



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA**  
TITULACIÓN DE INGENIERO EN ALIMENTOS

**Calidad microbiológica de perejil empacado**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

**AUTOR:** Romero Celi, Betsy Yomaira

**DIRECTOR:** Hualpa Salinas, Diana Inés, Mg. Sc

LOJA – ECUADOR

2015

## **APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN**

Mg. Sc.

Diana Inés Hualpa Salinas.

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

### **De mi consideración:**

El presente trabajo de fin de titulación: “Control microbiológico de perejil empacado” realizado por Romero Celi Betsy Yomaira ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la aprobación del mismo.

Loja, 26 de enero del 2015.

f) Hualpa Salinas, Diana Inés, Mg. Sc

C.I: 1102806062

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Betsy Yomaira Romero Celi declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: Control microbiológico de perejil listo 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).....

**Autora:** Romero Celi Betsy Yomaira

**C.I:** 1104413305

## **DEDICATORIA**

A mis padres por ser mi pilar fundamental, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por su motivación constante, la cual me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada por su amor incondicional.

A mi esposo Edgar por estar a mi lado en todo momento, por creer en mi capacidad, y que a pesar de que hemos pasado por momentos difíciles siempre ha estado brindándome su comprensión, cariño y amor.

A mí querido hijo Eduardito, por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más y así brindarle un futuro mejor.

A mis hermanos Yandry y Liliana por brindarme todo su apoyo, y por ser para mí un ejemplo de lucha y superación.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por haberme guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y sobre todo por bendecirme para tener la dicha de alcanzar este sueño tan anhelado.

A mis padres por los buenos valores que me han inculcado, por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación, y sobre todo por ser un buen ejemplo a seguir.

A la Mg. Diana Inés Hualpa Salinas, directora del presente trabajo, por brindarme todo su apoyo, su tiempo y su confianza para que este trabajo sea culminado de la mejor manera.

A todos los docentes que durante el transcurso de mi vida universitaria compartieron sus conocimientos hacia mi persona.

A todos mis demás familiares, que de una u otra manera me han apoyado a lo largo de mi carrera universitaria.

## TABLA 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
TABLA DE CONTENIDOS.....	vi
GLOSARIO.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
<b>I. REVISIÓN LITERARIA</b> .....	4
1.1 Perejil ( <i>Petroselinum Sativum</i> ).....	5
1.2 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) .....	5
1.3 Microorganismos indicadores de la calidad sanitaria del alimento.....	6
1.3.1 Aerobios Mesófilos .....	6
1.3.2 Coliformes totales.....	6
1.3.3 Coliformes fecales.....	7
1.3.4 <i>Escherichia coli</i> .....	7
1.3.4.1 Enfermedades transmitidas por <i>Escherichia coli</i> .....	8
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	9
2.2 Objetivo General .....	10
2.3 Objetivo específico.....	10
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	11
3.1 Materia prima .....	12
3.2 Preparación de la muestra .....	12
3.3 Recuento de aerobios mesófilos. ....	12
3.4 Cuantificación de coliformes totales y <i>E. coli</i> .....	13
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	17
4.1 Aerobios Mesófilos .....	18
4.2 Coliformes Totales .....	18
4.3 <i>E. Coli</i> .....	19
<b>CONCLUSIONES</b> .....	21
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	23

<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	24
<b>ANEXOS</b> .....	28

## INDICE DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1</b> Presencia de aerobios mesófilos en perejil empacado .....	13
<b>Figura 2</b> Presencia de coliformes totales en perejil empacado.....	14
<b>Figura 3</b> Presencia de <i>E. coli</i> en perejil empacado.....	14
<b>Figura 4</b> Recuento de aerobios mesófilos.....	15
<b>Figura 5</b> Recuento de coliformes totales y <i>E. coli</i> .....	16
<b>Figura 6</b> Cumplimiento e incumplimiento microbiológico para las muestras de perejil.....	20

## INDICE DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1</b> Recuento microbiológico de aerobios mesófilos.....	18
<b>Tabla 2</b> Recuento microbiológico de coliformes totales.....	19
<b>Tabla 3</b> Número de muestras positivas para <i>E. coli</i> .....	19
<b>Tabla 4</b> Recuento microbiológico total para las 13 muestras de perejil de la marca A.....	28
<b>Tabla 5</b> Recuento microbiológico total para las 13 muestras de perejil de la marca B.....	29
<b>Tabla 6</b> Recuento de coliformes totales en muestras de perejil liso.....	31
<b>Tabla 7</b> Recuento de coliformes totales en muestras de perejil crespo.....	32
<b>Tabla 8</b> Presencia/ Ausencia de <i>E. coli</i> en las 13 muestras de perejil de la marca A.....	34
<b>Tabla 9</b> Presencia/ Ausencia de <i>E. coli</i> en las 13 muestras de perejil de la marca B.....	34
<b>Tabla 10</b> Límites establecidos para aerobios mesófilos, coliformes totales y <i>E. coli</i> .....	35

## INDICE DE ANEXOS

	pág.
<b>ANEXO A</b> Preparación de reactivos.....	27
<b>ANEXO B</b> Cuadro de resultados para aerobios mesófilos.....	28
<b>ANEXO C</b> Cálculo para determinar la cantidad de aerobios mesófilos.....	30
<b>ANEXO D</b> Cuadro de resultados para coliformes totales.....	31
<b>ANEXO E</b> Cálculo para determinar la cantidad de coliformes totales.....	33
<b>ANEXO F</b> Cuadro de resultados para <i>E. coli</i> .....	34
<b>ANEXO G</b> Requisitos microbiológicos para hortalizas frescas.....	35
<b>ANEXO H</b> Tabla del número más probable.....	36

## GLOSARIO

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

**NMP:** Número más probable

**ETAs:** Enfermedades transmitidas por alimentos

**mL:** Mililitro

**g:** Gramo

**L:** Litro

**LST:** Lauryl Sulfato Triptosa

**nm:** Nanómetro

**BPM:** Buenas Prácticas de Manufactura

**°C:** Grados Centígrados

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Dihidrógeno fosfato de potasio

**NaOH:** Hidróxido de sodio

## RESUMEN

El perejil es un vegetal utilizado como condimento en diversos productos alimenticios; debido a sus características físicas y de cultivo está expuesto a contaminación microbiana. El objetivo de esta investigación fue evaluar la calidad microbiológica de 26 muestras de perejil empacado de diferentes marcas que se expenden en la ciudad de Loja, mediante la determinación de microorganismos indicadores de higiene. La cuantificación de aerobios mesófilos se determinó mediante el método de recuento en placa y la determinación de coliformes totales y *E. coli* por la técnica del número más probable utilizando discos ColiComplete (Biocontrol, Bellevue, WA). El recuento de aerobios mesófilos estuvo entre 5,58 a 6,09 log UFC/g, y para coliformes totales de 3,29 a 3,82 log NMP/g. De acuerdo a la normativa utilizada como referencia el 46% de las muestras sobrepasó el límite permisible para aerobios mesófilos, y coliformes totales y el 20% de las muestras tuvieron presencia de *E. coli*. Los resultados obtenidos reflejan que existió contaminación en este tipo de vegetal, por este motivo se debe considerar a estos alimentos como posible factor de riesgo para la salud del consumidor.

**PALABRAS CLAVES:** perejil, aerobios mesófilos, coliformes totales, *E. coli*.

## ABSTRACT

Parsley is a plant vegetable mainly used as seasoning in several food products. Due to its physical and culture methods characteristics, it is exposed to microbial contamination. The aim of this research was to evaluate the microbiological quality of parsley packing different brands that are sold in supermarkets in the city of Loja, by determining hygiene indicator microorganisms. Quantification of aerobic mesophilic bacteria was determined by the pour-plate method and determination total coliforms and *E. coli* by Most Probable Number technique using Colicomplete discs (Biocontrol, Bellevue, WA). The mesophilic aerobic count was between 5.58 and 6.10 log CFU/g; and for total coliforms of 3.29 to 3.82 log MPN/g. According to the regulations used as a reference for 46% of the samples exceeded the permissible limit for mesophilic aerobic, and total coliforms; and 20% of the samples had the presence of *E. coli*. The results show that there was contamination in this type of vegetable, which is why you should consider these foods as a possible risk factor for consumer health.

**KEYWORDS:** Parsley, mesophilic aerobic, bacteria, total coliforms, *E. coli*.

## INTRODUCCIÓN

El consumo de vegetales en los últimos años ha aumentado, debido a que estos productos son nutritivos y saludables; razón por la cual los médicos y nutricionistas recomiendan su consumo diario (Luna et al. 2008).

Los vegetales troceados y envasados listos para el consumo son conocidos como mínimamente procesados o de cuarta gama, serían cultivados y procesados bajo condiciones sanitarias controladas, para conseguir la disminución de la carga microbiana en la etapa de lavado y desinfección (Artés-Calero et al. 2009).

Sin embargo, debido a sus características físicas y de cultivo, algunos de estos productos están expuestos a contaminación de tipo biológico y químico, situación que genera un riesgo para la salud humana. Uno de los factores más importantes de contaminación microbiana para los cultivos son las aguas de riego empleadas con altos recuentos microbianos, como vertederos de aguas residuales en lo que se han convertido los ríos (Rivera-Jacinto et al. 2009).

Mediante la detección de bacterias indicadoras de contaminación, se puede determinar el estado higiénico de aguas y alimentos, una de estas bacterias son los coliformes de origen fecal como la *Escherichia coli*, la cual se encuentra en el intestino humano y animal. Estos microorganismos entéricos patógenos son los causantes de muchas enfermedades como cólera, fiebre tifoidea, shigelosis, amebiasis y hepatitis (González et al. 2005). Muchos de estos microorganismos son capaces de sobrevivir en las hortalizas frescas luego de haber pasado por un proceso de desinfección, e incluso de reproducirse durante su almacenamiento (López et al. 2003).

Debido a que las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son el resultado de la falta de higiene en los alimentos (Castro et al. 2006), se plantea esta investigación con el objetivo de determinar la calidad sanitaria de vegetales listos para el consumo, mediante la cuantificación de aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli*. Los resultados que se obtengan con 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 los productos vegetales.

## **I. REVISIÓN LITERARIA**

### **1.1 Perejil (*Petroselinum Sativum*)**

Es una hierba aromática perteneciente a la familia Apiaceae o umbelíferas; planta herbácea bienal, perenne de corta duración, muy ramificada, de color verde y tallo cilíndrico.(Reyes-Munguía et al. 2012). El perejil es utilizado ampliamente como condimento, sus hojas rizadas son utilizadas como aderezo y como saborizante de carnes, salchichas, alimentos enlatados, sopas, salsas y como sazonador, también es apreciado como aromatizante de quesos, se lo utiliza como elemento decorativo en los platillos (Grüner et al. 2005).

El perejil tanto fresco como seco, se utiliza extensamente como condimento en diversos productos alimenticios a causa de su olor aromático de gran alcance, es cultivado como especia y se produce en la huerta doméstica, además es una fuente muy rica de las vitaminas C y E, caroteno, tiamina y minerales orgánicos (Lema et al. 2007).

### **1.2 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)**

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) contienen agentes patógenos que afectan la salud del consumidor manifestándose generalmente con malestar intestinal, diarrea y/o vómito. En algunos casos, pueden llegar a complicarse provocando secuelas permanentes en el paciente o provocando incluso la muerte. La población más susceptible a ser afectada por estas enfermedades son los niños, los ancianos, las mujeres embarazadas y los inmunocomprometidos por los medicamentos o enfermedades. La severidad de la enfermedad está en función de la salud del individuo, el tipo y la cantidad del agente tóxico o microbiológico recibido y, en algunos casos, a la exposición previa al agente (Domínguez 2009).

La demanda de productos sanos, frescos como, y fáciles de preparar, junto con el cambio en los estilos de vida del consumidor han dado lugar al desarrollo de una variedad de nuevos productos. Estos productos son procesados y listos para comer o tomar un mínimo de tiempo para prepararse. Las verduras y frutas mínimamente procesadas son un ejemplo de este tipo de productos (Seo et al. 2010).

Los microorganismos que se adhieren a la superficie de las verduras recién cosechadas son saprofitos principalmente Gram-negativas. Sin embargo, algunos microorganismos patógenos tales como *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* y *Escherichia coli* enteropatógena también se pueden encontrar. Las hortalizas de hoja que han entrado en contacto con el suelo pueden albergar bacterias Gram-positivas, tales como *Clostridium spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Seo et al. 2010).

### **1.3 Microorganismos indicadores de la calidad sanitaria del alimento.**

Los microorganismos indicadores se han utilizado para determinar algunas condiciones microbiológicas referentes a los alimentos, relacionadas con la contaminación de origen fecal. Además indican la presencia de microorganismos potencialmente patógenos, o la posible proliferación de microorganismos en los alimentos, y la situación sanitaria durante el procesamiento, almacenamiento o transporte de los mismos (García-Gómez et al. 2002).

Los microorganismos indicadores que generalmente se cuantifican para determinar calidad sanitaria de alimentos son aerobios mesófilos, mohos, levaduras, coliformes totales, coliformes fecales, entre otros (Félix-Fuentes et al. 2005).

#### **1.3.1 Aerobios Mesófilos**

Son aquellos microorganismos heterogéneos que tienen la capacidad de formar colonias visibles en las condiciones adecuadas de tiempo, temperatura y medio de cultivo. El recuento de estos microorganismos en el agua, alimentos y otros materiales relacionados pueden tener algunas aplicaciones de interés:

- ✓ La exposición a fuentes de contaminación.
- ✓ Las condiciones de almacenamiento.
- ✓ La eficiencia de tratamientos antimicrobianos.
- ✓ La predicción de la vida de anaquel (De La Rosa Hernández 2007).

El recuento en placa para microorganismos aerobios mesófilos que se encuentran en los alimentos, ha sido uno de los indicadores microbiológicos de calidad de los alimentos más comúnmente utilizados. Estos microorganismos reflejan la exposición de la muestra a cualquier tipo de contaminación, y, en general, a la existencia de condiciones favorables para la multiplicación de microorganismos patógenos y la presencia de materia orgánica. La presencia de estos microorganismos es útil para indicar si la limpieza, desinfección y control de la temperatura durante el procesamiento industrial, el transporte y el almacenamiento, se han realizado de una manera satisfactoria (García-Gómez et al. 2002)

La cuantificación de aerobios mesófilos se realiza mediante la técnica de vertido en placa con agar plate count. Esta técnica 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 (Maturin and Peeler 2001).

#### **1.3.2 Coliformes totales**

Del grupo coliformes forman parte varios géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* (Pascual 2000). Son bastoncillos gramnegativos, no formadores de esporas, muchos son móviles, facultativos anaerobios, resistentes a

numerosos agentes activos de superficie, y en 48 horas fermentan lactosa para producir ácido y gas a temperaturas de 32 a 35°C. Suelen estar presentes en las heces de humanos, animales de sangre caliente y aves (Ray and Bhunia 2010), pero también en otros ambientes: suelo, plantas, cáscara de huevo, etc (Pascual 2000).

La presencia de estos microorganismos en los alimentos indica deficientes prácticas de sanitización de superficies inertes y un mal proceso de desinfección de frutas, verduras y legumbres (Bravo 2004).

Dentro de este grupo se encuentran los coliformes fecales los que tienen significado sanitario y, por consiguiente, los que más interesan en el análisis microbiológico de los alimentos (Pascual 2000).

La cuantificación de coliformes totales y *E. coli* se realiza mediante la técnica de tubos múltiples NMP (número más probable de bacterias). Esta técnica consiste en inocular la muestra en caldos selectivos (caldo Lauryl Sulfato Triptosa y discos ColiComplete), incubar en condiciones adecuadas de tiempo y temperatura y realizar el conteo de la cantidad de bacterias coliformes y *E. coli* por NMP/g (Feng and Burkhardt 2002).

### **1.3.3 Coliformes fecales**

Son un grupo de bacterias cuya especificidad como contaminante fecal es mucho más alta que la de los demás grupos. Entre ellos está principalmente *E. coli* junto con algunas especies de *Klebsiella* y *Enterobacter*. Los coliformes no fecales se eliminan con el uso de una temperatura de incubación de 44 a 45°C por 24 horas en cultivos selectivos que contengan lactosa (Ray and Bhunia 2010).

### **1.3.4 *Escherichia coli***

Es un bacilo corto gramnegativo, móvil. Se encuentra integrando la flora del tracto intestinal del hombre y de los animales. La temperatura de crecimiento es de 37°C, con un intervalo de crecimiento de 10 a 40°C. El pH óptimo de crecimiento es de 7 a 7,5 (De La Rosa Hernández 2007). Produce indol a partir de triptona, reducción de rojo de metilo debido a la producción de ácido. Se considera que su presencia en las materias primas alimenticias indica contaminación fecal, directa o indirecta. La contaminación directa ocurre durante el procesamiento de las materias primas de origen animal debido a la falta de higiene del personal que las maneja y la contaminación indirecta puede deberse a aguas cloacales o sucias (Ray and Bhunia 2010).

#### **1.3.4.1 Enfermedades transmitidas por *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es la especie predominante de la flora anaeróbica facultativa del colon humano. Las infecciones producidas por cepas de *E. coli* patógenas pueden estar limitadas a mucosas o bien diseminarse. Cuando síndromes clínicos pueden resultar de la infección por cepas patogénicas: infección de vías urinarias, sepsis, meningitis y enfermedad diarreica. Cuando hay una perforación intestinal, son las responsables de la peritonitis consecutiva a dicha lesión (Cabello 2007).

## **II. OBJETIVOS**

## **2.2 Objetivo General**

Contribuir a disminuir el riesgo de incidencia de las enfermedades de origen alimentario (ETAs) por vegetales empacados.

## **2.3 Objetivo específico**

Conocer la prevalencia y los niveles de contaminación causado por microorganismos patógenos en perejil empacado que se expende en la ciudad de Loja.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 Materia prima**

Para este estudio se analizaron 26 muestras de perejil empacado (perejil liso y perejil crespo), los mismos que se encuentran disponibles en los supermercados de la localidad. Las muestras fueron tomadas en el sitio de expendio y corresponden a distintos lotes de producción.

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 perejil, de un lote no mayor a 50 unidades.

### **3.2 Preparación de la muestra**

Las muestras se transportaron en hieleras desde el centro de abasto hasta el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja, y se analizaron hasta máximo 24 horas después de la recepción.

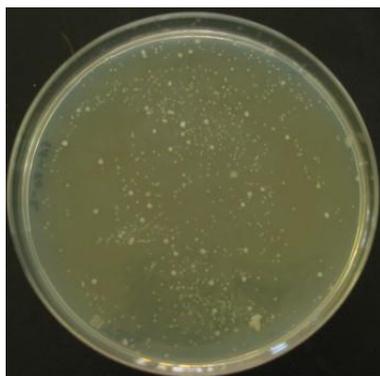
Para la preparación de la sub-muestra de 50 g, se aplicó las recomendaciones establecidas por la norma (INEN 1529-2:2013), que indica que si el alimento está formado por capas o extractos y evitando contaminar las partes tomar muestras de cada una en la misma proporción en que se encuentran en el producto original; posteriormente se realizó las respectivas diluciones indicadas para cada tipo de microorganismo.

### **3.3 Recuento de aerobios mesófilos.**

La cuantificación se realizó mediante la técnica de vertido en placa con agar plate count según U.S FDA Bacteriological Analytical Manual., Capítulo 3 (Maturin y Peeler, 2001) de acuerdo al siguiente procedimiento:

- ❖ Se pesó asépticamente 50 g de muestra, se transfirió a un frasco de dilución con 450 mL de agua buferada estéril (Ver Anexo A) realizando diluciones hasta  $10^{-6}$ .
- ❖ Para cada dilución el ensayo se realizó por duplicado, en cada una de las cajas Petri bien identificadas se depositó 1 mL de cada dilución utilizando una pipeta distinta y esterilizada.
- ❖ Inmediatamente se agregó de 15 a 20 mL de agar plate count (Ver Anexo A) temperado a 45 °C.
- ❖ Cuidadosamente se mezcló el inóculo de siembra con el agar, y se realizó movimientos de vaivén: 5 veces en el sentido de las agujas del reloj y 5 veces al contrario.
- ❖ Como prueba de esterilidad se colocó agar en una caja Petri sin inóculo para constatar que no existe desarrollo de colonias.

- ❖ Se dejó reposar las placas para que se solidifique el agar.
- ❖ Se incubó las placas invertidas a 35°C por 48 ± 2 horas.
- ❖ No se debe apilar más de 6 placas, deben estar separadas entre sí de las paredes y del techo de la incubadora.
- ❖ Pasado el tiempo de incubación se seleccionó las placas de dos diluciones consecutivas que presentaron entre 25 a 250 UFC/g utilizando un contador de colonias (Ver figura 1).
- ❖ Se anotó el número de colonias con su respectiva dilución.



**Figura 1.** Presencia de aerobios mesófilos en perejil empacado

### **3.4 Cuantificación de coliformes totales y *E. coli***

La cuantificación se realizó mediante la técnica de tubos múltiples NMP (número más probable de bacterias) según U.S FDA Bacteriological Analytical Manual. Capítulo 4 (Feng y Burkhardt, 2002) de acuerdo al siguiente procedimiento:

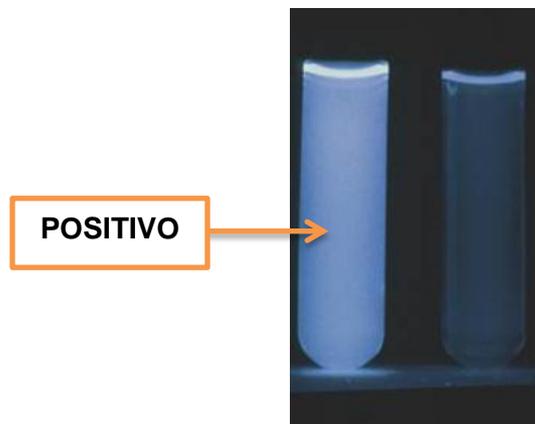
- ❖ Se pesó 50 g de muestra y se transfirió a un frasco de dilución con 450 mL de agua buferada estéril realizando diluciones hasta  $10^{-6}$ .
- ❖ Se inoculó 1 mL de cada una de las diluciones en los tubos que contienen caldo LST (Lauryl Sulfato Triptosa) (Ver Anexo A), se añadió asépticamente los discos ColiComplete, los cuales contienen X-Gal (galactopiranosido 5-bromo-4-cloro-3-indolil), que en los coliformes se transforma en  $\beta$ -galactosidasa para producir un producto azul, y 4-metilumbeliferona-D-glucuronido, que en la bacteria *E. coli* se transforma en  $\beta$ -glucuronidasa para producir fluorescencia azul (Valentin-Bon et al. 2007).
- ❖ Se incubó de 35 a 37° C.
- ❖ Para coliformes totales, después de al menos 24 horas, se procedió a examinar los tubos visualmente, si existe la presencia de un color azul indistintamente en el disco o en los alrededores del medio indica la confirmación de coliformes

totales, mientras la ausencia de color azul indica un resultado negativo (Ver figura 2).

- ❖ Sea positiva o negativa la prueba, se reincubó a  $35-37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 2\text{ h}$ , para confirmar la presencia o ausencia de coliformes totales.
- ❖ De cada dilución se anotó el número de tubos positivos confirmados para coliformes.
- ❖ Para registrar el NMP/g de bacteria, se eligió 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 tubos positivos confirmados, se selecciona las tres diluciones más altas con algún tubo positivo.
- ❖ Para *E. coli*, después de  $30 \pm 2\text{ h}$  desde el inicio de la incubación inicial, se examinó los tubos bajo luz ultravioleta de onda larga (366 nm). Los tubos fluorescentes indican confirmación de resultado positivo para *E. coli* (Ver figura 3).
- ❖ Se registró la presencia / ausencia de *E. coli* en la muestra.

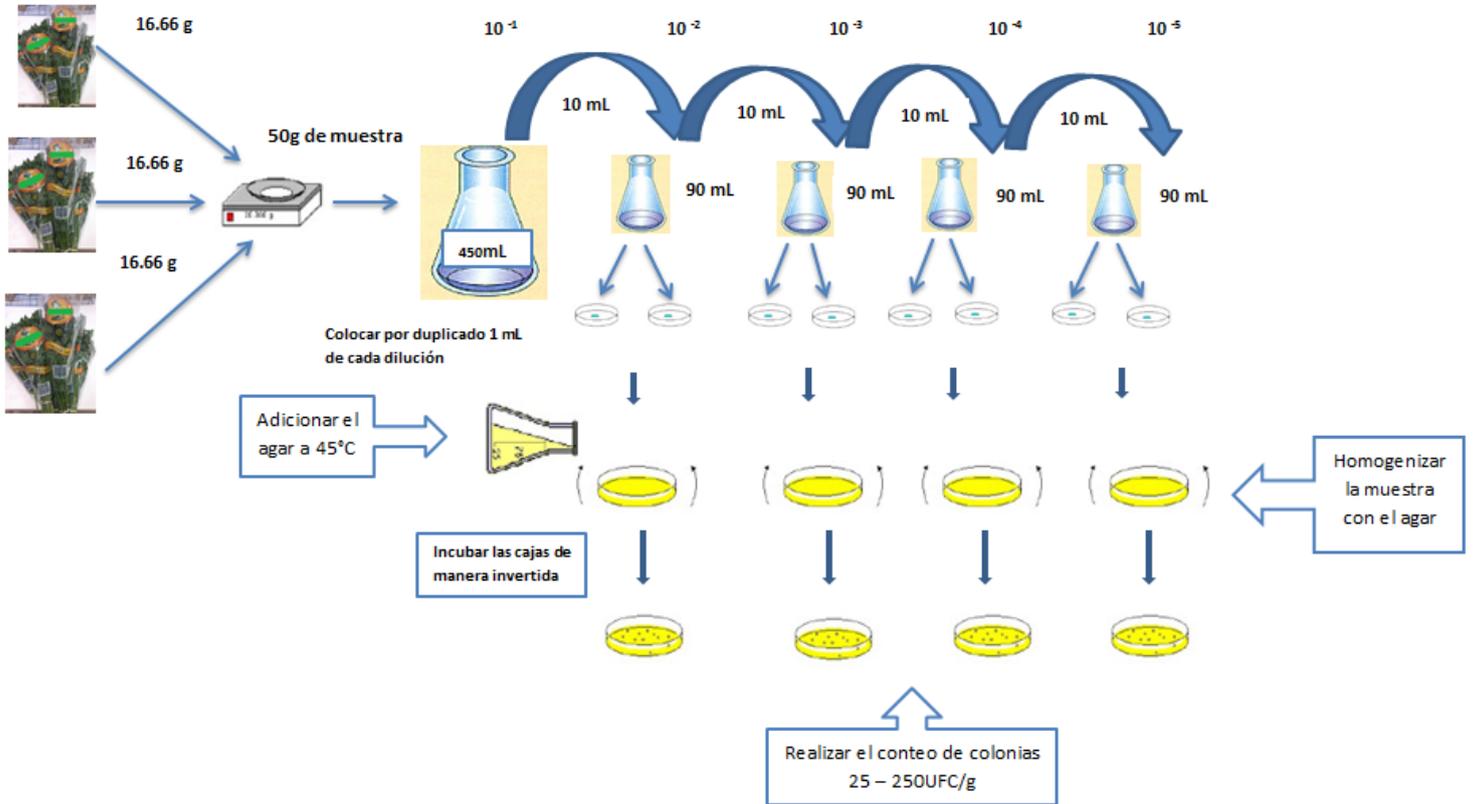


**Figura 2.** Presencia de coliformes totales en perejil empacado



**Figura 3.** Presencia de *E. coli* en perejil empacado

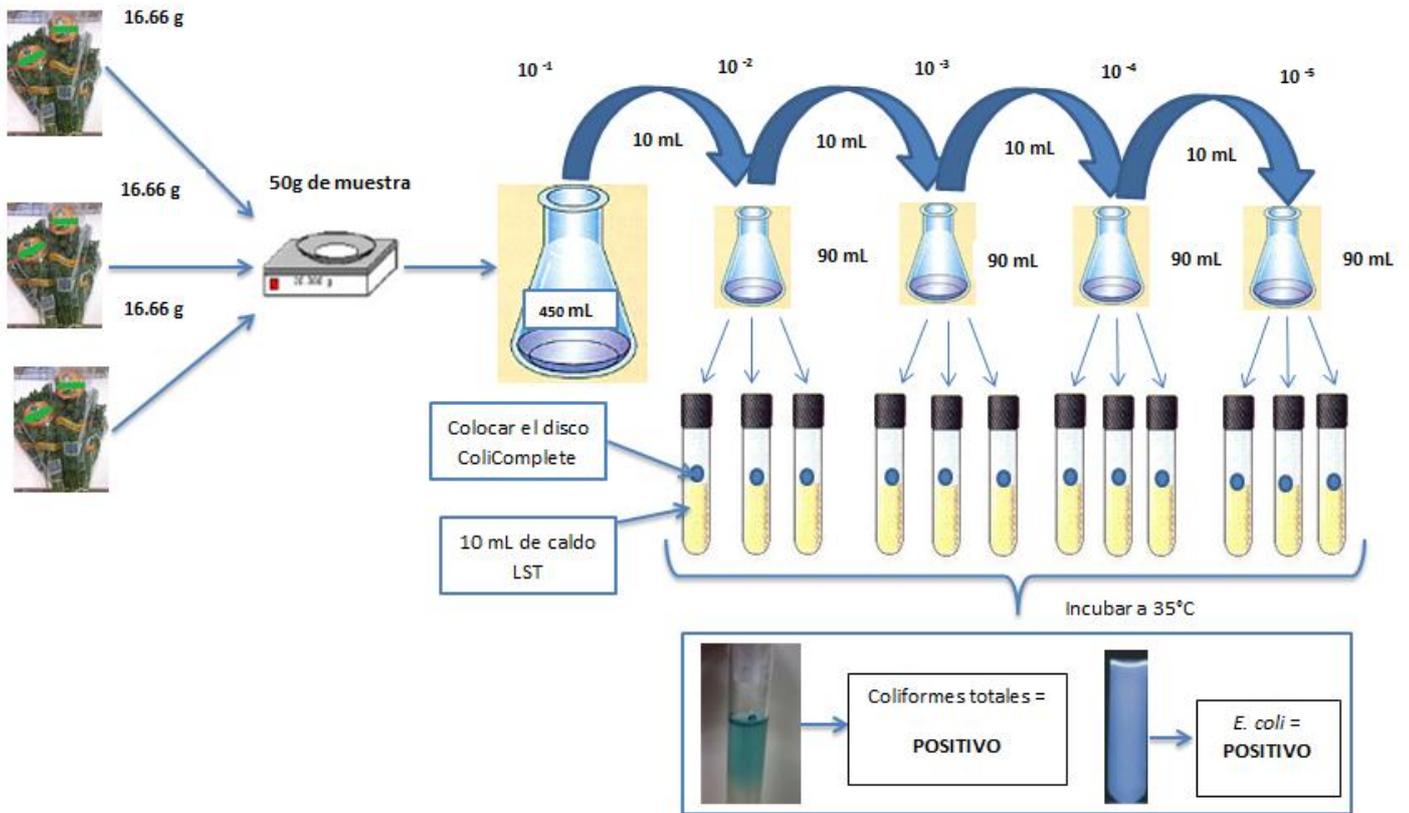
En la figura 4 se puede observar el procedimiento para la determinación de aerobios mesófilos.



**Figura 4.** Recuento de aerobios mesófilos

**Fuente:** (Maturin y Peeler, 2001)

En la figura 5 se puede observar el procedimiento para la determinación de coliformes totales y *E. coli*.



**Figura 5.** Recuento de coliformes totales y *E. coli*  
**Fuente:** (Feng y Burkhardt, 2002)

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

#### 4.1 Aerobios Mesófilos

El recuento de aerobios mesófilos realizado a las muestras de perejil empacado se encuentra en el rango 5,58 a 6,09 log UFC/g (Ver tabla 1). Se han realizado estudios microbiológicos con valores inferiores en Egipto, Khalil and Gomaa (2014) sobre la evaluación microbiológica de vegetales de hojas verdes, en donde se encontró un recuento de 4,91 log UFC/g para perejil, lo que indica que en nuestro caso hubo una mayor contaminación. En Estados Unidos Johnston et al. (2005) reportó un recuento de 5,6 log UFC/g, este resultado puede compararse con lo obtenido en esta investigación. En Brasil Oliveira et al. (2011) realizaron una evaluación sobre la calidad microbiológica de vegetales, obteniendo un resultado superior al de este estudio de 9,4 log UFC/g para la muestra de perejil, lo que indica que los resultados obtenidos en este estudio tuvieron una menor contaminación.

**Tabla 1.** Recuento de aerobios mesófilos (Ver Anexo B)

Muestra	Promedio (log UFC/g)
A	5,58 ± 0,61
B	6,09 ± 0,37

n= 13

Fuente: El autor

García – Gómez et al. (2002), señala que los aerobios mesófilos son microorganismos indicadores de la calidad de los alimentos, la presencia de éstos refleja la exposición de la muestra a cualquier tipo de contaminación y la existencia de condiciones favorables para la multiplicación de microorganismos patógenos.

Kalil and Gomaa (2014), señalan que los resultados obtenidos para aerobios mesófilos en vegetales de hojas verdes se debió al mal manejo en el método de la cosecha, además a estos vegetales se los vende en racimo abierto, estando propenso a la contaminación.

#### 4.2 Coliformes Totales

El recuento de bacterias coliformes para las muestras de perejil empacado, estuvieron en un rango de 3,29 a 3,82 log NMP/g (Ver tabla 2). Los resultados de este estudio se pueden comparar con estudios que se han realizado en Maracaibo, (Ginestre Pérez et al. 2011) reportó que las muestras de perejil analizadas tuvieron recuentos entre 5 - 9 log NMP/g. En Cajamarca, Perú Rivera-Jacinto et al. (2009) realizó un estudio microbiológico a diversas hortalizas, dando como resultado valores mayores a 3 log NMP/g para perejil. En Brasil Oliveira et al. (2011) detectó que las muestras de perejil

estaban contaminadas por coliformes totales, con un recuento promedio de 3 log NMP/g.

**Tabla 2.** Recuento microbiológico para coliformes totales (Ver Anexo D)

Muestra	Promedio (log NMP/g)
F	3,82
G	3,29

n= 13

Fuente: El autor

Según García - Gómez et al. (2002), la presencia de coliformes totales en alimentos indica el posible contacto con materia fecal, así como el contacto con el medio ambiente. Además, la contaminación puede ser causada por deficiencias sanitarias en el manejo durante la cosecha y el transporte hasta los puntos de venta, o en el procesamiento y preparado del producto (Muñoz et al. 2013).

Abadias et al. (2008) señala que los niveles altos de coliformes presentes en vegetales se dan porque tienen grandes áreas de superficie y pliegues, haciéndolo más susceptibles a contaminación bacteriana y adherencias. Sus hojas abiertas pueden estar en contacto con el suelo y el agua de riego.

#### 4.3 E. Coli

Se determinó la presencia de *E. coli* en 3 de las 26 muestras analizadas (Ver tabla 3). Estudios realizados en Perú por Rivera-Jacinto et al. (2009), se encontró presencia de *E. coli* en 8 de 17 muestras de perejil. Otro estudio realizado en Maracaibo por (Ginestre Pérez et al. 2011), reportó la contaminación por *E. coli* de 50 de las 100 muestras de perejil analizadas . En Brasil se realizó un estudio por Oliveira et al. (2011), para determinar la calidad microbiológica de vegetales, obteniendo como resultado 21 de 22 muestras de perejil contaminadas por *E. coli*.

**Tabla 3.** Número de muestras positivas para *E. coli* (Ver Anexo F)

Muestra	°N de muestras positivas
F	0
G	3

n= 13

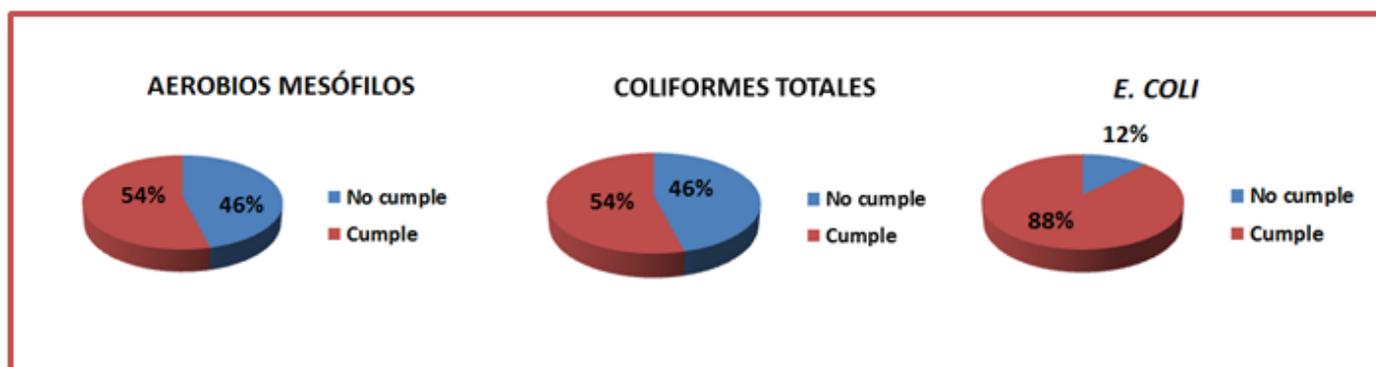
Fuente: El autor

Loncarevic et al. (2005), menciona que una fuente probable de contaminación de *E. coli* es el agua de riego, además los vegetales pueden ser contaminados en el campo por los pájaros, roedores, insectos o salpicaduras de la tierra en la cosecha o post-cosecha de los mismos. La contaminación por *E. coli* en las verduras podría atribuirse al problema de la utilización de estiércol sin tratar como fertilizantes del suelo en el campo o por el uso de agua de riego contaminada (Mukherjee et al. 2004).

La presencia de *E. coli* en los vegetales frescos no sólo refleja la contaminación fecal, sino también indica la posibilidad de que otros patógenos asociados con la contaminación fecal podrían ser ingeridos y capaz de causar infecciones (Chang et al. 2013).

Las cepas de *Escherichia coli* son productoras de toxina Shiga, constituyen un grupo importante dentro del conjunto de patógenos emergentes transmitidos por alimentos; en los seres humanos estas bacterias son de alta peligrosidad, debido a que se asocian con severas manifestaciones clínicas que varía desde diarrea leve y autolimitada hasta procesos más graves, muchas veces con secuelas importantes, como colitis hemorrágica (Varela et al. 2008).

Los resultados en la Figura 6 indican el porcentaje del cumplimiento e incumplimiento de la calidad microbiológica de perejil empacado, se ha tomado como referencia los límites establecidos por Lerena (2004) para aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli* debido a que la legislación Ecuatoriana no cuenta con una norma que regule este tipo de productos (Ver Anexo G).



**Figura 6.** Cumplimiento e incumplimiento microbiológico para las muestras de perejil.  
**Fuente:** El autor

De las 26 muestras de perejil empacado 12 (46%) del total de muestras analizadas tuvieron valores superiores a 6 log UFC/g que es el límite máximo establecido por la norma de referencia para el recuento de aerobios mesófilos en hortalizas frescas. Johnston et al. (2005) reportó en su investigación sobre la calidad microbiológica de productos frescos que el 20% de muestras para perejil no superan este límite, estos resultados son inferiores a los encontrados en este estudio, lo que refleja una menor contaminación en los vegetales de este estudio.

En cuanto al recuento de coliformes totales el 46% de las muestras presentaron recuentos superiores a 3,70 log UFC/g, límite máximo establecido por la norma de referencia. Rincón et al. (2010) realizó un estudio sobre la calidad microbiológica de vegetales tipo hoja dando como resultado que el 92% de muestras sobrepasaban el límite establecido para coliformes totales en perejil.

En esta investigación, 12% (3/26) de las muestras analizadas dieron positivo para *E. coli*, resultados superiores fueron reportados por (Rivera – Jacinto et al. 2009, Ginestre Pérez et al. 2011), que obtuvieron valores de (52, 47% respectivamente) en hortalizas frescas como perejil, resultados con mayor contaminación respecto a este estudio.

Los resultados de esta investigación reflejan que existe contaminación en este tipo de vegetales analizados para aerobios mesófilos, coliformes totales y *E coli*, por lo cual se debe considerar a estos alimentos como un factor de riesgo de posibles enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).

## CONCLUSIONES

- El recuento de aerobios mesófilos estuvo en un rango de 5,58 – 6, 09 log UFC/g, y el conteo de bacterias coliformes totales en un rango de 3,29 – 3,82 NMP/g.
- Se determinó la presencia de *E. coli* en 3 muestras de un total de 26.
- Se evaluó la calidad microbiológica de perejil empacado utilizando como referencia los límites establecidos por Lerena (2004) para aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli*, debido a que en la legislación Ecuatoriana no cuenta con normas para este tipo de productos, se determinó que el 46% de las muestras analizadas no cumplen con esta norma en lo que respecta al recuento de aerobios mesófilos, el 46% de las muestras sobrepasa el límite permisible para coliformes totales y en el 12 % de las muestras analizadas se determinó la presencia de *E. coli*.

## RECOMENDACIONES

- Conservar las cepas de *E. coli* en criocongelación para la continuación del estudio microbiológico, el cual se basa en detectar si estas cepas producen la toxina Shiga.
- En lo que respecta al medio de cultivo (agar plate count), al momento de realizar el análisis respectivo, se lo debe mantener temperado en baño maría de 50 a 60°C para evitar que se solidifique.

## 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.

Artés-Calero, F.;E. Aguayo;P. Gómez and F. Artes-Hernández. 2009. Productos vegetales mínimamente procesados o de la cuarta gama. *Horticultura Internacional* 69: 52-59.

Bravo, F. 2004. El manejo higienico de los alimentos: Guía para la obtencion del distintivo H. México, Editorial Limusa. 75p.

Cabello, R. 2007. Microbiologia y parasitologia humana: Bases etiologicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Tercera edición. México. Ed. Médica Panamericana. 751p.

Castro, J.;M. Rojas;Y. Noguera and E. Santos. 2006. Calidad sanitaria de ensaladas de verduras crudas, listas para su consumo.

Chang, W.;L. Afsah-Hejri;Y. Rukayadi;A. Khatib;Y. Lye;Y. Loo;N. Mohd Shahril;S. Puspanadan;C. Kuan and S. Goh. 2013. Quantification of *Escherichia coli* O157: H7 in organic vegetables and chickens. *International Food Research Journal* 20(2): 1023-1029.

De La Rosa Hernández, M. C. 2007. Comportamiento de microorganismos indicadores de higiene y escherichia coli patógena en germinado de alfalfa y evaluación de la eficiencia de tres desinfectantes sobre germinado de alfalfa contaminado con e. coli patógena. México. 44p.

Domínguez, W. 2009. Estudio de caso—Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Honduras. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO., Roma: 139-157.

Félix-Fuentes, A.;O. Campas-Baypoli and M. Meza-Montenegro. 2005. Calidad sanitaria de alimentos disponibles al público de ciudad Obregón, Sonora, México. Rev. Salud Pública y Nutrición 6(3).

Feng, P. and W. Burkhardt. 2002. BAM: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria (en línea). Estados Unidos, FDA. Consultado 20 de mayo del 2014. Disponible en:

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>

García-Gómez, R.;J. Chávez-Espinosa;A. Mejía-Chávez and C. Duran-de-Bazua. 2002. Microbiological determinations of some vegetables from the Xochimilco zone in Mexico City, Mexico. Revista latinoamericana de Microbiología-Mexico- 44(1): 24-30.

Ginestre Pérez, M.;S. Romero Añez;G. Rincón Villalobos;M. Castellano González;Y. Ávila Roo;G. Colina López and A. Perozo Mena. 2011. Indicadores entéricos en vegetales frescos que se comercializan en mercados populares de Maracaibo. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 29(1): 52-56.

González, M. V.;M. Jiménez;R. S. Brito and G. P. Flores. 2005. Determinación de bacterias de origen fecal en hortalizas cultivadas en Xochimilco de octubre de 2003 a marzo de 2004. Investigación Universitaria Multidisciplinaria: Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar(4): 3.

Grüner, H.;R. Metz and A. G. Martinez. 2005. Procesos de cocina. España. Ediciones AKAL. 96p.

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.

INEN. 1994. Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria: Hortalizas y Frutas frescas. Muestreo. INEN 1750. 17p.

Johnston, L. M.;L.-A. Jaykus;D. Moll;M. C. Martinez;J. Anciso;B. Mora and C. L. Moe. 2005. A field study of the microbiological quality of fresh produce. Journal of Food Protection® 68(9): 1840-1847.

Khalil, R. and M. Gomaa. 2014. Evaluation of the Microbiological Quality of Conventional and Organic Leafy Greens at the Time of Purchase from Retail Markets in Alexandria, Egypt. Polish journal of microbiology. The Polish Society of Microbiologists 63(2): 237.

Lema, A.;M. Pontin;A. Sanmartino;M. Ziletti and M. Martinello. 2007. Características del proceso de secado en capa delgada del perejil. Avances en Energías Renovables 11: 08-75.

Lerena C.A.; Lerena J.I. 2004. Análisis Microbiológico de los Alimentos. Ed. ACRIBIA (1973). MCBA/LABORATORIOS PRIVADOS (1993). Artículo 255 bis y Artículo 1078. Recomendaciones de I.C.M.S.F. 1986.

Loncarevic, S.;G. Johannessen and L. Rorvik. 2005. Bacteriological quality of organically grown leaf in Norway. Letters in Applied Microbiology 41(2): 186-189.

López, L.;J. Romero and F. Duarte. 2003. Calidad microbiológica y efecto del lavado y desinfección en vegetales pretrozados expendidos en Chile. Arch Latinoam Nutr 53(4): 383-388.

Luna, J.;J. Daga and P. Martínez. 2008. Determinación microbiológica de *Listeria* sp. en lechuga y espinaca. Red–Alfa Lagrodiech, Bogotá.

Maturin, L. and J. Peeler. 2001. BAM: Aerobic Plate Count (en línea). Estados Unidos, FDA. consultado 20 de mayo del 2104. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>

Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E., & Diez-Gonzalez, F. 2004. Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157: H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. Journal of Food Protection®, 67(5): 894-900.

Muñoz, J., Vilca, L., Ramos, D., & Lucas, J. 2013. Frecuencia de enterobacterias en verduras frescas de consumo crudo expendidas en cuatro mercados de Lima, Perú. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 24(3): 300-306.

Oliveira, M. A. d.;V. Maciel de Souza;A. M. Morato Bergamini and E. C. P. De Martinis. 2011. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control* 22(8): 1400-1403.

Pascual, M. and Calderón, V. 200. *Microbiología Alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebida*. Segunda edición. Madrid. Ed. Díaz de Santos. 13-15p.

Ray, B. and A. Bhunia 2010. *Fundamentos de Microbiología de los Alimentos*. Cuarta edición. México, McGraw-Hill Interamericana. 19p.

Reyes-Munguía, A.;D. Zavala-Cuevas and A. Alonso-Martínez. 2012. Perejil (*Petroselinum Crispum*): *Compuestos Químicos Y Aplicaciones*. Tlatemoani(11).

Rincón, G., Ginestre, M., Romero, S., Castellano, M., & Ávila, Y. 2010. Calidad microbiológica y bacterias enteropatógenas en vegetales tipo hoja; *Microbiological quality and enteropathogenic bacteria in leaf vegetables*. *Kasmera*, 38(2): 97-105.

Rivera-Jacinto, M.;C. Rodríguez-Ulloa and J. López-Orbegoso. 2009. Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 26(1): 45-48.

Seo, Y.-H.;J.-H. Jang and K.-D. Moon. 2010. Microbial evaluation of minimally processed vegetables and sprouts produced in Seoul, Korea. *Food Science and Biotechnology* 19(5): 1283-1288.

Valentin-Bon, I., Jacobson, A., Monday, S. R., and Feng, P. C. 2008. Microbiological quality of bagged cut spinach and lettuce mixes. *Applied and environmental microbiology*. 74(4): 1240-1242.

Varela, G., Chinen, I., Gadea, P., Miliwebsky, E., Mota, M. I., González, S. and Schelotto, F. 2008. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. *Revista argentina de microbiología*, 40(2): 93-100.

## ANEXOS

### ANEXO A. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

#### A.1 Agua Buferada

Preparación de la solución stock: Se disolvió 34,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 500 mL de agua destilada, el pH se ajustó a 7,2 con aproximadamente 1,75 mL de NaOH 1 Molar, se diluyó a 1 L. y luego se mantuvo en refrigeración.

Diluyente: Se diluyó 1,25 mL de la solución stock en 1 L con agua, Con esta solución se preparó blancos de dilución y se autoclavó por 15 min a 121°C.

#### A.2 Caldo Lauryl Sulfato Triptosa (LTS)

Para preparar 1000mL, se pesó 35,6 g del caldo lauryl sulfato triptosa, se diluyó en los 1000 mL de agua destilada, se colocó 10mL en los tubos de ensayo y se autoclavó por 15 minutos a 121°C.

Composición	
Lactosa.....	5g
Triptosa peptona.....	20g
Fosfato monopotásico.....	2,75g
Fosfato dipotásico.....	2,75g
Cloruro de sodio.....	5g
Laurilsulfato de sodio.....	0,1g

#### A.3 Agar Plate Count

Se pesó 23,5 del agar plate count, se diluyó en 1000 mL de agua destilada, se calentó hasta obtener una apariencia transparente, para luego autoclavar por 15 minutos a 121°C.

Composición	
Digerido pancreático de caseína.....	5g
Extracto de levadura.....	2,5g
Dextrosa.....	1g
Agar.....	15g

## ANEXO B. CUADROS DE RESULTADOS PARA AEROBIOS MESÓFILOS

**Tabla 4.** Recuento microbiológico total para las 13 muestras de perejil liso

Submuestra	Reporte UFC/g	Reporte en log UFC/g	Promedio log UFC/g
A1	106000	5,03	4,97
	83000	4,92	
A2	6300000	6,80	6,83
	7200000	6,86	
A3	94000	4,97	4,95
	85000	4,93	
A4	191000	5,28	5,27
	180000	5,26	
A5	124000	5,09	5,12
	141000	5,15	
A6	265000	5,42	5,41
	248000	5,39	
A7	2520000	6,40	6,40
	2480000	6,39	
A8	272000	5,43	5,43
	265000	5,42	
A9	1470000	6,17	6,18
	1560000	6,19	
A10	256000	5,41	5,42
	267000	5,43	
A11	290000	5,46	5,48
	310000	5,49	
A12	950000	5,98	6,09
	1620000	6,21	
A13	87000	4,94	4,95
	93000	4,97	
<b>PROMEDIO</b>			<b>5,58 ± 0,61</b>

Fuente: El auto

**Tabla 5.** Recuento microbiológico total para las 13 muestras de perejil crespo.

<b>Submuestra</b>	<b>Reporte UFC/g</b>	<b>Reporte log UFC/g</b>	<b>Promedio log UFC/g</b>
<b>B1</b>	2260000	6,35	6,36
	2310000	6,36	
<b>B2</b>	2250000	6,35	6,14
	830000	5,92	
<b>B3</b>	360000	5,56	5,68
	630000	5,80	
<b>B4</b>	2170000	6,34	6,37
	2580000	6,41	
<b>B5</b>	1190000	6,08	6,01
	860000	5,93	
<b>B6</b>	680000	5,83	5,85
	730000	5,86	
<b>B7</b>	930000	5,97	5,95
	860000	5,93	
<b>B8</b>	970000	5,99	6,02
	1130000	6,05	
<b>B9</b>	1030000	6,01	6,04
	1190000	6,08	
<b>B10</b>	2730000	6,44	6,45
	2860000	6,46	
<b>B11</b>	620000	5,79	5,78
	580000	5,76	
<b>B12</b>	300000	5,48	5,56
	440000	5,64	
<b>B13</b>	9600000	6,98	6,95
	8300000	6,92	
<b>PROMEDIO</b>			<b>6,09 ± 0,37</b>

Fuente: El autor

## ANEXO C. CÁLCULO PARA DETERMINAR LA CANTIDAD DE AEROBIOS MESÓFILOS

Diluciones				
Muestra	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
B1	MNPC	MNPC	226	12
	MNPC	MNPC	231	16

Se selecciona las placas que presentan de 25 – 250 UFC/g, en este caso es 226 UFC/g y 231 UFC/g. Se suma estos dos recuentos, se divide para dos y se multiplica por el inverso de la dilución.

$$\frac{226 \text{ UFC/g} + 231 \text{ UFC/g}}{2} * 10000 = 2285000 \text{ UFC/g} = 6,36 \log \text{ UFC/g}$$

## ANEXO D. CUADRO DE RESULTADOS PARA COLIFORMES TOTALES

Tabla 6. Recuento de coliformes totales en muestras de perejil liso

COLIFORMES TOTALES							
Submuestra	Tubos positivos				NMP/g	NMP/g * dilución	log NMP/g
	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>			
A1	3	2	0	0	93	930	2,97
A2	3	3	3	0	240	24000	4,38
A3	3	1	1	0	7,4	740	2,87
A4	3	2	0	0	93	930	2,97
A5	3	3	1	0	43	4300	3,63
A6	3	3	2	0	93	9300	3,97
A7	3	3	3	2	1100	110000	5,04
A8	3	3	3	1	460	46000	4,66
A9	3	3	2	0	93	9300	3,97
A10	3	3	2	0	93	9300	3,97
A11	3	3	3	0	240	24000	4,38
A12	3	3	3	3	>1100	>1100	3,04
A13	3	1	1	0	7,4	7400	3,87
<b>PROMEDIO</b>							<b>3,82</b>

Fuente: El autor

**Tabla 7.** Recuento de coliformes totales en muestras de perejil cresco.

<b>COLIFORMES TOTALES</b>							
	<b>Tubos positivos</b>						
<b>Muestra</b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>NMP/g</b>	<b>NPM/g *dilución</b>	<b>log NMP/g</b>
<b>B1</b>	3	2	0	0	93	930	2,97
<b>B2</b>	3	2	1	0	15	1500	3,17
<b>B3</b>	2	0	0	0	9,2	920	2,96
<b>B4</b>	3	3	1	0	43	4300	3,63
<b>B5</b>	3	1	0	0	43	430	2,63
<b>B6</b>	3	1	0	0	43	430	2,63
<b>B7</b>	1	0	0	0	3,6	360	2,56
<b>B8</b>	3	3	3	0	240	24000	4,38
<b>B9</b>	3	1	0	0	43	430	2,63
<b>B10</b>	3	3	2	0	93	9300	3,97
<b>B11</b>	3	3	2	0	93	9300	3,97
<b>B12</b>	3	1	0	0	43	430	2,63
<b>B13</b>	3	3	3	1	460	46000	4,66
<b>PROMEDIO</b>							<b>3,29</b>

Fuente: El autor

## ANEXO E. CÁLCULO PARA DETERMINAR LA CANTIDAD DE COLIFORMES TOTALES

Muestra	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
B1	3	2	0	0

- ✓ Se elige la dilución más alta en la que la presencia de coliformes es confirmada en los tres tubos y las dos diluciones superiores más próximas. En este caso tenemos  $10^{-2}$  con tres tubos positivos,  $10^{-3}$  con dos tubos positivos, en  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  sin tubos positivos.
- ✓ Los resultados serían los siguientes: las diluciones elegidas son  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  los tubos positivos se registran de la siguiente manera: **3 – 2 – 0**, esta serie (320) la buscamos en la tabla del NMP/g y vemos que corresponde a 93 NMP/g (Ver Anexo H).

Debemos tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- ✓ Si los tubos seleccionados corresponden a las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  la lectura es directa.
- ✓ Si los tubos seleccionados corresponden a las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  multiplicar por 10.
- ✓ Si los tubos seleccionados corresponden a las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  multiplicar por 100.
- ✓ Si los tubos seleccionados corresponden a las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  multiplicar por 1000.

Para este caso se multiplicaría por 10, quedando como resultado final **930 NMP/g**

## ANEXO F. CUADRO DE RESULTADOS PARA *E. COLI*

**Tabla 8.** Presencia/ausencia de *E. coli* en las 13 muestras de perejil liso.

<b>Muestra</b>	<b><i>Escherichia Coli</i></b>
A1	AUSENCIA
A2	AUSENCIA
A3	AUSENCIA
A4	AUSENCIA
A5	AUSENCIA
A6	AUSENCIA
A7	AUSENCIA
A8	AUSENCIA
A9	AUSENCIA
A10	AUSENCIA
A11	AUSENCIA
A12	AUSENCIA
A13	AUSENCIA

Fuente: El autor

**Tabla 9.** Presencia/ Ausencia de *E. coli* en muestras de perejil crespo.

<b>Muestra</b>	<b><i>Escherichia Coli</i></b>
B1	AUSENCIA
B2	AUSENCIA
B3	AUSENCIA
B4	AUSENCIA
B5	AUSENCIA
B6	PRESENCIA
B7	AUSENCIA
B8	AUSENCIA
B9	AUSENCIA
B10	PRESENCIA
B11	AUSENCIA
B12	PRESENCIA
B13	AUSENCIA

Fuente: El autor

## ANEXO G. REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS PARA HORTALIZAS FRESCAS

Tabla 10. Límites establecidos para aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli*

ENSAYO	LÍMITES	REFERENCIA
<b>AEROBIOS MESÓFILOS</b>	1.000.000 UFC/g (6 log UFC/g)	Lerena (2004)
<b>COLIFORMES TOTALES</b>	5000 UFC/g (3,70 log UFC/g)	Lerena (2004)
<b><i>ESCHERICHIA COLI</i></b>	Ausencia	Lerena (2004)

**ANEXO H. TABLA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE**

<b>For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram and 95 percent confidence intervals.</b>											
<b>Pos. tubes</b>			<b>MPN/g</b>	<b>Conf. lim.</b>		<b>Pos. tubes</b>			<b>MPN/g</b>	<b>Conf. lim.</b>	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<b>&lt;3.0</b>	–	9.5	2	2	0	<b>21</b>	4.5	42
0	0	1	<b>3.0</b>	0.15	9.6	2	2	1	<b>28</b>	8.7	94
0	1	0	<b>3.0</b>	0.15	11	2	2	2	<b>35</b>	8.7	94
0	1	1	<b>6.1</b>	1.2	18	2	3	0	<b>29</b>	8.7	94
0	2	0	<b>6.2</b>	1.2	18	2	3	1	<b>36</b>	8.7	94
0	3	0	<b>9.4</b>	3.6	38	3	0	0	<b>23</b>	4.6	94
1	0	0	<b>3.6</b>	0.17	18	3	0	1	<b>38</b>	8.7	110
1	0	1	<b>7.2</b>	1.3	18	3	0	2	<b>64</b>	17	180
1	0	2	<b>11</b>	3.6	38	3	1	0	<b>43</b>	9	180
1	1	0	<b>7.4</b>	1.3	20	3	1	1	<b>75</b>	17	200
1	1	1	<b>11</b>	3.6	38	3	1	2	<b>120</b>	37	420
1	2	0	<b>11</b>	3.6	42	3	1	3	<b>160</b>	40	420
1	2	1	<b>15</b>	4.5	42	3	2	0	<b>93</b>	18	420
1	3	0	<b>16</b>	4.5	42	3	2	1	<b>150</b>	37	420
2	0	0	<b>9.2</b>	1.4	38	3	2	2	<b>210</b>	40	430
2	0	1	<b>14</b>	3.6	42	3	2	3	<b>290</b>	90	1,000
2	0	2	<b>20</b>	4.5	42	3	3	0	<b>240</b>	42	1,000
2	1	0	<b>15</b>	3.7	42	3	3	1	<b>460</b>	90	2,000
2	1	1	<b>20</b>	4.5	42	3	3	2	<b>1100</b>	180	4,100
2	1	2	<b>27</b>	8.7	94	3	3	3	<b>&gt;1100</b>	420	–