



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TITULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Calidad microbiológica de vegetales empacados

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Agurto Gonzaga, Andrés Bryan

DIRECTORA: Hualpa Salinas, Diana Inés Mg. Sc.

LOJA – ECUADOR

2016



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister.

Diana Inés Hualpa Salinas

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “Calidad microbiológica de vegetales empacados” realizado por Andrés Bryan Agurto Gonzaga, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por lo tanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Noviembre 2016.

f) Diana Inés Hualpa Salinas, Mgtr.

C.I: 11028060

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Andrés Bryan Agurto Gonzaga declaro ser el autor del presente trabajo de titulación: **Calidad microbiológica de vegetales empacados**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo la Mgtr. Diana Inés Hualpa Salinas directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y 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: Andrés Bryan Agurto Gonzaga

C.I: 1104047293

DEDICATORIA

A Dios y a madre Blanquita, quienes desde el cielo guían mi camino para poder cumplir mis objetivos.

A mis padres Pedro, Yandry y Sandra, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, velar por mi bienestar y educación a lo largo de mi vida, apoyándome en todo momento.

A mis queridos hermanos Yandry Jr. Y Rodney, por su apoyo incondicional y ser mi fuerza para seguir adelante.

Andrés Bryan Agurto Gonzaga.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por todo lo bueno que ha puesto en mi vida, a mis padres por su total apoyo emocional y económico.

A mis amigos y todos los que compartieron conmigo esta etapa, por todo el tiempo de estudio compartido, su amistad y buenos consejos.

A la Mgtr. Diana Inés Hualpa Salinas por creer en mis capacidades e impartir sus conocimientos que me permitieron culminar con éxito esta investigación.

Andrés Bryan Agurto Gonzaga.

INDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
INDICE DE ANEXOS	viii
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO I MARCO TEÓRICO	5
1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).....	6
1.1.1. Intoxicación.....	6
1.1.2. Infección.....	6
1.1.3. Toxicoinfección.....	6
1.2. Fuentes de contaminación.....	7
1.3. Inocuidad de los alimentos.....	7
1.4. Microorganismos indicadores.....	7
1.4.1. Aerobios Mesófilos.....	7
1.4.2. Coliformes totales.....	8
1.4.3. <i>Escherichia coli</i>	8
1.5. Vegetales empacados.....	8
1.6. Lechuga.....	9
1.7. Espinaca.....	9

CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1. Muestras	11
2.2. Preparación de la unidad de muestra	11
2.3. Aerobios mesófilos	11
2.4. Coliformes totales y <i>Escherichia coli</i>	13
2.4.1. Coliformes totales.....	13
2.4.2. <i>Escherichia coli</i>	14
2.5. Diagrama gráfico de procesos.....	15
CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
3.1. Aerobios mesófilos	18
3.2. Coliformes totales y <i>Escherichia coli</i>	19
CONCLUSIONES.....	22
RECOMENDACIONES.....	23
BIBLIOGRAFÍA.....	24
ANEXOS	28

INDICE DE ANEXOS

Anexo A. Preparación de reactivos	29
Anexo B. Resultados de Aerobios mesófilos.....	30
Anexo C. Resultados de Coliformes totales	33
Anexo D. Resultados de <i>Escherichia coli</i>	37
Anexo E. Porcentaje de incumplimiento de microorganismos indicadores	38
Anexo F. Límites establecidos para microorganismos indicadores.....	39
Anexo G. Composición de medios de cultivo utilizados para el recuento de microorganismos indicadores	40

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plan De Muestreo	11
Tabla 2. Factores de dilución para Coliformes Totales	13
Tabla 3. Recuento de aerobios mesófilos en vegetales empacados crudos	18
Tabla 4. Recuento de coliformes totales y presencia de <i>Escherichia coli</i> en vegetales empacados crudos	19
Tabla 5. Cuadro de resultados de aerobios mesófilos	29
Tabla 6. Cuadro de resultados de coliformes totales	32
Tabla 7. Tabla de número más probable (NMP) por mL/g de muestra.....	35
Tabla 8. Cuadro de Presencia/Ausencia de <i>Escherichia coli</i>	36
Tabla 9. Porcentaje de muestras que incumplieron los rangos establecidos por normativas internacionales	37
Tabla 10. Normas microbiológicas para vegetales empacados	38
Tabla 11. Composición de medios de cultivo	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colonias de Aerobios mesófilos en agar plate count	12
Figura 2. Presencia de Coliformes totales.....	14
Figura 3. Presencia de <i>Escherichia coli</i>	14
Figura 4. Determinación de aerobios mesófilos	15
Figura 5. Determinación de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i>	16
Figura 6. Porcentaje de incumplimiento de microorganismos indicadores	20

ABREVIATURAS

APC:	Agar Plate Count
°C:	Grados Celsius
ETA:	Enfermedades transmitidas por alimentos
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura
FD:	Factor de dilución
FDA:	Food and Drug Administration
g:	Gramo
INEN:	Servicio Ecuatoriano de Normalización
ISO:	Organización Internacional de normalización
L:	Litro
Log:	Logaritmo
LTS:	Lauryl Sulfato Triptosa
mL:	Mililitro
Nm:	Nanómetro
NMP:	Número más probable
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OPS:	Organización Panamericana de la Salud
pH:	Potencial de hidrogeno
UFC:	Unidad formadora de colonias

RESUMEN

Los vegetales frescos se incluyen dentro de la alimentación debido a su gran aporte nutritivo y saludable, existen riesgos asociados a su consumo, diversos microorganismos se han aislado en concentraciones altas y con frecuencia pueden ser patógenos. El objetivo de esta investigación fue evaluar la calidad microbiológica de vegetales empacados: Lechuga criolla, romana y espinaca; que se expenden en la ciudad de Loja. Se realizó 10 muestreos de cada producto que correspondieron a distintos lotes de producción. Se determinó aerobios mesófilos por el método de recuento en placa, coliformes totales y *Escherichia coli* por la técnica de número más probable utilizando discos Colicomplete. El recuento aeróbico fue de 3,41 a 6,99 Log UFC/g, para coliformes totales fue de 0.48 a >5.04 Log NMP/g y se detectó la presencia de *Escherichia coli* en 13 muestras. Los resultados evidencian que el 67% de las muestras no cumple con la normativa de referencia para aerobios mesófilos, el 77% para coliformes totales y el 43% para *Escherichia coli*, por lo que no cumplen con el requisito normativo para este tipo de productos y puede considerarse como posible riesgo para el consumidor.

PALABRAS CLAVE: Aerobios mesófilos, Coliformes Totales, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Fresh vegetables are included within the diet because of their great nutritional and healthy intake, there are risks associated with their consumption, various microorganisms have been isolated in high concentrations and they can often be pathogenic. The objective of this research was to evaluate the microbiological quality of packaged vegetables: lettuce creole, romaine and spinach; that are sold in the city of Loja, high levels or the presence of these organisms indicate some kind of contamination, altering the microbial quality of food. 10 samples of each product that corresponded to different production batches was performed. aerobic mesophilic bacteria was determined by the method of plate count, total coliforms and *Escherichia coli* by the most probable number technique using disks Colicomplete. Aerobic count was 3.41 to 6.99 log CFU/g, for total coliforms was from 0.48 to > 5.04 Log NMP/g and the presence of *E. coli* was detected in 13 samples. The results show that 67% of samples does not comply with the reference standards for aerobic plate counts, 77% for total coliforms and 43% for *Escherichia coli*, which do not meet the regulatory requirement for such products and it can be considered as a possible risk to the consumer.

KEYWORDS: Aerobic mesophilic bacteria, Total Coliforms, *Escherichia coli*.

INTRODUCCIÓN

Los vegetales como las hortalizas son un conjunto de plantas cultivadas, generalmente, en huerta o regadíos, que se consumen como alimento ya sea de forma cruda o cocida (Rozano et al., 2004). Como la introducción de peligros para la seguridad en los alimentos puede ocurrir en cualquier etapa de producción, el control adecuado es esencial, por lo tanto, la seguridad se garantiza a través de los esfuerzos combinados de todas las partes que participan en la cadena alimentaria (ISO, 2005).

Los alimentos empacados se clasifican en varias denominaciones o gamas, la primera gama está constituida por vegetales crudos frescos, se trata de alimentos que no han sufrido ningún tratamiento higienizante o de conservación, por lo tanto son alimentos de riesgo, muy perecederos y que precisan de refrigeración, esta gama es de interés en esta investigación debido a que las demás utilizan conservantes, atmosferas controladas y sustancias químicas que ayudan a retardar la descomposición del alimento (Pefaur, 2014).

Según Gomes et al. (2012) el consumo de hortalizas ofrece numerosos beneficios para la salud y existe una relación directa entre su consumo y la reducción crónica de enfermedades como la hipertensión y cáncer. En los últimos años se ha animado a los consumidores a incluir más de estos productos en su dieta, al mismo tiempo, recientes brotes de enfermedades relacionadas con el consumo de estos productos, dejan patente que el consumo de hortalizas contaminadas representa una importante fuente de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) (OMS, 2012).

En el primer capítulo abordaremos temas de interés relacionados a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), inocuidad alimentaria, microorganismos indicadores y la importancia de su presencia en vegetales frescos, el segundo capítulo indica la metodología utilizada para la recolección de la muestra y el procedimiento para el recuento de microorganismos indicadores.

El aumento de ETA asociadas con el consumo de alimentos frescos, ha conducido a las autoridades sanitarias a considerar estas patologías como un problema de salud pública, en países subdesarrollados las ETA causadas por contaminación de vegetales frescos son frecuentes y en algunas áreas pueden causar una gran proporción de enfermedad, pero debido a la falta de registros sanitarios, la mayoría de estas epidemias no se detectan y la literatura científica reporta muy pocos brotes (Ginestre et al., 2009).

Según la FDA del 2% al 3% de ETA pueden llevar a una enfermedad de largo plazo, el Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas

por los Alimentos (SIRVETA) manifiesta que las hortalizas y legumbres constituyen un 2.39% de brotes en cuanto a ETA se refiere (OPS/OMS, 2005).

La importancia de este estudio en efecto es conocer los niveles de microorganismos indicadores en vegetales empacados, así mismo demostrar que niveles superiores al límite establecido podría tener un gran impacto en la salud del consumidor, información que servirá para tener datos concretos y concientizar a las personas sobre la importancia de la inocuidad alimentaria.

La presente investigación tiene como objetivo principal evaluar la calidad microbiológica de vegetales empacados que se expenden en la ciudad de Loja, a través de la detección de microorganismos indicadores (Aerobios mesofilos, coliformes totales y *Escherichia coli*) y contribuir a disminuir el riesgo de incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos. En base a los objetivos planteados, nuestros resultados sugieren deficiencias desde el punto de vista sanitario además la presencia de microorganismos indicadores podría ser indicio de una posible fuente de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), información detallada en el capítulo tres.

La metodología empleada se basó en la utilización de las normas INEN 1750 que hace referencia al muestreo de vegetales y frutas frescas e INEN 1529-2:2013, que indica los procedimientos generales para la toma de muestra, traslado al laboratorio y preparación para su análisis, además de protocolos establecidos por la FDA para el recuento.

CAPITULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Las ETA son aquellas enfermedades que se originan por la ingestión de alimentos infectados con contaminantes en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor, existen numerosos tipos de ETA que presentan diferentes sintomatologías, dependientes del tipo de contaminación y de la cantidad de alimento contaminado consumido (Kopper et al., 2009). La OMS define estas enfermedades como aquellas que, a la luz de los conocimientos actuales, pueden ser atribuidas a un alimento específico, a una sustancia que se le ha incorporado, a su contaminación a través de recipientes o bien en el proceso de preparación y distribución (OMS, 2012).

1.1.1. Intoxicación.

Son las enfermedades de transmisión alimentaria producidas por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas o animales, de productos metabólicos, de microorganismos en los alimentos o por sustancias químicas que se incorporan a ellos de modo accidental, incidental o intencional en cualquier momento desde su producción hasta su consumo (Kopper et al., 2009) ejemplos de intoxicaciones son el botulismo, la intoxicación estafilocócica o por toxinas producidas por hongos (Gomes et al., 2012).

1.1.2. Infección.

Se produce por la ingestión de alimentos y/o aguas contaminadas con agentes infecciosos específicos tales como: bacterias, virus, hongos y parásitos, que en la luz intestinal pueden multiplicarse, producir toxinas o invadir la pared intestinal y desde allí, alcanzar otros aparatos o sistemas (FAO, 2009). La infección de origen alimentario también puede ocurrir cuando el alimento contaminado constituye un sustrato adecuado para la multiplicación del microorganismo y tiene las condiciones adecuadas para transformarse en infeccioso (Kopper et al., 2009).

1.1.3. Toxicoinfección.

Se trata de una ingestión de un gran número de células viables de algunas bacterias patógenas que se encuentran en el agua y en alimentos contaminados, por lo general las células bacterianas esporulan, colonizan o mueren y liberan toxinas que producen síntomas como por ejemplo gastroenteritis (Ray & Bhunia, 2010).

1.2. Fuentes de contaminación

En el caso de las hortalizas, los principales fuentes de contaminación son de origen biológico, fundamentalmente microbiológico: bacterias, virus, parásitos y químico (residuos de plaguicidas), muchas de las diarreas estivales, la hepatitis A y diversas enfermedades transmitidas por alimentos tienen su origen en verduras mal lavadas, contaminadas con bacterias patógenas como *Escherichia coli* (Rushing, 2012).

1.3. Inocuidad de los alimentos

La inocuidad de los alimentos se refiere a la certeza de que ese alimento no va a causar perjuicio al consumidor ni en el corto ni en el mediano plazo, cuando se lo prepare o ingiera según su uso previsto (FAO, 2012). Las nuevas tendencias en el consumo mundial de alimentos se orientan a la demanda de productos que cumplan cada vez más estrictas normas de sanidad y calidad, por esta razón, muchos países han establecido directrices, normas, reglamentaciones y sistemas que aseguren la provisión de alimentos inocuos y aptos para el consumo, dichas normas se encuentran dentro de buenas prácticas agrícolas, de manufactura e higiene (Díaz & Uría, 2009).

1.4. Microorganismos indicadores

Se considera microorganismos indicadores a todos los microorganismos implicados en enfermedades de origen alimentario que por lo general son entéricos esto significa que pueden sobrevivir, multiplicarse o establecerse en el tracto gastrointestinal de los seres humanos, las muestras alimenticias se examinan para detectar el número de los grupos o de una especie de bacterias que por lo regular se hallan presentes en los alimentos en mayores cantidades que los patógenos, valores que sobrepasen los rangos de referencia experimentalmente establecidos, puede advertir deficiencias de una contaminación posterior al tratamiento, un almacenamiento defectuoso, materias primas contaminadas y tratamientos deficientes desde el punto de vista sanitario (Ray & Bhunia, 2010).

1.4.1. Aerobios Mesófilos.

En este grupo se incluyen todos los microorganismos, capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una óptima entre 30°C y 40°C, el recuento de microorganismos aerobios mesófilos, en condiciones establecidas, estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos, su cuantificación refleja la calidad sanitaria de los productos analizados, indicando además las condiciones higiénicas de la materia prima y la forma como fueron manipulados durante su elaboración (Ray & Bhunia, 2010). El recuento elevado de aerobios mesófilos puede significar, excesiva

contaminación de materia prima, deficiente manipulación durante el proceso de elaboración, posibilidad de que existan patógenos e inmediata alteración del producto (Renaloa, 2014).

1.4.2. Coliformes totales.

El término coliforme representa un grupo de especies de diversos géneros, entre ellos *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, la principal razón para agruparlos juntos es que comparten características comunes, son bastoncillos gramnegativos, no formadoras de esporas, muchos son móviles, facultativos anaeróbicos, resistentes a numerosos agentes activos de superficie, todas tienen la capacidad de prosperar en los alimentos, excepto los que tienen un $\text{Ph} \leq 4$, suelen estar presentes en heces de humanos, animales de sangre caliente y aves (Ray & Bhunia, 2010). Tradicionalmente se los ha considerado como indicadores de contaminación fecal en el control de calidad del agua destinada al consumo humano o cultivo razón de que, en los medios acuáticos, los coliformes son más resistentes que las bacterias patógenas intestinales y porque su origen es principalmente fecal. Por tanto, su ausencia indica que el agua es bacteriológicamente segura. Asimismo, su número en el agua es proporcional al grado de contaminación fecal; mientras más coliformes se aíslan del agua, mayor es la gravedad de la descarga de heces (FAO, 2009).

1.4.3. *Escherichia coli*.

Escherichia coli se encuentra típicamente en el tracto intestinal y en las heces de animales de sangre caliente, incluyendo seres humanos y, como tal, a menudo se utiliza como un indicador de contaminación fecal debido a la limpieza insuficiente durante la producción, distribución y/o venta, la presencia de *E. coli* implica que hay una posibilidad de que otras bacterias entéricas podrían estar presentes (Denis et al. 2016). Las cepas de *E. coli* constituyen alrededor del 1% de la población microbiana normal del intestino. Si bien la mayoría de las cepas dentro del intestino son agentes patógenos gastrointestinales beneficiosos para el ser humano, otros son perjudiciales. Las *E. coli* patógenas se distinguen de otras *E. coli* por su capacidad de provocar graves enfermedades como resultado de su información genética para la producción de toxinas, capacidad de adhesión e invasión de células huéspedes, interferencia con el metabolismo celular y destrucción de tejidos (FAO, 2011).

1.5. Vegetales empacados

Los vegetales crudos, son los que no se someten a ningún tipo de procesamiento, poseen un alto contenido de vitaminas y minerales además de un aporte calórico mínimo que los hacen indispensables para una dieta equilibrada, por sus características físicas y de cultivo, 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 microbiano (Rivera et al., 2009). Los microorganismos crecen con mayor rapidez en los vegetales dañados, durante su almacenamiento, el aire, la humedad y elevadas temperaturas aumentan las posibilidades de descomposición, aumentando el nivel de carga microbiana (Ray & Bhunia, 2010).

1.6. Lechuga

La lechuga (*Lactuca sativa*) es una de las hortalizas más consumidas en todo el mundo, posee un excelente valor nutricional, siendo buena fuente de fibra, hierro, ácido fólico y vitamina C, beneficiosos para la salud, la contaminación de estos vegetales se debe a una gran diversidad de fuentes, como la utilización de agua de riego contaminada, o del mismo suelo, la materia fecal humana o animal, el aire, los utensilios, los equipos de manejo o la manipulación humana, siendo muy propensos a causar una infección alimentaria (Kim et al., 2016).

1.7. Espinaca

La espinaca (*Spinacia oleracea* L.) son plantas herbáceas con un alto contenido en agua, alrededor del 90%, su color y tamaño varía según su variedad, poseen bajos niveles de carbohidratos y grasas razón por la cual lo hace un alimento muy sano, se consumen tanto en crudo como cocinadas, siendo muy usual en la preparación de ensaladas, aprovechando todas las propiedades que ofrece la planta (Cámara de Comercio de Bogotá, 2015). Poseen una elevada carga bacteriana que puede albergar microorganismos patógenos que ingresan al organismo a través de la ingesta de alimentos contaminados, causando trastornos metabólicos en el organismo de quien los consume y una inflamación de los tejidos gastrointestinales (Rivera et al., 2009)

CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras

Para la realización de esta investigación se trabajó con vegetales crudos de lechuga y espinaca, empacadas en bolsas de polipropileno, que se recolectaron en supermercados de la ciudad de Loja. El muestreo se realizó de acuerdo a la Tabla 1.

Tabla 1. Plan de Muestreo

MUESTRA	Muestras	Unidades por muestra
<i>Lechuga criolla</i>	10	3
<i>Lechuga romana</i>	10	3
<i>Espinaca americana</i>	10	3
TOTAL	30 Muestras	

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

Las muestras fueron tomadas en los distintos supermercados de la ciudad de Loja, tomando en cuenta su lote, fecha de elaboración y caducidad; seguidamente se trasladó la muestra de forma aséptica al laboratorio de microbiología de alimentos, los resultados para el recuento de Aerobios mesófilos y Coliformes totales se calcularon como la media \pm desviación estándar de dos repeticiones.

2.2. Preparación de la unidad de muestra

La recolección de las muestras se realizó de acuerdo a lo indicado en la norma INEN para el muestreo de hortalizas y frutas frescas, que indica que se debe tomar 3 unidades de un lote no mayor a 50 unidades (INEN 1750,1994).

Se transportaron de manera aséptica desde el centro de abasto al laboratorio y se analizó hasta máximo 24 horas después de la recepción. Para el primer muestreo tomamos 3 unidades al azar de las cuales se obtuvo una sub-muestra de 50g, para luego seguir con el protocolo propuesto por la norma INEN para control microbiológico de los alimentos, que establece los procedimientos generales para la toma de muestra en alimentos, traslado al laboratorio y preparación para su análisis microbiológico (INEN 1524, 2013).

2.3. Aerobios mesófilos

Para la determinación de este grupo microbiano, se utilizó la técnica de vertido en placa junto con agar plate count, método descrito por la U.S FDA Bacteriological Analytical Manual, Capítulo 3 (Maturín y Peeler 2001), el mismo que se basa en colocar la muestra en un medio

de cultivo, incubar en condiciones adecuadas de tiempo, temperatura y contar la cantidad de bacterias por gramo de muestra. El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- Se pesó una submuestra de 50g en un frasco de 450ml de agua buferada estéril (KH_2PO_4), para obtener la primera dilución 10^{-1} . A partir de esta dilución se realizó diluciones sucesivas hasta 10^{-5} .
- El ensayo se lo realizó por duplicado, en cada caja petri se inoculó 1 ml de cada dilución, utilizando para cada una dilución una pipeta estéril.
- Inmediatamente se vertió en cada una de las placas inoculadas 20 ml de agar fundido a $45^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. El vertido en del medio no debe pasar más de 45 minutos a partir de la primera dilución.
- Se procedió a mezclar el inoculo con el medio de cultivo utilizando movimientos continuos, en sentido de las agujas de reloj y al contrario.
- Luego de que se solidificó el agar se procedió a invertir las cajas para evitar el crecimiento de microorganismos indeseados y mantener un nivel adecuado de humedad, para luego incubar a $35 - 37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas.
- Pasado el tiempo de incubación se seleccionó las placas de dos diluciones consecutivas que presenten entre 25 y 250 colonias utilizando un contador de colonias.
- Se registró el número de colonias con su respectiva dilución.
- Se procedió a calcular el número de unidades formadoras de colonias, multiplicando el número de colonias obtenidas por su respectivo factor de dilución, los resultados se expresaron en UFC/g.

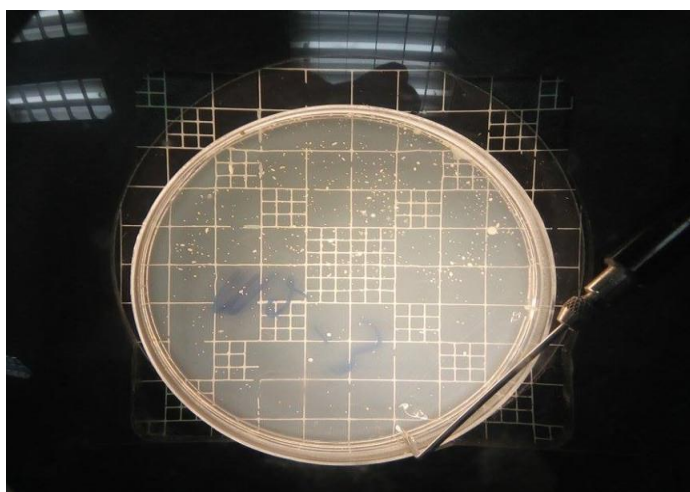


Figura 1. Colonias de aerobios mesófilos en agar plate count.

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

2.4. Coliformes totales y *Escherichia coli*.

La cuantificación de estos microorganismos indicadores fue realizada mediante la técnica de tubos múltiples NMP (número más probable de bacterias) según U.S FDA Bacteriological Analytical Manual, Capítulo 4 (Feng et al., 2002). El fundamento se basa en inocular la muestra en caldos selectivos (Caldo lauryl sulfato triptosa y con la adición de discos colicomplete), incubar en condiciones adecuadas de tiempo, temperatura y enumerar la cantidad de bacterias coliformes por NMP/g y determinar la presencia de *E. coli*, de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Pesar 50g de muestra en un frasco de 450ml de agua buferada estéril (KH_2PO_4) para obtener la primera dilución 10^{-1} . A partir de esta dilución se realizó diluciones hasta 10^{-5} .
- Se adicionó 1ml de cada una de las diluciones a tubos con 10ml que contenía caldo LST (Caldo lauryl sulfato triptosa).
- Se colocó los discos COLICOMPLETE con una piza estéril en cada una de las diluciones y se incubó los tubos de $35-37^\circ\text{C}$ por 48 ± 2 horas.

La lectura de resultados se realizó de la siguiente manera:

2.4.1. Coliformes totales:

- Luego de $48\text{h} \pm 2$ de incubación, se observó el cambio de coloración (azul) en los discos Colicomplete, que indicó la presencia de coliformes totales.
- Se registró los cambios de coloración en las diluciones respectivas.
- Se realizó la elección de la dilución más alta en donde haya existencia de cambio en la coloración en cada uno de los tubos. Si ninguna dilución presentaba cambio en los tres tubos, se procedió a seleccionar la dilución más alta con algún tubo positivo.
- La relación de tubos positivos se procedió a calcular de acuerdo a la tabla de referencia (Ver Anexo C).
- Para calcular el NMP/g cuando se inocula tres alícuotas de 1 ml, multiplicamos el NMP/g por su factor adecuado dependiendo de las diluciones que se ha tomado en cuenta.

Tabla 2. Factores de dilución para Coliformes Totales

DILUCIONES	FACTOR ADECUADO (Lectura directa)
$10^{-2}; 10^{-3}; 10^{-4}$	10
$10^{-3}; 10^{-4}; 10^{-5}$	100
$10^{-4}; 10^{-5}; 10^{-6}$	1000

Fuente: Official Methods of Analysis of AOAC International

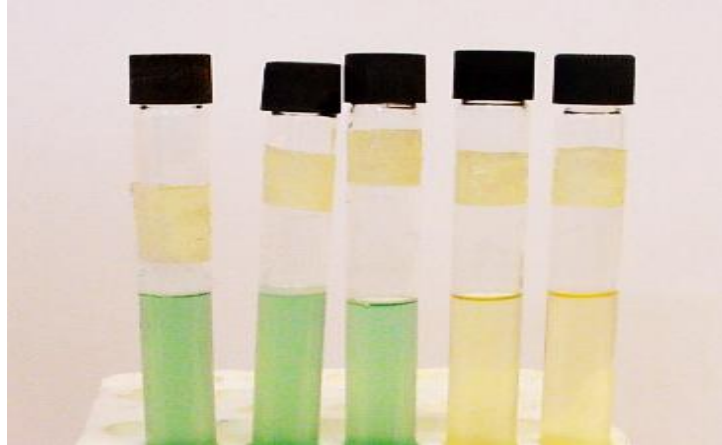


Figura 2. Presencia de Coliformes totales
Fuente: Autor
Elaboración: Autor

2.4.2. *Escherichia coli*:

- Una vez finalizado el recuento de coliformes totales, $30h \pm 2$. Se procedió a verificar la presencia de *E. coli* a través de la utilización de luz ultravioleta de onda larga (366 Nm). Los tubos que mostraron fluorescencia indicaron la presencia de *E. coli*.
- Los resultados se registraron como presencia/ausencia de *E. coli* en la muestra.



Figura 3. Presencia de *Escherichia coli*.
Fuente: Autor
Elaboración: Autor

2.5. Diagrama gráfico de procesos

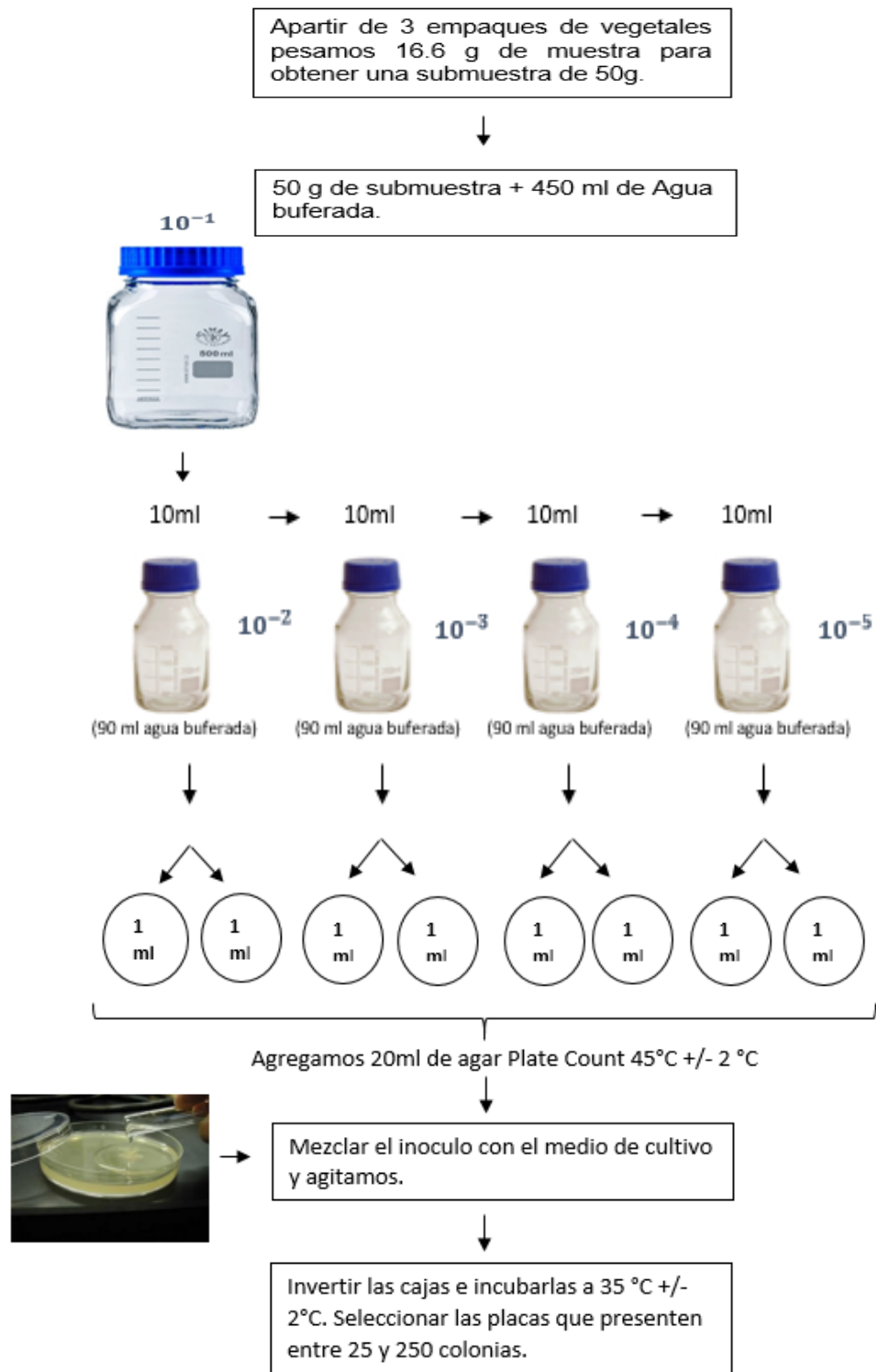
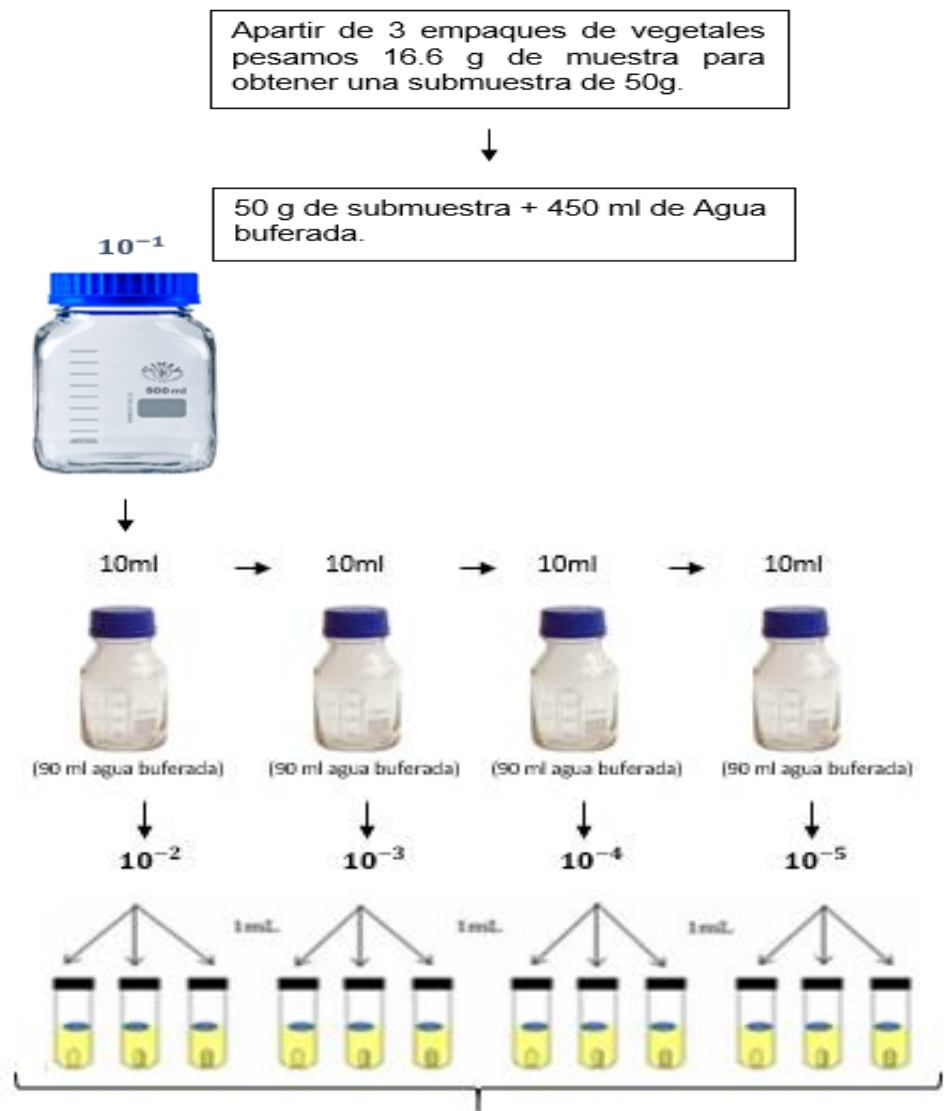


Figura 4. Determinación de aerobios mesófilos.

Fuente: FDA Bacteriological Analytical Manual (Maturín y Peeler 2001)

Elaboración: Autor



Cada tubo contiene 10 ml de caldo lauryl sulfato triptosa (LST) + 1 Disco colicomplete.

Coliformes totales
 Incubar a 35 °C por 48h. En muestras positivas verificar cambio de coloración.

E. coli
 En presencia de luz UV a 366 nm las muestras positivas son fluorescentes.



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

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

Elaboración: Autor

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calidad microbiológica de los alimentos hace referencia a alimentos sanos e inoocuos, estos deben presentar una baja carga microbiana y ausencia de determinadas especies. Según Maffei et al. (2013), existe la presencia de niveles elevados de aerobios mesófilos cuando hay materias primas contaminadas o tratamientos no satisfactorios desde el punto de vista sanitario. Ray & Bhunia (2010), menciona que puede existir niveles elevados de coliformes totales cuando hay manipulación no higiénica y/o almacenamiento inadecuado del producto. *Escherichia coli* es un microorganismo que tiene como hábitat natural el tracto intestinal del hombre y animales su presencia es un indicador de contaminación fecal (Denis et al. 2016).

3.1. Aerobios mesófilos

Los niveles de aerobios mesófilos reportados en esta investigación se encuentran entre 3,41 a 6,99 Log UFC/g (Ver Anexo B). La lechuga criolla es la única muestra que se encuentra dentro de los límites establecidos para aerobios mesófilos (Ver Tabla 3). (Barrantes et al. 2002, Rodríguez et al. 2015) evaluaron la calidad microbiológica en vegetales frescos, reportando valores de 5 y 5,78 Log UFC/g, resultados inferiores a los reportados en nuestro estudio. Autores como Maffei et al. (2013), reportan que la mayoría de las muestras analizadas en su estudio tuvieron un recuento entre 6 a 7 log UCF/g resultados similares a los reportados en este estudio. En contraste Gomes et al. (2012) en un estudio realizado en Brasil, reportaron valores de aerobios mesófilos en vegetales crudos, los cuales variaron de 6,48 a 8,08 Log UFC/g, 6,85 a 8.30 Log UFC/g y 4,35 a la 6.24 log UFC/g, resultados superiores a los nuestros. Según Begoña & Moragas (2016) valores superiores a 5.7 Log UFC/g indicaría que los alimentos son nocivos para el consumo humano, debido a que podría existir patógenos entéricos que pueden provocar enfermedades como cólera, fiebre tifoidea, amebiasis y hepatitis, algunos de estos con capacidad de sobrevivir por largos periodos en hortalizas frescas y ser resistentes a procesos de desinfección e incluso multiplicarse durante su almacenamiento (Rivera, 2009).

Tabla3. Recuento de aerobios mesofilos en vegetales empacados crudos.

Muestra	Promedio Log UFC/g
Lechuga Criolla	5,18 ± 0.89
Lechuga Romana	6,00 ± 0.42
Espinaca Americana	5.97 ± 0.72

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

Un estudio realizado en Vancouver concluye que las muestras de lechuga estudiadas dieron una media del recuento de aerobios mesófilos en 6,3 log UFC/g, valores superiores a las normativas de referencia e inferiores a los reportados en nuestro estudio (Wood et al. 2015). Los recuentos de aerobios mesófilos son útiles para indicar la duración de vida útil y la calidad microbiana de los alimentos, dado que estos vegetales se cultivan en el suelo y están expuestos a todo tipo de condiciones ambientales reflejando las condiciones en que se cultivan (Maffei et al. 2013).

3.2. Coliformes totales y *Escherichia coli*

Los niveles de coliformes totales reportados en este estudio se encuentran en un rango de 0.48 a >5.04 Log NMP/g resultados inferiores a los reportados por Amponsah et al. (2010), los cuales están entre 3.3 a 8.9 Log NMP/g para vegetales crudos, además se encontró en 6 muestras de espinaca y una muestra de lechuga romana recuentos >5.04 Log NMP/g (Ver Anexo C). Según Begoña & Moragas (2016) el valor máximo para coliformes totales es de 2.5 Log NMP/g, en base al promedio reportado en este estudio, se determinó que todas las muestras estudiadas supera este valor de referencia (Ver Tabla 4). Una investigación en Singapur realizada por Seow (2012) reportó un valor obtenido de coliformes totales en vegetales frescos en 4.2 Log NMP/g, este valor se encuentra dentro de nuestros niveles reportados, así mismo Halablab et al. (2011) reporta niveles de 0.71 a 2 Log NMP/g resultados inferiores a los nuestros. Wood et al. (2015) reportó valores de coliformes totales con una media de 1.9 Log NMP/g, además menciona que el 72% de sus muestras se encuentran dentro de los niveles normales, estos resultados se encuentran dentro del rango establecido por la normativa internacional y son inferiores a nuestros valores reportados.

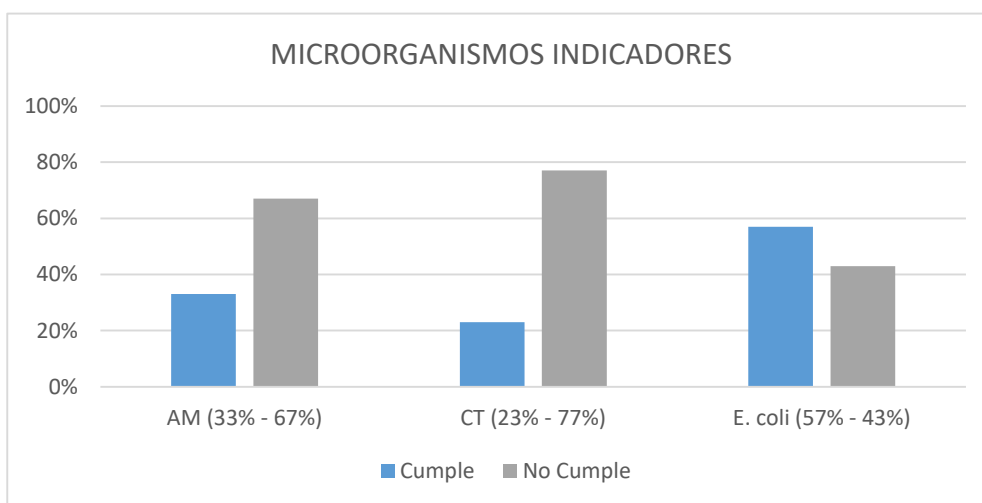
Tabla 4. Recuento de coliformes totales y *Escherichia coli* en vegetales empacados crudos.

Muestra	Coliformes totales Promedio Log NMP/g	<i>E. coli</i> positivas
Lechuga criolla	3,01 ± 1.48	2
Lechuga romana	2,98 ± 1.03	5
Espinaca americana	3,75 ± 1.20	6
	Total	13

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

Según Maffei et al. (2013), el grupo coliforme está ampliamente distribuido en la naturaleza y se encuentra comúnmente en verduras crudas, su presencia acciona los mecanismos de control de calidad y de procesamiento dentro de la planta de tratamiento de agua, e intensifica la vigilancia en la red de distribución además en su investigación reportan que la mayoría de las muestras tenían recuentos de 4 a 5 log NMP/g. La presencia de niveles elevados de coliformes totales en alimentos nos indica contaminación por inadecuada higienización y almacenamiento a temperaturas inadecuadas (Ray & Bhunia, 2010). Durante más de medio siglo se ha empleado el grupo coliforme como un indicador de grado de contaminación y por lo tanto de calidad sanitaria, la malas prácticas de agricultura y manufactura están implicados en niveles altos de este tipo de microorganismos (Vásquez & Cabral, 2001). Se detectó la presencia de *E. coli* en 13/30 correspondiente a un 43% (Ver Tabla 4). Según Begoña & Moragas (2016) debe haber ausencia de *Escherichia coli* en vegetales empacados. Wood et al. (2015), tras un estudio de control de calidad microbiológica reporta que 9/68 muestras de vegetales frescos resultaron positivas para *E. coli*, lo cual corresponde a un 13% de muestras contaminadas, así mismo Tango (2014), reporta que el 1.58% resultaron positivas, es decir 1/55 muestras. Maffei et al. (2013), en su estudio reporta la presencia de *E.coli* en 54/130 es decir se encontró en el 41,5% del total de muestras analizadas, la alta incidencia de este indicador en muestras de vegetales es de consideración, ya que esta es una de las verduras de hoja verde de mayor consumo en la población, considerándose como factor de riesgo para ETA.



Aerobios mesófilos (AM); Coliformes totales (CT); *Escherichia coli*.

Figura 6. Porcentaje de incumplimiento de microorganismos indicadores

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

Los resultados del presente estudio demostraron que 20 muestras sobrepasaron los límites establecidos para aerobios mesófilos representando un 67%, 23 muestras de coliformes totales representando un 77% y finalmente se detectó la presencia de 13 muestras de *Escherichia coli* que representa un 43% (Ver Figura 6). Faour et al. (2016), menciona que la presencia de estos microorganismos en los alimentos puede ser motivo de inadecuadas condiciones de transporte y almacenamiento siendo riesgo de contaminación cruzada, hay que poner énfasis en el desarrollo de políticas estrictas sobre el control de la seguridad de las fuentes de agua y en la aplicación de buenas prácticas agrícolas y buenas prácticas de higiene en etapas primarias de producción, lavado, transporte y almacenamiento, por otra parte Barrantes et al. (2012), menciona que niveles elevados de coliformes totales en alimentos, implicaría un riesgo potencial en la salud del consumidor actuando como posible fuente de transmisión de enfermedades alimentarias. En nuestro estudio se detectó la presencia de *E. coli* en 13 muestras. Maffei et al. (2013), indica que *E. coli* es el mejor indicador de contaminación fecal, ya que se encuentran exclusivamente en el tracto digestivo de hombres y animales, utilizándose con frecuencia para el control de la calidad sanitaria de los alimentos. Una amplia gama de alimentos pueden ser vehículo para *E.coli* patógena, los alimentos pueden contaminarse de manera directa o por contaminación cruzada durante el crecimiento y cultivo, se puede producir una contaminación adicional durante la manipulación poscosecha, transporte, elaboración y manipulación no higiénica de alimentos durante su preparación, los factores que contribuyen a la persistencia de *E. coli* en los alimentos incluyen el almacenamiento a altas temperaturas y la manipulación no higiénica, factores que permiten el crecimiento de estas bacterias (FAO, 2011). La calidad microbiológica de vegetales empacados se evaluó en base a normas internacionales, debido a que en Ecuador no existe una legislación o normativa para este tipo de productos que nos permitan verificar los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES

- El recuento de Aerobios mesófilos estuvo entre 3,41 a 6,99 Log UFC/g, Coliformes totales entre 0.48 a 5.04 Log NMP/g y se detectó la presencia de *Escherichia coli* en 13 muestras.
- El 67% de las muestras no cumplen el requisito normativo para el recuento aeróbico, el 77% para Coliformes totales y el 43% para *Escherichia coli*; por lo que son catalogadas como no aptos para el consumo.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda aislar las muestras confirmadas de *E.coli*, para realizar estudios para posibles patógenos entéricos como por ejemplo *E.coli* enterohemorrágica.
- Se recomienda aislar muestras de coliformes totales que superaron los niveles normales, debido a que este indicador abarca un grupo amplio de microorganismos, donde se podría comprobar la presencia específica y el origen etiológico de la contaminación.
- Debido a la elevada existencia de microorganismos indicadores en vegetales crudos se recomienda desinfectar correctamente los mismos antes de ser consumidos, debido a que pueden ser un posible riesgo potencial para la salud del consumidor.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. (2000). *Escherichia coli. Official Method Confirmed Total Coliform and Escherichia Coli in All Foods, 988*(June). Retrieved from http://www.agrinea.com/fileadmin/user_upload/ColiComplete_AOAC_Official_Method__992.30.pdf
- Amponsah, F., Obiri-Danso, K., Abaidoo, R. C., Andoh, L. A., Drechsel, P., & Kondrasen, F. (2010). Bacterial contamination of lettuce and associated risk factors at production sites, markets and street food restaurants in urban and peri-urban Kumasi, Ghana, *5*(2), 217–223. Retrieved from <http://www.academicjournals.org/journal/SRE/article-full-text-pdf/E0D73FE16860>
- Association of Official Analytical Chemists. (2005). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (Vol. 534). W. Horwitz (Ed). Arlington, VA, Washington DC: AOAC
- Barrantes, K., Achí, R., Bolaños, S., Cerdas, M., & Cortés, X. (2002). Calidad microbiológica y aislamiento de *Shigella flexneri* en vegetales frescos del Área Metropolitana de Costa Rica, 2001-2002. *Avances en Seguridad Alimentaria y Nutricional*.
- Begoña, P., & Moragas, M. (2016). Normas Microbiológicas de los Alimentos. *Elikagaien Arau Mikrobiologikoak*, 55. Retrieved from http://www.higieneambiental.com/sites/default/files/images/pdf/normas_microbiologicas_de_alimentos_2016_.pdf
- Bejarano, N., & Carrillo, L. (2007). Frutas y Hortalizas. *Manual de Microbiología de Los Alimentos*, (5), 71–83. Retrieved from http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/7_frutas_y_hortalizas.pdf
- Cámara de Comercio de Bogotá. (2015). Manual: Espinaca, 52. Retrieved from <http://hdl.handle.net/11520/14310>
- Denis, N., Zhang, H., Leroux, A., Trudel, R., & Bietlot, H. (2016). Prevalence and trends of bacterial contamination in fresh fruits and vegetables sold at retail in Canada. *Food Control*, *67*, 225-234.

- Díaz, A., & Uría, R. (2009). *Programa Interamericano para la Promoción del Comercio, los Negocios Agrícolas y la Inocuidad de los Alimentos*. Retrieved from <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A5294e/A5294e.pdf>
- Difco & BBL. (2010). Lauryl Sulfate Broth Lauryl Tryptose Broth with MUG Lauryl Sulfate Broth with MUG. *Public Health*, 296–297.
- FAO. (2009). Alimentos Sanos y Seguros. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 4(2), 18. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/014/am401s/am401s05.pdf>
- FAO. (2011). Prevención de la E.coli en los alimentos. *El Marco de Gestión de Crisis Para La Cadena Alimentaria (FCC)*, 0–15. Retrieved from http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf
- FAO. (2012). *Manual de Buenas Prácticas Agrícolas para el Productor Hortofrutícola*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-as171s.pdf>
- Faour-Klingbeil, D., Murtada, M., Kuri, V., & Todd, E. C. (2016). Understanding the routes of contamination of ready-to-eat vegetables in the Middle East. *Food Control*, 62, 125-133.
- Feng, P., Weagant, S. D., Grant, M. A., Burkhardt, W., Shellfish, M., & Water, B. (2002). BAM: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. *Bacteriological analytical manual*, 13.
- Ginestre, M., Romero, S., Rincón, G., Castellano, M., Ávila, Y., López, G., & Perozo, A. (2009). Indicadores entéricos en vegetales frescos que se comercializan en mercados populares de Maracaibo. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 52–56. Retrieved from <http://www.scielo.org.ve/pdf/rsvm/v29n1/art11.pdf>
- Gomes, J., Lucena Pessoa, R. M., Barbosa Nunes Queiroga, I. M., Magnani, M., de Sousa Freitas, F. I., de Souza, E. L., & Maciel, J. F. (2012). Bacterial counts and the occurrence of parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) from different cropping systems in Brazil. *Food Control*, 28(1), 47–51. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.033>
- Halablab, M., Sheet, I., & Holail, H. (2011). Halablab 2011 coliformes resultados.pdf. *American Journal Of Food Technology*, 12. Retrieved from <http://docsdrive.com/pdfs/academicjournals/ajft/2011/129-139.pdf>
- INEN. (1994). Norma técnica Ecuatoriana Obligatoria: Hortalizas Frutas Frescas y Muestreo. NTE INEN 1750. 17p. Disponible en: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1750.1994.pdf>

- 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. Disponible en: <http://normaspdf.inen.gob.ec/pdf/nte1/1529-2-1R.pdf>
- ISO 22000. (2005). Sistema de gestión de inocuidad de los alimentos: Requisitos para cualquier organización en la cadena alimentaria. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:22000:ed-1:v1:en>
- Kim, M. J., Moon, Y., Tou, J. C., Mou, B., & Waterland, N. L. (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 49, 19–34. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.03.004>
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., & Gutiérrez, G. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>
- Maffei, D. (2013). Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil q. *Food Control*, 29(1), 226–230. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.013>
- Matrurín, L. y Peeler, J. (2001). Bacteriological Analytical Manual: Aerobic Plate Count (on line). Estados Unidos, FDA. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>
- Merck. (2012). Plate Count Agar (Casein-peptone Dextrose Yeast Agar). *Microbiology Manual*. 12th Edition, 933(1978), 70152.
- OMS. (2012). Cinco claves para cultivar frutas y hortalizas más seguras : promover la salud mediante la disminución de la contaminación microbiana, p. 40. Ginebra, Suiza. Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75960/1/9789243504001_spa.pdf
- OPS/OMS. (2005). Situación de Salud Ecuador. *Sirveta*. Retrieved from [http://www.alimentosecuador.com/descargas/bt4be80e89c9036_Inocuidad de los alimentos.pdf](http://www.alimentosecuador.com/descargas/bt4be80e89c9036_Inocuidad_de_los_alimentos.pdf)
- Pefaur. (2014). Diciembre de 2014. *Oficina de Estudios Y Políticas Agrarias*. Retrieved from http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1418325564AgroindustrialVGama.pdf
- Pighín G, A. F., & Rossi de R, A. L. (2010). Espinaca Fresca, Supercongelada Y En Conserva: Contenido De Vitamina C Pre Y Post Cocción. *Revista Chilena de Nutrición*, 37(2), 201–207. <http://doi.org/10.4067/S0717-75182010000200009>

- Ray, B., & Bhunia, A. (2010). Fundamentos microbiológicos de los alimentos. *Editorial McGraw Hill, México*, 18.
- Renaloea. (2014). *Microorganismos indicadores* (Vol. 3). Retrieved from http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_II.pdf
- Rivera-jacinto, M. A., & Ulloa, C. R. (2009). Fecal contamination in green vegetables that are sold in markets of Cajamarca City , Peru, (December 2008). Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Marco_Rivera-Jacinto/publication/286682758_Fecal_contamination_in_green_vegetables_that_are_sold_in_markets_of_Cajamarca_City_Peru/links/568b544708ae1e63f1fc0fcc.pdf
- Rodriguez, M., Estrella, M., Solano, M., Lozano, D., Torrico, F., & Torrico, M. (2015). Evaluación de la contaminación microbiológica de la lechuga (, 38(2), 31–36. Retrieved from http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1012-29662015000200006&script=sci_arttext
- Rozano, V., Guevara, L. De, Santiago, C. Q., Carlos, J., Pulido, A., Adrián, L., ... Ramírez, Q. (2004). Hortalizas, las llaves de la energía, 30. <http://doi.org/ISSN:1067-6079>
- Rushing, J. (2012). Mejorando la Seguridad y Calidad de Frutas y Hortalizas Frescas : Un Manual de Capacitación para los Capacitadores, 320. Retrieved from <http://jifsan.umd.edu/docs/gaps/es/Manual Completo.pdf>
- Seow, J. Ágoston, R. Phua, L. Yuk, H. et al. (2012). Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. *Food Control*, 25(1), 39–44. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.017>
- Tango, C. N., Choi, N. J., Chung, M. S., & Oh, D. H. (2014). Bacteriological quality of vegetables from organic and conventional production in different areas of Korea. *Journal of Food Protection*®, 77(8), 1411-1417.
- Vásquez, J., & Cabral, A. (2001). La inocuidad alimentaria, realidad y reto mundial. *Food, Nutrition and Agriculture*, 64. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/003/y0600m/y0600m02.htm>
- Wood, J. L., Chen, J. C., Friesen, E., Delaquis, P., & Allen, K. J. (2015). Microbiological survey of locally grown lettuce sold at farmers' markets in Vancouver, British Columbia. *Journal of Food Protection*®, 78(1), 203-208.

ANEXOS

ANEXO A. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

A1. Agua buferada

- Preparación de solución stock: Disolver 34.0 g de KH_2PO_4 (Fosfato de potasio monobásico) en 500ml 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 solución para dilución: Diluir 1.25 de la solución stock en 1L con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

A2. Caldo Lauryl Sulfato Triptosa (LTS)

- Se pesó 35.6 g de LTS y se diluyó en 1L de agua destilada. Luego se colocó 10ml en tubos de ensayo y se autoclavó por 15 minutos a 121 °C.

A3. Agar Plate Count (APC)

- Se pesó 23.5 g de APC y se diluyó en 1L de agua destilada, se calentó hasta obtener una apariencia transparente y se autoclavó por 15 minutos a 121 °C.

ANEXO B. RESULTADOS DE AEROBIOS MESÓFILOS

Tabla 5. Cuadro de resultados de aerobios mesófilos.

MUESTRA	NUMERO DE MUESTREO	DILUCIÓN				PROMEDIO	UFC/ml	LOG UFC/G
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵			
Lechuga Criolla	1	225	82	14	6	229	22900	4,36
		233	98	16	2			
	2	273	26	25	4	27	270000	5,43
		223	22	29	2			
	3	385	92	12	0	99	99000	5,00
		407	106	16	0			
	4	76	45	28	6	101	101000	5,00
		69	56	19	9			
	5	172	84	18	2	88	88000	4,94
		334	92	13	0			
6	TNC	482	189	0	152	1520000	6,18	
	364	286	115	0				
7	382	131	27	17	161,5	162000	5,21	
	214	192	19	22				
8	233	195	115	123	121,5	1220000	6,08	
	229	210	128	134				
9	26	17	11	6	25,5	2600	3,41	
	25	13	15	3				
10	TNC	255	112	42	97,5	970000	5,99	
	TNC	232	83	53				
PROMEDIO TOTAL								5,18 ± 0.89
MUESTRA	NUMERO DE MUESTREO	DILUCIÓN				PROMEDIO	UFC/ml	LOG UFC/G
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵			
Lechuga Romana	1	TNC	219	143	0	137,5	1375000	6,14
		233	216	132	0			
	2	TNC	239	189	5	181	1810000	6,26
		TNC	241	173	10			
	3	TNC	TNC	144	83	132,5	1325000	6,12
		TNC	281	121	95			
	4	TNC	104	15	0	111,5	112000	5,05
		TNC	119	0	0			
	5	TNC	TNC	32	316	29,5	295000	5,47
		TNC	TNC	27	280			
6	TNC	215	108	56	112,5	1125000	6,05	
	TNC	227	117	44				
7	TNC	TNC	161	53	172	1720000	6,24	
	TNC	TNC	183	44				
8	TNC	TNC	163	0	155,5	1555000	6,19	
	TNC	348	148	0				
9	TNC	TNC	244	181	253,5	2540000	6,40	
	TNC	TNC	263	195				
10	TNC	244	136	0	129,5	1300000	6,11	
	315	228	123	0				
PROMEDIO TOTAL								6 ± 0.42

Tabla 5. (Continuación)

MUESTRA	NUMERO DE MUESTREO	DILUCIÓN				PROMEDIO	UFC/ml	LOG UFC/G
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵			
Espinaca americana	1	TNC	TNC	230	80	223	2230000	6,35
		TNC	TNC	216	92			
	2	TNC	TNC	122	0	118	1180000	6,07
		TNC	246	114	0			
	3	TNC	TNC	TNC	108	97,5	9750000	6,99
		TNC	TNC	TNC	87			
	4	TNC	TNC	183	53	165,5	1655000	6,22
		TNC	TNC	148	83			
	5	TNC	TNC	183	63	175	1750000	6,24
		TNC	TNC	167	42			
6	TNC	185	113	73	105	1050000	6,02	
	235	167	97	64				
7	TNC	TNC	171	79	163,5	1635000	6,21	
	TNC	TNC	156	TNC				
8	TNC	191	156	65	149	1490000	6,17	
	TNC	TNC	142	87				
9	TNC	32	0	0	29,5	29500	4,47	
	184	27	5	0				
10	TNC	84	TNC	44	88,5	88500	4,95	
	TNC	93	56	TNC				
PROMEDIO TOTAL								5.97 ± 0.72

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

CÁLCULO DE AEROBIOS MESÓFILOS

Ejemplo en el muestreo 1 (Lechuga criolla), dilución 10^{-2} .

- **Datos:**

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

R1: Recuento de la primera placa.

R2: Recuento de la segunda placa (duplicado)

FD: Factor de dilución.

Z: Total de unidades formadoras de colonias / g

- **Cálculos**

$$R1 * FD = 225 (10^{-2})$$

$$= 225 * 100$$

$$= 22500 \text{ UFC/g}$$

$$R1 * FD = 233 (10^{-2})$$

$$= 233 * 100$$

$$= 23300 \text{ UFC/g}$$

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

$$Z = \frac{22500 + 23300}{2}$$

$$Z = 22900 \text{ UFC/g}$$

Log 22900 UFC/g

4.36 Log UFC/g

ANEXO C. RESULTADOS DE COLIFORMES TOTALES

Tabla 6. Cuadro de resultados de coliformes totales.

MUESTRA	NUMERO DE MUESTREO	DILUCIÓN				NMP/g	LOG NMP/g
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		
Lechuga romana	1	3	3	0	0	2400	3,38
	2	0	0	1	0	300	2,48
	3	2	1	0	0	150	2,18
	4	3	1	0	0	430	2,63
	5	3	3	3	3	>110000	>5,04
	6	3	0	0	0	230	2,36
	7	3	3	0	0	2400	3,38
	8	0	0	0	0	30	1,48
	9	3	3	3	0	24000	4,38
	5	3	2	3	3	36000	4,56
PROMEDIO TOTAL							2,98 ± 1.03

MUESTRA	NUMERO DE MUESTREO	DILUCIÓN				NMP/g	LOG NMP/g
		10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶		
Lechuga Criolla	1	3	3	0	0	24000	4,38
	2	0	0	0	0	3	0,48
	3	0	0	0	0	3	0,48
	4	3	0	0	0	2300	3,36
	5	3	0	0	0	2300	3,36
	6	3	3	3	1	46000	4,66
	7	3	2	0	0	930	2,97
	8	3	0	0	0	2300	3,36
	9	3	3	0	0	24000	4,38
	10	3	1	0	0	430	2,63
PROMEDIO TOTAL							3,01 ± 1.48

Tabla 6. (Continuación)

MUESTRA	NUMERO DE MUESTREO	DILUCIÓN				NMP/g	LOG NMP/g
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		
Espinaca Americana	1	3	3	3	2	110000	5,04
	2	2	3	3	3	>110000	>5,04
	3	3	3	3	3	>110000	>5,04
	4	3	3	3	3	>110000	>5,04
	5	3	3	3	3	>110000	>5,04
	6	3	3	3	3	>110000	>5,04
	7	3	3	3	3	>110000	>5,04
	8	1	3	3	0	24000	4,38
	9	3	0	0	0	230	2,36
	10	3	1	3	3	1600	3,20
PROMEDIO TOTAL							3.75 ± 1,20

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

CÁLCULO DE COLIFORMES TOTALES

Ejemplo en el muestreo 9 (Lechuga romana), diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .

- Se registra el número de tubos positivos encontrados en cada dilución como se indica en el cuadro siguiente, tomando en cuenta 3 diluciones representativas.

10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
3	3	0



3 / 3 / 0

- Se busca en la tabla de NMP/g (Ver tabla 8) en las columnas señaladas como 0.1, 0.01, 0.001, la serie correspondiente a **3 / 3 / 0**, y en la columna del NMP/g se escoge el valor correspondiente a bacterias coliformes NMP/g, el valor obtenido es de **240**.
- Luego de tener el valor multiplicamos por su correspondiente factor de NMP/g (Ver tabla 2), el factor adecuado para las diluciones (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) es **100**.

$$240 * 100 = 24000 \text{ NMP/g}$$

Log 24000 NMP/g

4.38 Log NMP/g

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

Tabla 7. Tabla de número más probable (NMP) por mL/g de muestra.

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	–

Fuente: Official Methods of Analysis of AOAC International, 18 ed. 2005.

Elaboración: AOAC International.

ANEXO D. RESULTADOS DE *ESCHERICHIA COLI*.

Tabla 8. Cuadro de Presencia/Ausencia de *E. coli*.

NUMERO DE MUESTREO	Muestra		
	Lechuga criolla	Lechuga romana	Espinaca americana
1	Ausencia	Presencia	Ausencia
2	Ausencia	Ausencia	Presencia
3	Ausencia	Ausencia	Presencia
4	Presencia	Ausencia	Ausencia
5	Ausencia	Presencia	Ausencia
6	Ausencia	Presencia	Ausencia
7	Presencia	Presencia	Presencia
8	Ausencia	Presencia	Presencia
9	Ausencia	Ausencia	Presencia
10	Ausencia	Ausencia	Presencia

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

ANEXO E. PORCENTAJE DE INCUMPLIMIENTO DE MICROORGANISMOS INDICADORES

Tabla 9. Porcentaje de muestras que incumplieron los rangos establecidos por normativas internacionales

Microorganismo Indicador	Cumplen	No cumplen	Porcentaje de incumplimiento
Aerobios Mesófilos	10	20	67%
Coliformes Totales	7	23	77%
<i>Escherichia coli.</i>	17	13	43%

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

ANEXO F. LÍMITES ESTABLECIDOS PARA MICROORGANISMOS INDICADORES

Tabla 10. Normas microbiológicas para vegetales empacados..

MICROORGANISMO	LIMITE MAXIMO	NORMA
Aerobios Mesófilos	5 x 10 ⁵ UFC/ g (5.7 Log UFC/g)	Begoña & Moragas, 2016
Coliformes Totales	3 x 10 ² NMP/g (2.5 Log NMP/g)	Begoña & Moragas, 2016
<i>Escherichia coli.</i>	Ausencia	NTS N° MINSA/DIGESA-V.01.

Fuente: (Begoña & Moragas, 2016)

Elaboración: Autor

**ANEXO G. COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA EL
RECuento DE MICROORGANISMOS INDICADORES**

Tabla 11. Composición de medios de cultivo

CALDO LAURYL SULFATO TRIPTOSA		Instrucciones
Fórmula (en gramos por litro)		
Triptosa	20.0	Suspender 35,6 g del polvo en 1 L de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos. Calentar a ebullición hasta la disolución total. Distribuir en tubos conteniendo tubos de fermentación. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.
Lactosa	5.0	
Cloruro de sodio	5.0	
Lauryl sulfato de sodio	0.1	
Fosfato dipotásico	2.75	
Fosfato monopotásico	2.75	
pH final: 6.8 ± 0.2		
AGAR PLATE COUNT		Instrucciones
Fórmula (en gramos por litro)		
Caseína	5	Suspender 23,5 g del polvo en 1 L de agua purificada. Mezclar a fondo y calentar con agitación, se deja hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Finalmente Autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.
Extracto de levadura	2.5	
Dextrosa	1.0	
Agar	15.0	
pH final: 7.0 ± 0.2		
DISCOS COLICOMPLETE		
<p>Fácil de leer e interpretar visualmente los resultados basados en reacciones enzimáticas específicas. Resultados de E. coli en 28 horas y Coliformes totales en 48 horas. Discos listos para usar, diseñados para su uso con tubos de 10 ml de caldo Lauryl sulfato en el método de número más probable.</p>		

Fuente: Merck Microbiology Manual 12th Edition, Difco™ & BBL™ Manual, 2nd Edition, ColiComplete (AOAC Official Method)

Elaboración: Autor