D)

Muestra	N° de muestras positivas
A	1
B	0
C	1
D	2
E	1

n=5

Otras investigaciones reportadas por (Oliveira et al. 2011, Habibi Najafi y Bahreini 2012), presentaron valores superiores a este estudio, reportaron presencia de *E. coli* en (10/55; 33/134 respectivamente), señalando que la presencia de esta bacteria se debe a equipos sucios, manejo inadecuado de plagas en las instalaciones, manipulación no higiénica por el personal, uso de agua contaminada en el proceso de lavado y desinfección. Al encontrar muestras positivas con *E. coli* en productos listos para el consumo, implica un riesgo de que un microorganismo patógeno pueda estar presente en el alimento como es la *E. coli* 0157:H7 que

producen las toxinas Shiga que causan síntomas de diarrea con o sin sangrado, dolores abdominales, vómito y severos daños a los riñones (Althaus et al. 20012, Ray y Bhunia 2010, Loncarevic et al. 2005).

Los resultados en la Figura 6 indican el porcentaje del cumplimiento e incumplimiento de la calidad microbiológica de lechuga lista para el consumo, se ha tomado como referencia normas de otros países debido a que la legislación Ecuatoriana no cuenta con una norma para este tipo de productos (Ver Anexo E).

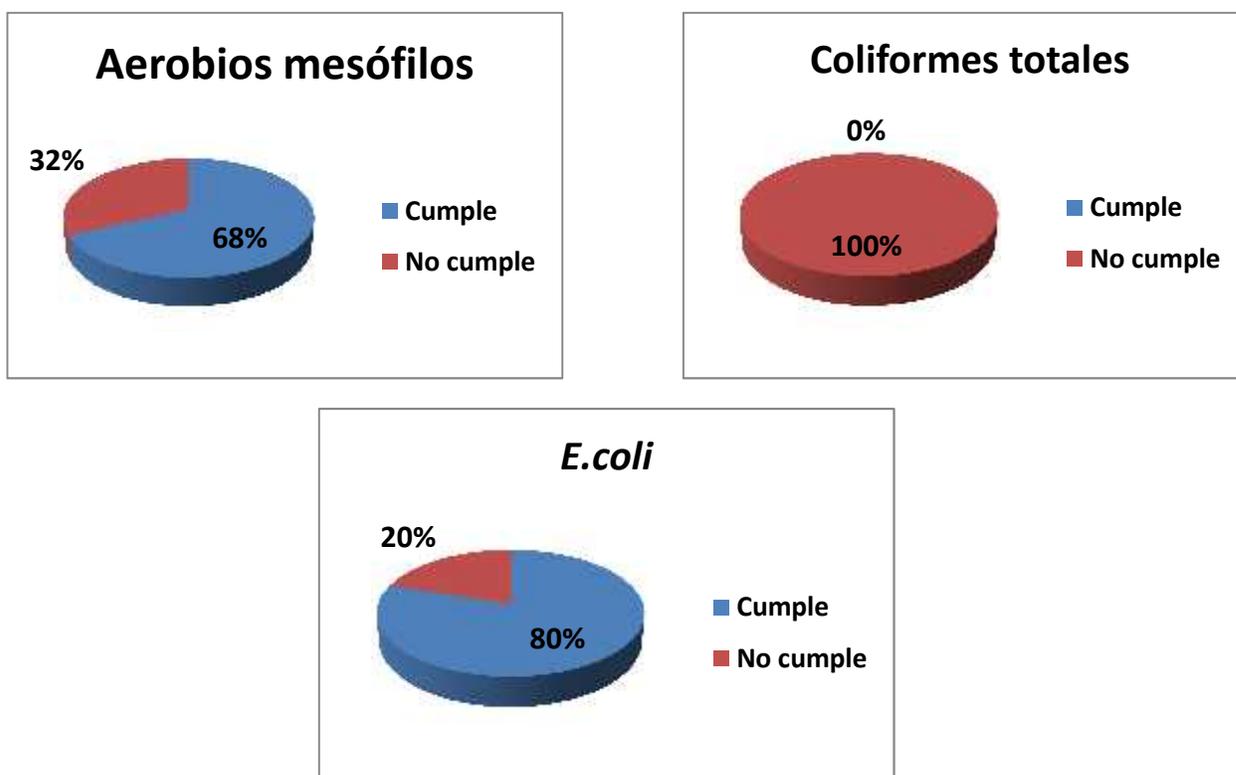


Figura 6. Resultados del cumplimiento e incumplimiento microbiológico de muestras de lechuga lista para el consumo.

De las 25 muestras de lechuga lista para el consumo 8 (32%) del total de muestras analizadas tuvieron valores superiores a 5.70 log UFC/g que es el límite máximo establecido por la Norma para recuento de aerobios mesófilos en vegetales listos para el consumo. Seo et al. (2010) reportó en lechuga empacada lista para el consumo que el 60% de muestras superan este límite, estos resultados son superiores a los encontrados en este estudio.

En cuanto al recuento de coliformes totales el 100% de las muestras presentaron recuentos superiores a 2 UFC/g, límite máximo establecido por la norma, resultados similares fueron reportados por (Jeddi et al. 2014, Uyttendaele et al. 2014), con valores en el total de las muestras $> 2.5 \log$ MNP/g. Aunque muchas normas internacionales no consideran a los coliformes totales dentro de grupos microbianos utilizados como criterios para evaluar la calidad microbiológica de vegetales frescos, algunos autores manifiestan que contajes elevados de estos microorganismos, como los encontrados en los vegetales analizados se relacionan con falta de higiene en los alimentos (Seo et al. 2010).

En esta investigación, 20% (5/25) de las muestras analizadas fueron positivas para *E.coli*, resultados similares fueron reportados por (Valentin-Bon et al. 2008, Oliveira et al. 2011, Habibi Najafi y Bahreini 2012), que obtuvieron valores de (18, 19.1, 19.2 % respectivamente) en productos vegetales, como lechuga lista para el consumo.

Los resultados de esta investigación reflejan que en este tipo de vegetales existe una elevada contaminación en aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli*, de allí que se debe considerar a estos alimentos como factor de riesgo de posibles enfermedades de transmisión alimentaria (ETAS).

CONCLUSIONES

- El recuento de aerobios mesófilos estuvo en un rango entre 5.14 a 5.98 log UFC/g, el contaje de bacterias coliformes totales estuvo en un rango de 2.82 a 4.82 log NMP/g
- Se determinó presencia de *E.coli* en 5 muestras de un total de 25.
- La calidad microbiológica de lechuga lista para el consumo se evaluó utilizando normas de referencia debido a que en la legislación ecuatoriana no cuenta con las mismas para este tipo de productos, se determinó que el 32% de las muestras analizadas no cumplen con la norma en lo que respecta al recuento de aerobios mesófilos, el 100% de las muestras no cumplen con el límite permisible para bacterias coliformes totales, y se determinó la presencia de *E. coli* en el 20% de las muestras analizadas.

RECOMENDACIONES

- En lo que respecta al medio de cultivo agar plate count, al momento de realizar el ensayo se debe controlar que la temperatura del baño maría se encuentre de 50 a 60°C, para evitar que se solidifique.
- Es importante el seguimiento del estudio microbiológico, para poder detectar posibles serotipos de *E. coli* O157:H7 productoras de toxina Shiga.

BIBLIOGRAFÍA

- Abadias, M; Usall, J; Anguera, M; Solsona, C; Viñas, I. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology* 123(1): 121-129.
- Abdullahi, I; Abdulkareem, S. 2010. Bacteriological quality of some ready to eat vegetables as retailed and consumed in Sabon-Gari, Zaria, Nigeria. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences* 3(1): 173-175.
- Almualla, NA; Laleye, LC; Abushelaibi, AA; Al-Qassemi, RA; Wasesa, AA; Baboucarr, J. 2010. Aspects of the microbiological quality and safety of ready-to-eat foods in Sharjah supermarkets in the United Arab Emirates. *Journal of Food Protection®* 73(7): 1328-1331.
- Althaus, D; Hofer, E; Corti, S; Julmi, A; Stephan, R. 2012. Bacteriological survey of ready-to-eat lettuce, fresh-cut fruit, and sprouts collected from the Swiss market. *Journal of Food Protection®* 75(7): 1338-1341.
- Aycicek, H; Oguz, U; Karci, K. 2006. Determination of total aerobic and indicator bacteria on some raw eaten vegetables from wholesalers in Ankara, Turkey. *International journal of hygiene and environmental health* 209(2): 197-201.
- Barker-Reid, F; Harapas, D; Engleitner, S; Kreidl, S; Holmes, R; Faggian, R. 2009. Persistence of *Escherichia coli* on injured iceberg lettuce in the field, overhead irrigated with contaminated water. *Journal of Food Protection®* 72(3): 458-464.
- Cabello, RR. 2007. *Microbiología y parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Tercera edición. Mexico Ed. Médica Panamericana. 751.
- Chile. 1997. *Reglamento sanitario de los alimentos*. Minsal DTO. N° 977. 173p.
- Da Cruz, AG; Cenci, SA; Maia, MC. 2006. Quality assurance requirements in produce processing. *Trends in Food Science & Technology* 17(8): 406-411.
- De Giusti, M; Aurigemma, C; Marinelli, L; Tufi, D; De Medici, D; Di Pasquale, S; De Vito, C; Boccia, A. 2010. The evaluation of the microbial safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy. *Journal of applied microbiology* 109(3): 996-1006.

- De Quadros Rodrigues, R; Loiko, MR; Minéia Daniel de Paula, C; Hessel, CT; Jacxsens, L; Uyttendaele, M; Bender, RJ; Tondo, EC. 2014. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. *Food Control* 42(3): 152-164.
- Feng, P; Weagant, S; Grant, M; Burkhardt, W. 2002. Bacteriological Analytical Manual: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria (en línea). Estados Unidos, FDA. Consultado 5 de may. 2014. Disponible en <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>
- Forsythe, S; López, E; Pérez, B. 2003. Alimentos seguros: Microbiología. Primera edición. Zaragoza, Acribia, S.A. 140.
- Gomiero, T; Pimentel, D; Paoletti, MG. 2011. Environmental impact of different agricultural management practices: conventional vs. organic agriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences* 30(1-2): 95-124.
- Habibi Najafi, MB; Bahreini, M. 2012. Microbiological Quality of Mixed Fresh-Cut Vegetable Salads and Mixed Ready-to-Eat Fresh Herbs in Mashhad, Iran. *International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental Engineering* 39(5): 62-66.
- Heaton, J; Jones, K. 2008. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of applied microbiology* 104(3): 613-626.
- Ignarro, LJ; Balestrieri, ML; Napoli, C. 2007. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update. *Cardiovascular research* 73(2): 326-340.
- INEN. 1994. Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria: Hortalizas Frutas Frescas y Muestreo. INEN 1750. 17p.
- INEN. 2013. Norma Técnica Ecuatoriana: Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico. NTE INEN 1529-2. 19p.
- Jacxsens, L; Luning, P; Van der Vorst, J; Devlieghere, F; Leemans, R; Uyttendaele, M. 2010. Simulation modelling and risk assessment as tools to identify the impact of climate change on microbiological food safety—The case study of fresh produce supply chain. *Food Research International* 43(7): 1925-1935.
- Jeanet, R; Croguennec, T; Schuck, P; Brulé, G. 2010. Ciencia de los alimentos: Bioquímica-Microbiología-Procesos-Productos. Primera edición. . Zaragoza., Acribia, S.A. 349-351.
- Jeddi, MZ; Yunesian, M; Gorji, MEh; Noori, N; Pourmand, MR; Khaniki, GRJ. 2014. Microbial Evaluation of Fresh, Minimally-processed Vegetables and Bagged Sprouts from Chain Supermarkets. *Journal of health, population, and nutrition* 32(3): 391.

- Kase, JA; Borenstein, S; Blodgett, RJ; Feng, PC. 2012. Microbial quality of bagged baby spinach and romaine lettuce: effects of top versus bottom sampling. *Journal of Food Protection*® 75(1): 132-136.
- Loncarevic, S; Johannessen, G; Rørvik, L. 2005. Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. *Letters in applied microbiology* 41(2): 186-189.
- Maffei, D; Silveira, N; Da Penha Longo Mortatti, M. 2013. Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil. *Food Control* 29(1): 226-230.
- Maistro, LC; Miya, NTN; Sant'Ana, AS; Pereira, JL. 2012. Microbiological quality and safety of minimally processed vegetables marketed in Campinas, SP–Brazil, as assessed by traditional and alternative methods. *Food Control* 28(2): 258-264.
- Maturin, L; Peeler, J. 2001. *Bacteriological Analytical Manual: Aerobic Plate Count* (en línea). Estados Unidos, FDA. Consultado 5 de may. 2014. Disponible en <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>
- Mukherjee, A; Speh, D; Jones, AT; Buesing, KM; Diez-Gonzalez, F. 2006. Longitudinal microbiological survey of fresh produce grown by farmers in the upper Midwest. *Journal of Food Protection*® 69(8): 1928-1936.
- Oliveira, M; Viñas, I; Usall, J; Anguera, M; Abadias, M. 2012. Presence and survival of *Escherichia coli* O157: H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *International journal of food microbiology* 156(2): 133-140.
- Oliveira, M; Maciel de Souza, V; Morato Bergamini, AM; De Martinis, ECP. 2011. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control* 22(8): 1400-1403.
- Ragaert, P; Devlieghere, F; Debevere, J. 2007. Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest biology and technology* 44(3): 185-194.
- Ray, B; Bhunia, AK. 2010. *Fundamentos de Microbiología de los Alimentos*. Cuarta edición. Mexico, McGraw-Hill Interamericana. 181.
- Ritter, AC; Tondo, EC; CardosoMaris, al. 2012. Comparison of Different Washing and Disinfection Protocols Used by Food Services in Southern Brazil for Lettuce (*Lactuca sativa*). *Food and Nutrition Sciences* 202(3): 28-33.
- RTCA. 2009. *Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos*. 67.04.50:08. 36p.
- Sánchez Pineda de las Infantas, MT. 2004. *Procesos de conservación poscosecha de productos vegetales*. Primera edición. Madrid, AMV Ediciones. 28.

- Sant'Ana, AS; Landgraf, M; Destro, MT; Franco, BD. 2011. Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in São Paulo, Brazil. *Food microbiology* 28(6): 1235-1237.
- Seo, Y-H; Jang, J-H; Moon, K-D. 2010. Microbial evaluation of minimally processed vegetables and sprouts produced in Seoul, Korea. *Food Science and Biotechnology* 19(5): 1283-1288.
- Seow, J; Ágoston, R; Phua, L; Yuk, H-G. 2012. Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. *Food Control* 25(1): 39-44.
- Silva, SR; Verdin, SEF; Pereira, DC; Schatkoski, AM; Rott, MB; Corção, G. 2007. Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 38(4): 594-598.
- Uyttendaele, M; Moneim, A; Ceuppens, S; El-Tahan, F. 2014. Microbiological safety of strawberries and lettuce for domestic consumption in Egypt. *Journal of Food Processing and Technology* 5(3): 67-74.
- Valentin-Bon, I; Jacobson, A; Monday, SR; Feng, PC. 2008. Microbiological quality of bagged cut spinach and lettuce mixes. *Applied and environmental microbiology* 74(4): 1240-1242.

ANEXOS

ANEXO A. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

A.1 Agua buferada

- Preparación de la solución stock: Disolver 34,0 g de KH_2PO_4 en 500 ml de agua destilada, se ajusta el PH a 7,2 con aproximadamente 1,75 ml de NaOH 1M y se afora a 1L. Mantener en refrigeración.
- Preparación de la solución para dilución: Con agua destilada diluir 1,25 ml de la solución stock en 1 L con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

A.2 Caldo Lauryl Sulfato Triptosa (LTS)

- Se pesó 35.6 g del caldo LTS y se diluyó en 1000 ml de agua destilada. Luego se colocó 10mL en tubos de ensayo y se autoclavó por 15 minutos a 121 °C.

A.3 Agar Plate Count (APC)

- Se pesó 23,5 g de APC y se diluyó en 1000 mL de agua destilada, se calentó hasta obtener una apariencia transparente y se autoclavó por 15 minutos a 121 °C.

ANEXO B. RESULTADOS DE AEROBIOS MESOFILOS

Tabla 4. Recuento de aerobios mesófilos.

Muestra A	Sub muestra A	DILUCIONES					UFC/g	Reporte (UFC/g)	Reporte (Log UFC)
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶			
Mix de lechuga verde y cresa roja	1	MNPC	49	0	0	0	49000	44000	4,64
		MNPC	39	1	0	0	39000		
	2	MNPC	39	3	0	0	39000	37500	4,57
		MNPC	36	0	0	0	36000		
	3	MNPC	MNPC	35	3	1	350000	415000	5,62
		MNPC	MNPC	48	5	1	480000		
	4	MNPC	MNPC	53	5	0	530000	675000	5,83
		MNPC	MNPC	82	5	0	820000		
	5	MNPC	MNPC	98	3	0	980000	975000	5,99
		MNPC	MNPC	97	2	0	970000		
Promedio								5,33±0,67	
Muestra B	Sub muestra B	DILUCIONES					UFC/g	Reporte (UFC/g)	Reporte (Log UFC)
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶			
Ensalada mexicana	1	MNPC	MNPC	210	26	0	2100000	2120000	6,33
		MNPC	MNPC	214	23	0	2140000		
	2	MNPC	160	12	0	0	160000	157000	5,20
		MNPC	154	15	0	0	154000		
	3	MNPC	150	16	0	0	150000	148000	5,17
		MNPC	146	13	0	0	146000		
	4	MNPC	122	10	0	0	122000	126000	5,10
		MNPC	130	12	0	0	130000		
	5	MNPC	MNPC	47	1	0	470000	465000	5,67
		MNPC	MNPC	46	0	0	460000		
Promedio								5,49±0,52	
Muestra C	Sub muestra C	DILUCIONES					UFC/g	Reporte (UFC/g)	Reporte (Log UFC)
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶			
Lechuga criolla más zanahoria	1	MNPC	95	4	0	0	95000	97500	4,99
		MNPC	100	5	0	0	100000		
	2	MNPC	MNPC	61	3	0	610000	595000	5,77
		MNPC	MNPC	58	2	0	580000		
	3	MNPC	MNPC	38	0	0	380000	370000	5,57
		MNPC	MNPC	36	0	0	360000		
	4	MNPC	MNPC	44	5	0	440000	415000	5,62
		MNPC	MNPC	39	2	0	390000		
	5	MNPC	MNPC	156	18	0	1560000	1585000	6,20
		MNPC	MNPC	161	21	0	1610000		
Promedio								5,63±0,44	

Tabla 4. (Continuación)

Muestra D	Sub muestra D	DILUCIONES					UFC/g	Reporte (UFC/g)	Reporte (Log UFC)
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶			
Lechuga criolla	1	MNPC	MNPC	MNPC	53	3	5300000	5750000	6,76
		MNPC	MNPC	MNPC	62	1	6200000		
	2	MNPC	MNPC	MNPC	43	0	4300000	4500000	6,65
		MNPC	MNPC	MNPC	47	0	4700000		
	3	MNPC	MNPC	MNPC	23	0	2340000	2375000	6,38
		MNPC	MNPC	MNPC	25	0	2410000		
	4	MNPC	53	4	0	0	53000	54500	4,74
		MNPC	56	3	0	0	56000		
5	MNPC	225	8	0	0	225000	226500	5,36	
	MNPC	228	11	0	0	228000			
Promedio								5,98±0,89	
Muestra E	Sub muestra E	DILUCIONES					UFC/g	Reporte (UFC/g)	Reporte (Log UFC)
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶			
Lechuga romana	1	MNPC	156	5	0	0	156000	153000	5,18
		MNPC	150	6	0	0	150000		
	2	MNPC	169	1	0	0	169000	164500	5,22
		MNPC	160	1	0	0	160000		
	3	MNPC	108	9	0	0	108000	109500	5,04
		MNPC	111	7	0	0	111000		
	4	MNPC	141	6	0	0	141000	145500	5,16
		MNPC	150	5	0	0	150000		
5	MNPC	127	10	0	0	127000	129500	5,11	
	MNPC	132	11	0	0	132000			
Promedio								5,14±0,07	

CÁLCULO DE AEROBIOS MESÓFILOS

Ejemplo en la muestra A (Sub-muestra A1)

➤ **Datos:**

Son escogidos de las placas con recuentos que están en un rango de 25-250 colonias.

R1= Recuento de la primer placa

R2= Recuento de la segunda placa (duplicado)

FD= Factor de dilución de las placas seleccionadas

Z = Total de unidades formadoras de colonia / g

➤ **Cálculos:**

$$\begin{aligned} \mathbf{R1 * FD} &= 49 * (10^{-3}) \\ &= 49 * 1000 \\ &= 49000 \text{ UFC/g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \mathbf{R2 * FD} &= 39 * (10^{-3}) \\ &= 39 * 1000 \\ &= 39000 \text{ UFC/g} \end{aligned}$$

$$Z = \frac{R1 * FD + (R2 * FD)}{2}$$

$$Z = \frac{49000 + 39000}{2}$$

$$Z = 44000 \text{ UFC/g}$$

$$\text{Log } 44000 \text{ UFC/g}$$

$$4,64 \text{ Log UFC/g}$$

ANEXO C. RESULTADOS DE COLIFORMES TOTALES

Tabla 5. Recuento de coliformes totales

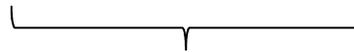
Muestra	Sub Muestra	Diluciones					NMP/g	Log NMP/g
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶		
A Mix de lechuga verde y crespas roja	1	3	1	0	0	0	430	2,63
	2	2	1	0	0	0	150	2,18
	3	3	3	0	0	0	2400	3,38
	4	3	3	3	3	0	240000	5,38
	5	3	3	3	2	0	93000	4,97
Promedio								3,71
B Ensalada mexicana	1	3	0	0	0	0	230	2,36
	2	3	1	0	0	0	430	2,63
	3	3	2	0	0	0	930	2,97
	4	3	2	0	0	0	930	2,97
	5	3	2	0	1	0	1400	3,15
Promedio								2,82
C Lechuga criolla más zanahoria	1	3	3	3	2	0	93000	4,97
	2	3	3	3	0	0	24000	4,38
	3	3	3	3	0	0	24000	4,38
	4	3	3	3	2	0	93000	4,97
	5	3	3	3	3	0	240000	5,38
Promedio								4,82
D Lechuga criolla	1	3	3	3	3	0	240000	5,38
	2	3	3	3	3	1	460000	5,66
	3	3	3	3	3	0	240000	5,38
	4	3	0	0	0	0	230	2,36
	5	3	2	0	0	0	930	2,97
Promedio								4,35
E Lechuga romana	1	3	2	1	0	0	1500	3,18
	2	3	3	2	1	0	15000	4,18
	3	3	3	0	0	0	2400	3,38
	4	3	2	0	0	0	930	2,97
	5	3	1	0	0	0	430	2,63
Promedio								3,27

CALCULO DE COLIFORMES TOTALES

Ejemplo en la muestra A (Sub-muestra A1)

- Se registra el número de tubos positivos encontrados en cada dilución como se indica en el cuadro siguiente:

Sub Muestra	Diluciones				
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1	3	1	0	0	0



3 1 0

- Se busca en la tabla NMP/g en las columnas señaladas como 0.1, 0.01 y 0.001, la serie correspondiente a **3 1 0**, y en la columna del NMP/g se escoge el valor correspondiente a bacterias coliformes NMP/g, en el ejemplo es igual a **43** (Ver tabla 6).



- La lectura es directa si se trabaja con las tres diluciones indicadas en la tabla, en este caso la serie seleccionada corresponde a las diluciones 10^{-2} ; 10^{-3} y 10^{-4} , se debe multiplicar por el factor de dilución que es **10**.

$$43 * 10 = 430 \text{ NMP/g}$$

$$\text{Log } 430 \text{ NMP/g}$$

$$2.63 \text{ log NMP/g}$$

Tabla 6. Tabla del Número Más Probable (NMP) por ml/g de muestra.

Utilizando series de tres tubos inoculados con 0.1, 0.01, 0.001 ml respectivamente y límite de confianza del 95%.

Pos. Tubos			MPN/g	Conf. lim.		Pos. Tubos			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

ANEXO D. RESULTADOS DE ESCHERICHIA COLI

Tabla 7. Cuadro de Presencia / Ausencia de *E. coli*.

Sub muestra	Muestra				
	A (Mix de lechuga verde y cresa roja)	B Ensalada mexicana	C Lechuga criolla más zanahoria	D Lechuga criolla	E Lechuga romana
1	ausencia	Ausencia	ausencia	presencia	ausencia
2	presencia	Ausencia	presencia	presencia	ausencia
3	ausencia	Ausencia	ausencia	ausencia	ausencia
4	ausencia	Ausencia	ausencia	ausencia	presencia
5	ausencia	Ausencia	ausencia	ausencia	ausencia

ANEXO E. LIMITES PARA MICROORGANISMOS INDICADORES

Tabla 8. Microorganismos y límites establecidos por las normas tomadas como referencia.

Microorganismo	Límite máximo	Norma
Aerobios mesófilos	500000 UFC/g (5.7 log UFC/g)	(Chile) Reglamento sanitario de los alimentos. (D.T.O. N° 977)
Coliformes totales	100 UFC/g (2 log UFC/g)	(China) (Estándar nacional) (Jeddi et. al 2010)
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	(RTCA) Reglamento técnico Centroamericano. (RTCA 67.04.50:08)