



**DEPARTAMENTO DE POSGRADOS**  
**MAESTRIA EN GESTION DE LA CALIDAD Y**  
**SEGURIDAD ALIMENTARIA**

***“Incidencia de coliformes /E.coli y Listeria spp. en lechuga variedad criolla expandida en los mercados, ferias agroecológicas y supermercados de la ciudad de Cuenca frente a soluciones desinfectantes de uso casero”***

**TRABAJO DE GRADUACION PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TITULO**  
**“MAGISTER EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD**  
**ALIMENTARIA”**

**AUTOR: MALENA ELIZABETH HERRERA ARCENTALES**

**DIRECTOR: RENÉ TEJEDOR ARIAS**

**CUENCA- ECUADOR**

**2015**

## **DEDICATORIA**

Gracias Señor, por haberme dado la vida, salud, fuerza y perseverancia para culminar esta meta propuesta.

A mi esposo amado apoyo incondicional en cada etapa de mi vida sin su comprensión, apoyo y ayuda no hubiera sido posible terminar esta etapa.

A mi hijos queridos: Vanna, Stephanie, Xiomara y Joel mis 4 tesoritos motores de mi vida y fuerza para seguir adelante.

A mi madre por su ánimo constante para poder culminar esta meta.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco al personal de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay por su apertura y ayuda para culminar esta meta.

Al Dr. René Tejedor mi Director de tesis por la asesoría, paciencia y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A la Ing. María Fernanda Rosales responsable del Laboratorio de Microbiología de la Universidad del Azuay por su tiempo, apoyo incondicional y gran apertura en la realización de este proyecto.

## RESUMEN

En la presente investigación se realizaron tres estudios paralelos en los cuales se determinó la incidencia de *E.coli*/coliformes y *Listeria spp.* en lechuga variedad criolla de mercados, supermercados y ferias agroecológicas utilizándose placas Compact dry para *E.coli*/coliformes y el método ANSR para *Listeria spp.* Se evaluó la acción germicida de desinfectantes (test de Chambers) de uso casero in vivo e in vitro, para lo cual se aplicó un antibiograma e inoculación de cepas ATCC de patógenos en lechuga fresca y la aplicación de los desinfectantes para medir por recuento en placa su efectividad. Posteriormente se realizó el control de los desinfectantes en lechugas frescas a partir de su contaje real en placa.

El 3% de las muestras recolectadas (mercados) superan los límites normativos con respecto a *E. coli* ( $\geq 10^2$  UFC/g) y el 37 % tuvieron una mayor incidencia de coliformes totales ( $>10^3$  UFC/g). *Listeria spp.*, se encontró en dos muestras. El desinfectante más efectivo in vitro y por inoculación fue la solución cítrica comercial (0,33%v/v) por 5 minutos, in vivo sobre la flora bacteriana normal de las lechugas los desinfectantes logran una buena reducción de las cargas microbianas.

### Palabras claves:

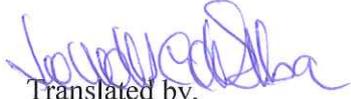
*E.coli*/coliformes, *Listeria spp.*, desinfectantes caseros, Chambers, lechuga.

## ABSTRACT

This research presents three parallel studies in which the incidence of *E. coli* / coliform and *Listeria* spp were determined in Creole (Iceberg) lettuce variety found in markets, supermarkets and agro-ecological fairs. Compact dry plates for *E. coli* / coliforms and ANSR method were used for *Listeria* spp. The germicidal action of disinfectants for domestic use (Chambers test) was evaluated in-vivo and in-vitro, for which an antibiogram and inoculation of ATCC pathogen strains was applied in fresh lettuce. The application of disinfectants by plate count to measure its effectiveness was also assessed. Subsequently, the control of disinfectants used in fresh lettuce from its actual plate count was performed. 3% of the samples collected (in markets) exceed the regulatory limits on *E. coli* ( $\geq 10^2$  CFU / g). 37% had a higher incidence of total coliforms ( $> 10^3$  CFU / g). *Listeria* spp was found in two samples. The most effective in-vitro and inoculation disinfectant was the commercial Citrus solution (0.33% v / v) used for 5 minutes in vivo testing on the lettuce normal bacterial flora. Therefore, the disinfectants succeed in reducing the microbial loads.

**Keywords:** *E. Coli* / Coliform, *Listeria* Spp, Household Disinfectants, Chambers, Lettuce.



  
Translated by,  
Lic. Lourdes Crespo

## INDICE

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTO .....	iii
RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I	
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Sitio y Objeto de estudio.....	8
1.1. Población de estudio, muestreo y tamaño de muestra.....	8
1.2. Recolección y transporte de muestras.....	9
1.3. Metodología y normas utilizadas .....	9
1.3.1. Normativas de la contaminación microbiológica de lechugas.....	9
1.3.2. Métodos generales para la determinación de <i>E. coli/ coliformes</i> y <i>Listeria spp.</i> .....	10
1.3.3. Método para la evaluación de la efectividad de las soluciones desinfectantes comerciales frente a <i>E. coli/ coliformes</i> y <i>Listeria spp.</i> .....	10
1.4. Preparación de medios de cultivo.....	10
1.5. Procesamiento de las muestras.....	10
1.5.1. Preparación de las lechugas .....	10
1.6. Análisis microbiológico de Coliformes/ <i>E.coli.</i> .....	11
1.6.1. Diagrama de Flujo del análisis microbiológico para <i>E.coli/coliformes.</i> .....	11
1.7. Análisis para <i>Listeria spp.</i> .....	11
1.7.1. Procedimiento para el estudio por el método ANSR (Neogen Corp)..	12
1.7.2. Diagrama de flujo del método ANSR .....	13
1.8. Análisis de la Evaluación de la eficacia de las soluciones desinfectantes. .....	14
1.8.1. Prueba in vitro .....	15
1.8.1.1. Diagrama de flujo sobre método de inhibición (antibiograma) o antagonismo en placa .....	16
1.8.2. Prueba in vivo por inoculación .....	16
1.8.2.1. Diagrama de flujo de prueba de inoculación .....	17
1.8.3. Prueba in vivo (lechuga con contaminación real) .....	18
1.8.4. Análisis sensorial de los desinfectantes de lechuga .....	18
CAPÍTULO 2	
RESULTADOS	
2.1. Lugares de procedencia .....	19
2.2. Contaminación microbiológica de las lechugas .....	19

2.2.1. Resultados del análisis microbiológico <i>E.coli/coliformes</i> (compact dry EC).	19
2.3. Resultados del análisis de <i>Listeria spp.</i> .....	29
2.4. Resultados de efectividad de los desinfectantes comerciales frente a <i>Listeria spp.</i> y <i>E.coli</i> .....	30
2.4.1. Análisis in vitro por antagonismo en placa.....	30
2.4.2. Efectividad de los tratamientos frente a inoculación de <i>E.coli</i> y <i>Listeria spp</i>	31
2.4.3. Efectividad de los tratamientos in vivo (lechuga con contaminación real) ...	33
2.4.4. Análisis sensorial del producto post tratamiento con desinfectantes comerciales .....	35
 CAPÍTULO 3	
DISCUSIÓN .....	36
 CONCLUSIONES .....	40
RECOMENDACIONES .....	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
REFERENCIAS ELECTRÓNICAS .....	45
ANEXOS .....	46

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Mecanismos de acción anti microbiana de extractos vegetales en la célula .....	5
FIGURA 2. Acidificación del Citoplasma .....	5
FIGURA 3. Kit No. 9821 utilizado en la prueba y software de ANSR .....	11
FIGURA 4. Mecanismo de acción de ANSR en la amplificación del ADN .....	12
FIGURA 5. Muestra positiva de <i>Listeria spp.</i> .....	13
FIGURA 6. Muestra negativa de <i>Listeria spp.</i> .....	14
FIGURA 7. Muestra inválida de <i>Listeria spp.</i> .....	14
FIGURA 8. Lechuga cortada en trozos de 5x5 .....	16
FIGURA 9. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y <i>E. coli</i> en lechugas recolectadas del mercado 12 de Abril .....	20
FIGURA 10. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y <i>E. coli</i> en lechugas recolectadas del mercado Feria Libre.....	20
FIGURA 11. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y <i>E. coli</i> en lechugas recolectadas del mercado 10 de agosto .....	21
FIGURA 12. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y <i>E. coli</i> en lechugas recolectadas del mercado 9 de octubre .....	21
FIGURA 13. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y <i>E. coli</i> en lechugas recolectadas de la Feria Agroecológica 12 de Abril .....	22
FIGURA 14. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y <i>E. coli</i> en lechugas recolectadas de la Feria Agroecológica Feria Libre .....	22
FIGURA 15. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y <i>E. coli</i> en lechugas recolectadas de la Feria Agroecológica del Consejo Provincial.....	23
FIGURA 16. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y <i>E. coli</i> en lechugas recolectadas de la Feria Agroecológica de Tototacocha .....	23
FIGURA 17. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y <i>E. coli</i> en lechugas recolectadas del Supermercado Comisariato Popular .....	24
FIGURA 18. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y <i>E. coli</i> en lechugas recolectadas del Supermercado Gran Sol .....	24
FIGURA 19. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y <i>E. coli</i> en lechugas recolectadas del Supermercado Santa Cecilia.....	25
FIGURA 20. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y <i>E. coli</i> en lechugas recolectadas del Supermercado Coral Hipermercados .....	25
FIGURA 21. Curvas de Control y Resultados positivos y negativos por el método de ANSR para <i>Listeria spp.</i> en lechuga recolectada de los mercados .....	29

FIGURA 22. Curvas de Control y Resultados positivos y negativos por el método de ANSR para <i>Listeria spp.</i> en lechuga recolectada de las Ferias Agroecológicas .....	30
FIGURA 23. Resultados de apreciación general a 30 jueces no entrenados .....	35

### INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Composición y concentraciones utilizadas de los desinfectantes comerciales de uso casero .....	15
TABLA 2. Porcentajes de contaminación de coliformes totales y <i>E.coli</i> de mercados, supermercados y ferias agroecológicas .....	26
TABLA 3. Medias muestrales intra grupo e inter grupo .....	27
TABLA 4. Tabla de análisis de varianza generalizada respecto a la contaminación con coliformes .....	27
TABLA 5. Tabla de Análisis de varianza generalizada (Ferias Agroecológicas) ...	27
TABLA 6. Tabla de Análisis de varianza generalizada (Supermercados) .....	28
TABLA 7. Tabla de Análisis de varianza generalizada (Mercados, Supermercados y Ferias Agroecológicas) .....	28
TABLA 8. Resultados de la prueba de inhibición de los desinfectantes frente a las bacterias patógenas .....	31
TABLA 9. Resultados de las pruebas in vivo en lechugas inoculadas con bacterias patógenas .....	32
TABLA 10. Resultados de las pruebas con la flora bacteriana normal de las lechugas frente a <i>Ecoli</i> /coliformes .....	34

Herrera Arcentales Malena Elizabeth

Trabajo de Graduación

Tejedor Arias René C.

Septiembre, 2015

**“Incidencia de coliformes/E.coli y *Listeria spp.* en lechuga variedad criolla expandida en los mercados, ferias agroecológicas y supermercados de la ciudad de Cuenca frente a soluciones desinfectantes de uso casero”**

## **INTRODUCCIÓN**

La lechuga es un vegetal de gran consumo en el mercado. Es la base de la mayoría de las ensaladas que se consume en los hogares y lugares en donde se expenden comidas, al ser consumida cruda puede llevar consigo contaminantes bacterianos patógenos causantes de las Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), provenientes de la tierra, aire o agua utilizada en su cultivo así como la forma de cosecha, el transporte y la comercialización de las mismas.

En nuestro país existen 1145 ha. de lechuga, con un rendimiento de 7928 Kg/ha, según el Ministerio de Agricultura de la producción total, el 70% del mercado corresponde a lechuga criolla, mientras el 30% son de variedades como la roja y la roma o salad (Tenesaca, 2010). Así la lechuga criolla o repollo es la elegida por los ecuatorianos (Tixilema, 2015) razón por la cual ha sido considerada en este estudio.

La falta de inocuidad y seguridad de los alimentos tanto en la producción y manipulación de los mismos es una de las razones de la proliferación de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) al existir ya contaminación, muchos microorganismos patógenos pueden sobrevivir periodos prolongados de tiempo en las frutas y hortalizas frescas así como resistir procesos de desinfección e incluso multiplicarse en el producto durante el almacenamiento (Pachuca, 2006), con graves repercusiones en la salud pública puesto que causa la muerte de una gran cantidad de personas a nivel mundial produciendo un gran impacto incluso en la economía sobre todo en países latinoamericanos puesto que una buena parte de sus ingresos provienen de exportaciones de productos agrícolas como frutas y hortalizas (Socco, 2004) .

Algunos de los microorganismos que se han asociado a las ETA son *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. Debido a su ubicuidad e incidencia, estas bacterias, se han convertido actualmente en el blanco de acción de muchos de los sistemas de aseguramiento de la calidad en industrias alimentarias y ha conducido a la búsqueda de nuevas alternativas para su inhibición y eliminación (Ocares, 2012). Según el Anuario de vigilancia

Epidemiológica 1994ñ-2014 del Ecuador el número total de casos de ETA en el 2014 es de 542 569 y la tasa es de 111 358, mientras que en la provincia del Azuay es de 29 717 casos con una tasa de 3732,5 (Granda, 2014).

Por otro lado existe una gran variedad de productos de uso doméstico e institucional, destinados a reducir la carga microbiana de los vegetales y frutas. Entre ellos se encuentran derivados de amonio cuaternario, extractos naturales, algunos ácidos como cítrico y especialmente el peracético, cuya efectividad ya ha sido evaluada demostrando su mayor eficacia germicida frente al extracto de semillas de pomelo, aunque no han alcanzado el 99,999% de destrucción considerado como adecuado en un buen proceso de desinfección (López, Romero, & Ureta, 2001).

Por lo expuesto anteriormente y en vista de que la microbiota de los vegetales frescos varía ampliamente y refleja las condiciones de cultivo, así como, las condiciones sanitarias durante el procesamiento y comercialización, se ha visto necesaria la evaluación de la calidad microbiológica de estos productos (lechuga criolla), mediante el estudio de bacterias entéricas (coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*) indicadoras de la seguridad sanitaria de los alimentos (Ginestre, y otros, 2009) y de bacterias patógenas como *Listeria spp*, así como demostrar la eficacia de cuatro tipos de desinfectantes de uso casero: vinagre, solución cítrica comercial, extracto de toronja y solución de amonio cuaternario comercial, frente a estos patógenos de interés y de probar esta eficacia en la contaminación normal de las hojas de lechugas provenientes de mercados, supermercados y ferias agroecológicas de la Ciudad de Cuenca.

*Escherichia coli* género bacteriano integrado por bacilos Gram negativos, catalasa positivos y oxidasa negativos, anaerobios facultativos, no forman esporas presentan un amplio rango de incubación, pueden ser inmóviles o móviles mediante flagelos peritricos y presentan necesidades nutricionales sencillas. Algunos tipos de *E. coli* son capaces de producir una toxina similar a la producida por el género *Shigella*, denominándose a este grupo *E. coli* productores de toxina Shiga o STEC (*Shiga toxin-producing E. coli*).

Uno de los serotipos más importante aislado comúnmente de toxiinfecciones alimentarias es el O157:H7 debido al número de afectados y a la gravedad de los síntomas ya que origina cuadros de diarrea, disentería, colitis hemorrágica, el síndrome urémico/ hemolítico e incluso púrpura trombocitopénica. En el caso de la colibacilosis extraintestinal se producen meningitis neonatales, infecciones urinarias, septicemias, peritonitis, mastitis, neumonía, etc., (Dominguez, Badiola, Cepeda, Rodriguez, Zurera, & Téllez, 2010).

*E. coli* para formar biofilms e iniciar la adhesión utiliza flagelos, pilis y proteínas de membrana, unida a la superficie pierde sus flagelos y aumenta la producción de

sustancias poliméricas extracelulares, como es el caso de algunas cepas de *E. coli* O157:H7 que presentan mayor resistencia a soluciones de hipoclorito, uno de los desinfectantes de mayor uso en la industria alimentaria (Dominguez, Badiola, Cepeda, Rodriguez, Zurera, & Téllez, 2010).

*Listeria spp* son bacilos Gram positivos cortos, regulares, no esporulados, móviles, anaerobios facultativos, catalasa positivos y oxidasa negativos, se han aislado de la tierra, alimentos frescos y procesados, material vegetal en estado de putrefacción, aguas residuales, comida para animales, pollo fresco y congelados, queso, leche no procesada, desechos de mataderos y el tracto digestivo de humanos y animales.

*L. monocytogenes* tiene como hábitat principal el suelo y la materia vegetal en descomposición donde sobrevive y crece como saprófito sin embargo se ha aislado de numerosas especies de mamíferos, aves, peces, crustáceos e insectos. Por su amplia distribución, puede contaminar los alimentos en distintas etapas de la producción alimentaria, vía más frecuente por la que el ser humano adquiere la infección (Dominguez, et al, 2010). Presentan gran facilidad para adherirse sobre todo cuando está en la fase de mayor actividad metabólica a superficies vivas e inertes en corto periodo de tiempo mediante flagelos, pilis y proteínas de membrana formando biofilms.

La listeriosis es de rara presentación, con un promedio de mortalidad entre un 20 a 30% existen 2 clases: la invasiva, que afecta a los grupos más vulnerables de la población como: niños en periodo neonatal, ancianos, embarazadas y personas con el sistema inmune debilitado como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), etc., en donde las células bacterianas atraviesan la barrera intestinal y alcanzan el sistema nervioso central y el útero en la mujer embarazada, ocasionando meningitis, bacteriemias, septicemias, meningoencefalitis, absceso cerebral o espinal, tromboencefalitis abortos espontáneos, muerte fetal, septicemia neonatal grave, muerte neonatal, meningitis infantil y granulomatosis ya que se disemina por vía sanguínea y atraviesa la barrera transplacentaria. La listeriosis no invasiva se manifiesta por síntomas de gastroenteritis, como diarrea, fiebre, cefalea y mialgias, y su periodo de incubación es corto (Muñoz, Vargas, Otero, & Guzmán, 2011).

### **Métodos de desinfección de hortalizas**

La desinfección de verduras y frutas es un tratamiento aplicado con el fin de reducir su contaminación o procesos naturales para el producto a lo largo de las diferentes etapas de la cadena alimentaria hasta su consumo (López, Romero, & Ureta, 2001).

Como se mencionó en la introducción, existen desinfectantes de uso casero utilizados para la desinfección de frutas y hortalizas como: compuestos de amonio cuaternario comercial, solución cítrica comercial, vinagre comercial, extracto de toronja comercial.

Los desinfectantes de acuerdo a su mecanismo de acción se clasifican en 3 grupos que son: agentes que dañan la membrana celular, agentes desnaturizantes de proteínas y agentes modificadores de grupos funcionales (Iáñez, 1998).

En este estudio dentro de los agentes que dañan la membrana celular tenemos al extracto de toronja (fenoles y alcoholes) y al amonio cuaternario comercial (desinfectante tensoactivo), mientras que la solución cítrica comercial y el vinagre están dentro del grupo de los agentes desnaturizantes de las proteínas.

Las sales de amonio cuaternario son detergentes catiónicos, tienen como estructura básica el ión amonio  $(NH_4)^+$ , el cual al ser modificado da lugar a diferentes generaciones, son solubles en agua y alcohol, potentes en cuanto a su actividad desinfectante, para eliminar hongos, levaduras y bacterias Gram positivas como *Listeria spp*, mientras que su actividad es menor para bacterias Gram negativas: coliformes y *Salmonella spp.*, sin embargo dependerá del tipo de amonio cuaternario utilizado (Marriot, 2003).

Su mecanismo de acción antimicrobiana consiste en que la porción hidrófoba penetra en las membranas, mientras que el grupo polar catiónico se asocia con los fosfatos de los fosfolípidos, provocando alteraciones en dichas membranas, reflejadas en la pérdida de su semipermeabilidad, con salida de metabolitos de N y P desde el citosol. Es entonces cuando el detergente puede entrar al interior celular, con un efecto secundario de desnaturización de proteínas (Iáñez, 1998). El rango de pH óptimo para acción antimicrobiana, es de 6-10. No son compatibles con detergentes aniónicos (Campos D & Manzano, 2007).

Extracto de toronja es un concentrado obtenido por el tratamiento de productos vegetales (Toronja) con solventes como agua, etanol o éter, sus componentes antimicrobianos son metabolitos secundarios ricos en terpenos y compuestos fenólicos con alta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas que a bacterias Gram negativas debido a que estas últimas poseen una membrana externa que rodean la pared celular impidiendo la difusión de compuestos hidrofóbicos a través de los lipopolisacáridos que la cubren (Ocares, 2012).

Los mecanismos por los cuales los principios activos de las plantas pueden causar la destrucción o inhibición de los microorganismos son:

- Degradación de la pared celular
- El flujo de electrones, el transporte activo,
- Disrupción de la membrana citoplasmática
- Daño a las proteínas de membrana,
- Filtración del contenido celular, coagulación del citoplasma y
- El agotamiento de la fuerza motriz de protones
- Coagulación del contenido celular (Ocares, 2012)

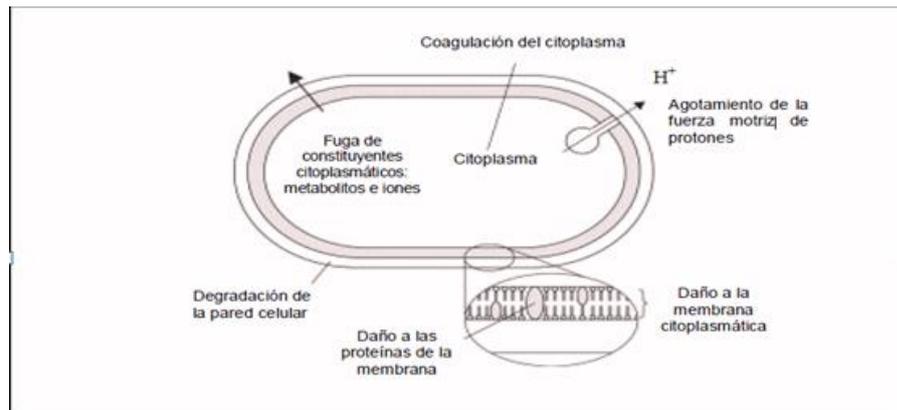


Figura 1. Mecanismos de acción antimicrobiana de extractos vegetales en la célula

Fuente (Burt, S, 2004)

Los ácidos orgánicos dentro de los cuales se encuentran el vinagre por su composición en ácido acético y el ácido cítrico son poco dissociables, ejercen su efecto en cuanto moléculas intactas (sin dissociar), pasando libre y rápidamente a través de la membrana en su forma no dissociada, liberando suficientes protones en el citoplasma como para impactar significativamente en el pH citoplasmático, generalmente tamponado por las cadenas de aminoácidos de las proteínas (García, Javier, 2011), acidificando el interior de la célula causando por lo tanto efectos inhibidores de reacciones enzimáticas vinculadas en el sistema glucolítico, ciclo de Krebs y el sistema citocromo oxidasa y sistemas de transporte (Romero, 2013).

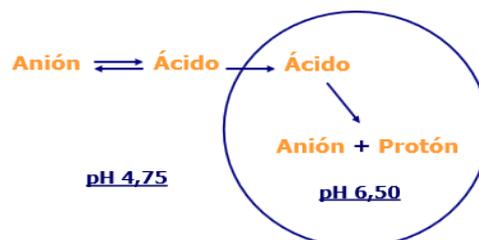


Figura 2. Mecanismo de acción de ácidos orgánicos y vinagre

Acidificación del citoplasma

Fuente: (García, Javier, 2011)

## **EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DESINFECCIÓN**

Cuando se evalúa la acción de un método desinfectante en general se determina la reducción de la carga microbiana alcanzada con el tratamiento que puede expresarse en porcentaje, en órdenes o unidades logarítmicas (log) (Garmendia & Vero, 2006).

Por ejemplo si la carga inicial de una verdura o fruta se expresa como  $10^6$  microorganismos/cm<sup>2</sup>, una reducción de tres órdenes significa que luego del tratamiento la carga remanente es de  $10^3$  microorganismos/cm<sup>2</sup>, lo cual corresponde a un 99,9% de reducción de la carga. Si la reducción es del 99 % significa que la flora microbiana superficial bajó dos órdenes y por lo tanto la carga microbiana remanente es de  $10^4$  microorganismos/cm<sup>2</sup> (Garmendia & Vero, 2006).

La actividad germicida de los desinfectantes depende de algunos factores como: pH, temperatura, concentración, condiciones de uso, tiempo, dureza de las aguas, clase y cantidad de materia orgánica presente, característica de la superficie así como concentración de los microorganismos a destruir. Estas no solamente influyen en la eficacia de la desinfección, sino también en la rapidez con que estas soluciones rebajen su fuerza, lo que determina, con frecuencia, que sea necesario repetir la operación de desinfección.

Según (Romero, 2013), las características que debe presentar un desinfectante para considerar "ideal" son:

- a) Actividad antimicrobiana: capaz de matar a los microorganismos. A baja concentración debe tener un amplio espectro de actividad antimicrobiana
- b) Solubilidad: ser soluble en agua u otros solventes, en la proporción necesaria.
- c) Estabilidad: durante el almacenamiento los cambios en sus propiedades deben ser mínimos y no deben causar una pérdida significativa de su acción germicida.
- d) No debe ser tóxico para el hombre ni los animales.
- e) Homogeneidad: la preparación debe ser uniforme en composición, de manera que los ingredientes activos estén presentes en cada aplicación.
- f) No se debe combinar con materiales orgánicos extraños.
- g) Debe ser tóxico para los microorganismos a la temperatura ambiente.
- h) Capacidad para penetrar: no necesario si se requiere sólo una acción superficial.
- i) No debe ser corrosivo, ni teñir el material que se trate.
- j) Capacidad desodorante: desodorizar mientras desinfecta es una propiedad deseable. Idealmente el desinfectante debe ser inodoro o tener un olor agradable.
- k) Capacidad detergente: ya que un desinfectante que sea a la vez detergente cumple 2 objetivos: limpieza y desinfección.
- l) Disponibilidad: estar disponible en grandes cantidades a un precio razonable.
- m) Actuar en un tiempo relativamente corto.

## **HIPOTESIS**

La lechuga criolla expandida en mercados, ferias agroecológicas y supermercados de la ciudad de Cuenca puede presentar contaminación por *Escherichia coli*/ coliformes y *Listeria spp.* no resultando eliminada por los desinfectantes comerciales de uso doméstico.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la incidencia de *coliformes/E.coli* y *Listeria spp.* en lechugas variedad criolla de los mercados, ferias agroecológicas y supermercados de la ciudad de Cuenca frente a soluciones desinfectantes que se expenden en el mercado.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

-Evaluar la calidad microbiológica de las lechugas frescas que se expenden en los mercados, ferias agroecológicas y supermercados de la Ciudad de Cuenca, mediante el aislamiento de bacterias entéricas (*E. coli*, coliformes totales y fecales) indicadoras de contaminación microbiana utilizando el método de contaje en placa (Compact Dry).

-Aislar *Listeria spp.* de lechugas frescas mediante el método ANSR para *Listeria*.

-Determinar la relación entre el punto de expendio (mercados, ferias agroecológicas, supermercados) y el lugar de procedencia con la contaminación de Coliformes/ *E. coli* y *Listeria spp.*

-Evaluar la eficacia de soluciones desinfectantes que se expenden en los supermercados de uso casero para combatir *E. coli* y *Listeria spp.*

## CAPITULO I

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Sitio y Objeto de estudio

El análisis de colifomes totales, *Escherichia coli* y *Listeria spp.* en la lechuga variedad criolla así como la evaluación de la efectividad de las soluciones desinfectantes de uso casero frente a estas bacterias se realizó en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay en la ciudad de Cuenca.

#### 1.1 Población de estudio, muestreo y tamaño de muestras:

Del universo se escogieron tres estratos donde se expenden *lechuga variedad iceberg* (criolla): mercados, ferias agroecológicas y supermercados, de cada estrato se seleccionaron de manera aleatoria cuatro y de cada uno de ellos se tomaron cinco muestras también aleatoriamente basados en el plan de muestreo por atributos (plan de tres clases) según la norma Cubana 585:2015 numeral (3.7), trabajándose con un total de 60 muestras.

A continuación se enlistan los mercados, supermercados y ferias agroecológicas donde expenden este tipo de lechuga variedad criolla. En el caso de las ferias agroecológicas se cita además los días y horarios especiales en los cuales se expenden estas hortalizas.

#### Lista de Mercados

1. 9 de octubre
2. 3 de Noviembre
3. 12 de abril
4. 27 de febrero
5. Feria libre
6. 10 de agosto

#### Lista de Ferias Agroecológicas

1. feria en Biocentro, (miércoles y sábados de 6h00-12h00)
2. feria en Miraflores (sabados 6h00-11h00) Totoracocha (viernes 6h00-12h00)
3. feria parque el Paraíso (domingos 6h30)
4. feria el Valle concha acústica (sábados 7h30-12h00)
5. feria en mercados: 12 de abril
6. feria en mercado 3 de noviembre (todos los días 7h00-12h00)
7. feria en mercado 27 de febrero (jueves 7h30)

### **Lista de Supermercados donde se expenden lechuga variedad criolla.**

1. Santa Cecilia
2. Coral Hipermercados
3. Patricia
4. Gran Sol
5. Comisariato Popular

### **1.2. Recolección y transporte de muestras**

Las 60 muestras recogidas aleatoriamente se transportaron al laboratorio en fundas estériles, etiquetados y en frío (hielera con hielo en gel) se refrigeraron y se procesaron dentro de las 24 horas de ser recolectadas.

### **1.3. Metodología y normas utilizadas**

#### **1.3.1 Normativas de la contaminación microbiológica de lechugas**

En Ecuador las normas INEN no establecen criterios microbiológicos para verduras y hortalizas, por lo que para la interpretación de los resultados con respecto a la calidad microbiológica de la lechuga se consideró la norma Cubana 585:2015 grupo 12 categoría cinco la cual establece los criterios microbiológicos para coliformes totales ( $<10^2$ - $10^3$  UFC/gr) y para *E.coli* ( $10^1$ - $10^2$  UFC/gr) en hortalizas frescas y congeladas. (Anexo 1) basándonos en el plan de muestreo de 3 clases.

Según el Numeral 3.7 de la Norma cubana 585:2015 en un plan de muestreo por atributos (plan de tres clases), un producto de acuerdo con los criterios microbiológicos puede dividirse en tres grados de calidad, "aceptable", "medianamente aceptable" y "rechazable". La clase aceptable tiene como límites 0 y m, la clase medianamente aceptable tiene como límites m y M y la rechazable aquellos valores superiores a M, y en los casos que se supere el valor de c establecido. Un plan de 3 clases queda descrito por n, m, M y c.

**n:** número de unidades de muestras a ser examinadas.

**m:** valor del parámetro microbiológico para el cual o por debajo del cual el alimento no representa un riesgo para la salud.

**c:** número máximo de muestras unitarias que pueden contener un número de microorganismos comprendido entre m y M para que el lote sea aceptable.

En el caso de *Listeria spp.*, se utilizó los límites establecidos para *Listeria monocytogenes* que constan en la Norma Sanitaria del Perú (Proyecto de actualización de la RM n° 615-2003 SA/DM), que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad

para los alimentos y bebidas de consumo la cual determina ausencia de *L. monocytogenes* en 25gr de muestra. Anexo 2.

### **1.3.2 Métodos generales para la determinación de *E.coli/ coliformes* y *Listeria spp.***

Para la determinación de la calidad microbiológica de la lechuga basadas en las normativas anteriormente señaladas se utilizaron métodos modernos como las placas compact dry, de la empresa *Nissui Pharmaceutical Co. Ltda. Japón* mientras que para la determinación de *Listeria spp.*, se utilizó el método ANSR (Amplificación isotérmica del ácido nucleico), ambos métodos se encuentran validados por la AOAC.

### **1.3.3 Método para la evaluación de la efectividad de las soluciones desinfectantes comerciales frente a *E. coli* y *Listeria spp.***

Se evaluó la efectividad de cuatro desinfectantes de uso casero: vinagre comercial, amonio cuaternario comercial, solución cítrica comercial y extracto de toronja comercial, frente a las dos bacterias señaladas, para lo cual se efectuó la prueba in vitro: antagonismo (antibiograma) e in vivo por inoculación de las cepas ATCC de patógenos en lechuga fresca para medir por recuento en placa su efectividad luego de la aplicación de aquellos productos en diferentes concentraciones y tiempos. Posteriormente se realizó el control de los desinfectantes en lechugas frescas a partir de su contaje real en placa y finalmente el análisis sensorial.

## **1.4 Preparación de medios de cultivo**

Previo al procesamiento de las muestras y análisis microbiológico se preparó los siguientes medios de cultivo siguiendo las indicaciones del proveedor.

- Agar P.C.A Merck (caseína-glucosa-extracto de levadura)
- Agua de peptona al 0.1% (Difco peptone wáter)

## **1.5 Procesamiento de las muestras**

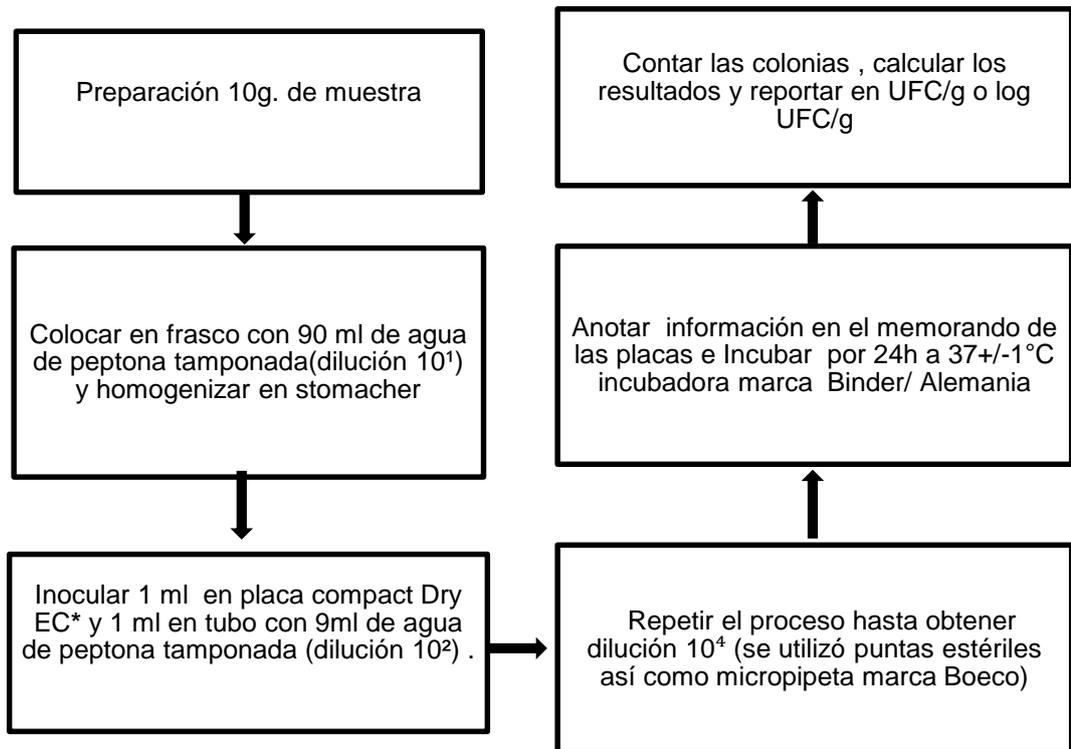
### **1.5.1. Preparación de las lechugas**

Las lechugas a analizar se despojaron de sus dos o tres hojas externas utilizando cuchillos estériles y las hojas restantes se lavaron con agua potable durante un minuto.

Se pesó la cantidad de muestra requerida según la metodología a aplicar para coliformes/*E.coli* o para *Listeria spp.*, así como para evaluar la efectividad de los desinfectante de uso casero y se aplicó el procedimiento correspondiente en cada una de ellos.

## 1.6 Análisis microbiológico de Coliformes/*E.coli*

### 1.6.1 Diagrama de Flujo del análisis microbiológico para *E. coli*/coliformes



\* Compact Dry EC permite detectar y distinguir coliformes y *E.coli*. ya que el medio contiene dos sustratos enzimáticos cromógenos: Magenta-GAL y X-Glucorónido de esta manera los coliformes desarrollan una coloración roja, mientras que la de los *E.coli* es azul. Sumando las colonias rojas y azules resulta la cifra total del grupo coliforme (Neogen, 2012).

Se empleó la estadística descriptiva para presentar la información general de los resultados obtenidos con respecto a *E.coli* y Coliformes. Para establecer la correlación intragrupo de la contaminación de coliformes entre mercados, ferias agroecológicas y supermercados así como la correlación intergrupo, se utilizó el Análisis de Varianza de un factor (ANOVA). ( $\alpha=0,05$ ) en Excel el cual es utilizado para probar la igualdad entre tres o más medias muestrales y hacer inferencias sobre si las muestras provienen de poblaciones que tienen la misma media. (Levin & Rubin, 2004)

### 1.7. Análisis para *Listeria spp.*

Para aislar *Listeria spp* se utilizó el Método de ANSR:



Figura 3: Kit N° 9821 utilizado en la prueba y software de ANSR

Fuente: autor

Es un sistema rápido que detecta la presencia o ausencia de *Listeria spp* en sólo 18 minutos basado en una reacción de amplificación única isotérmica del ácido nucleico para lo cual replica el ADN de la bacteria presente en el alimento a una temperatura constante utilizando una polimerasa (endonucleasa específica) amplificándose exponencialmente el ADN. Las secuencias amplificadas del ADN objetivo son detectadas en tiempo real a través de ondas moleculares fluorescentes. A diferencia de la PCR, la ANSR es isotérmica, replicando el ADN a una temperatura constante utilizando una polimerasa para amplificar exponencialmente el ADN a 56°C. (Neogen, 2012).

El ADN del patógeno es liberado mediante lisis de la muestra enriquecida utilizando 2 temperaturas (37°C 10 min y 80°C 20 min.)

El proceso es el siguiente:

1. El ADN del patógeno objetivo es liberado mediante la lisis de la muestra enriquecida utilizando 2 temperaturas Una baliza molecular especial es parte de la mezcla de reactivos de ANSR.
2. Cuando la muestra lisada es agregada a los reactivos de ANSR, un iniciador especial hace blanco en regiones específicas del ADN del patógeno e inicia el proceso de amplificación.
3. Se crean millones de copias del ADN del patógeno objetivo en cuestión de minutos.
4. Los segmentos amplificados del ADN del micro-organismo patógeno se unen a las Balizas moleculares fluorescentes lo cual es detectado por el lector de ANSR.

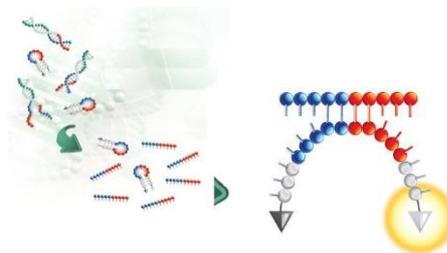


Figura 4: Mecanismo de acción de ANSR en la amplificación del ADN

Fuente: (Neogen, 2012)

#### 1.7.1 Procedimiento para el estudio por el método ANSR (Neogen Corp)

Previo al estudio por éste método se realiza un enriquecimiento de la muestra para lo cual se toman 25 gramos de la lechuga preparada (señalado en el numeral 1.5.1), los cuales se pasan a una bolsa estéril, se agrega 225 ml de caldo de enriquecimiento para *Listeria* (medio LESS) precalentado a 36°C luego se mezcla en un homogenizador triturador

(Stomacher 400) y se coloca en una incubadora (marca QuincyLab) a 36°C+/-1°C durante 18 a 24 horas.

### 1.7.2 Diagrama de Flujo del método ANSR

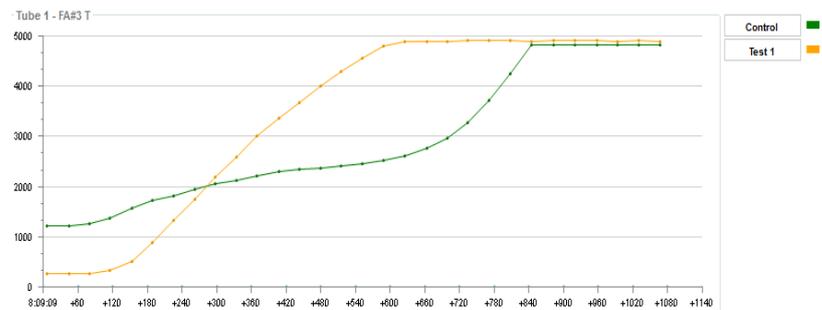
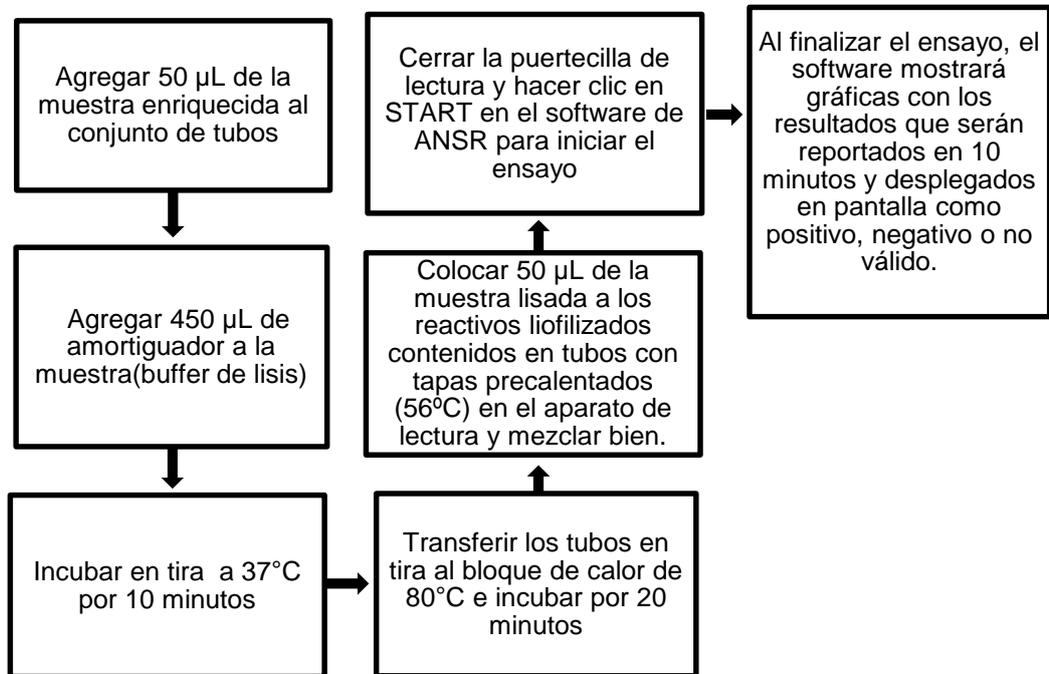


Figura 5. Muestra positiva

Las muestras positivas como se observa en la figura 5 la línea de prueba (amarilla), sobrepasa a la línea de control (verde) en el momento en que se produce la fluorescencia y detectando por lo tanto el ADN de la bacteria.

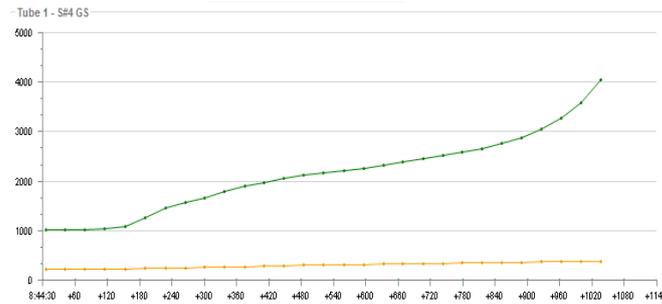


Figura 6. Muestra negativa

Las muestras negativas, observadas en la figura 6, se reconocen porque la línea de control (verde) sobrepasa a la línea de prueba (amarilla), indicando que no hubo fluorescencia por lo tanto no hay presencia de *Listeria spp.*

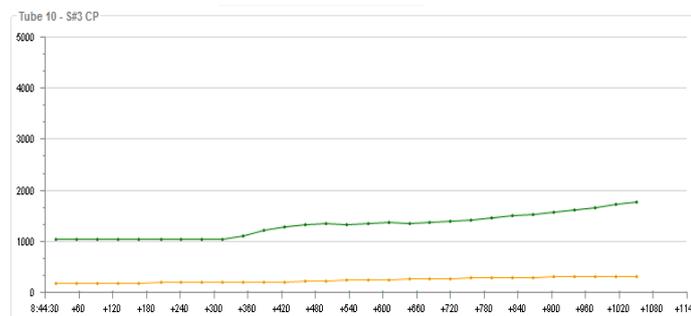


Figura 7. Muestra invalida

Las muestras que se observan en la figura 7 son inválidas debido a que las líneas de prueba (amarilla) y de control (verde) se encuentran paralelas durante todo el proceso de análisis o en la mayor parte del mismo.

### 1.8 Análisis de la Evaluación de la eficacia de las soluciones desinfectantes

Para las pruebas in vitro y las pruebas de inoculación in vivo se utilizaron bacterias ATCC de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, del cepario del laboratorio. Las bacterias fueron activadas en Agar Nutritivo (Acumedia, Neogen) a 35 +/- 1°C por 18 a 24 horas. Una vez activas se concentraron (UFC/mL) a 6 log para *L. monocytogenes* y 8 log para *E. coli*, en solución salina estéril al 0.9%.

Los desinfectantes utilizados para este estudio, son los aplicados usualmente por las amas de casa, debido a que se encuentran de venta libre en los supermercados. Las concentraciones normales fueron las indicadas en las etiquetas de los productos y se utilizó esta concentración, una concentración a la mitad y otra al doble, para poder determinar si el fabricante está cumpliendo con lo indicado en las fichas técnicas de los productos.

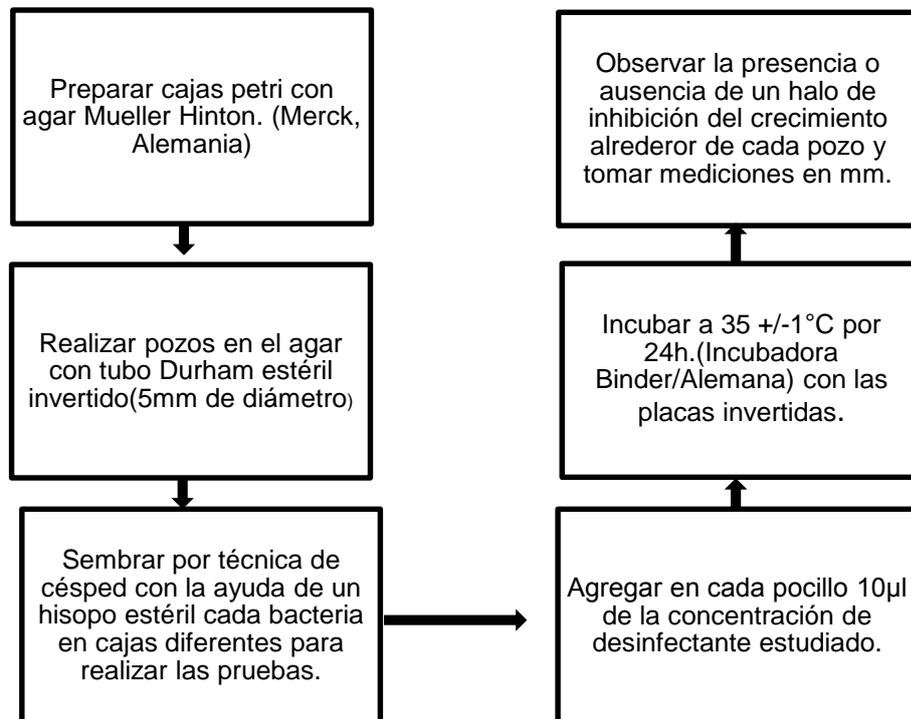
Tabla 1. Composición y concentraciones utilizadas de los desinfectantes comerciales de uso casero.

Composición de los desinfectantes	Concentración del desinfectante	Concentración
	mL/L	% (v/v )
Vinagre comercial (vinagre de fruta, ácido cítrico, sorbato de potasio y especias)	125	12.5
	250	25
	500	50
Extracto de toronja comercial	3.5	0.35
	7	0.7
	14	1.4
Solución cítrica comercial (agua, solución cítrica, glucosa, vitamina C, ácido cítrico, cloruro de benzalconio, glicerina, propilenglicol), preparar en 3 litros de agua	5	0.17
	10	0.33
	20	0.66
Amonio cuaternario comercial (cloruro de amonio, n-alquil dimetil benzil, colorante azul, agua) , preparar en 3litros de agua.	5	0.17
	10	0.33
	20	0.66

### 1.8.1 Prueba in vitro

En el siguiente diagrama de flujo se explica la metodología que se realizó para la prueba de inhibición:

### 1.8.1.1 Diagrama de Flujo sobre método de inhibición (antibiograma) o antagonismo en placa



### 1.8.2 Prueba in vivo por inoculación

Esta prueba se realizó con las concentraciones de desinfectantes que presentaron halos de mayor inhibición.

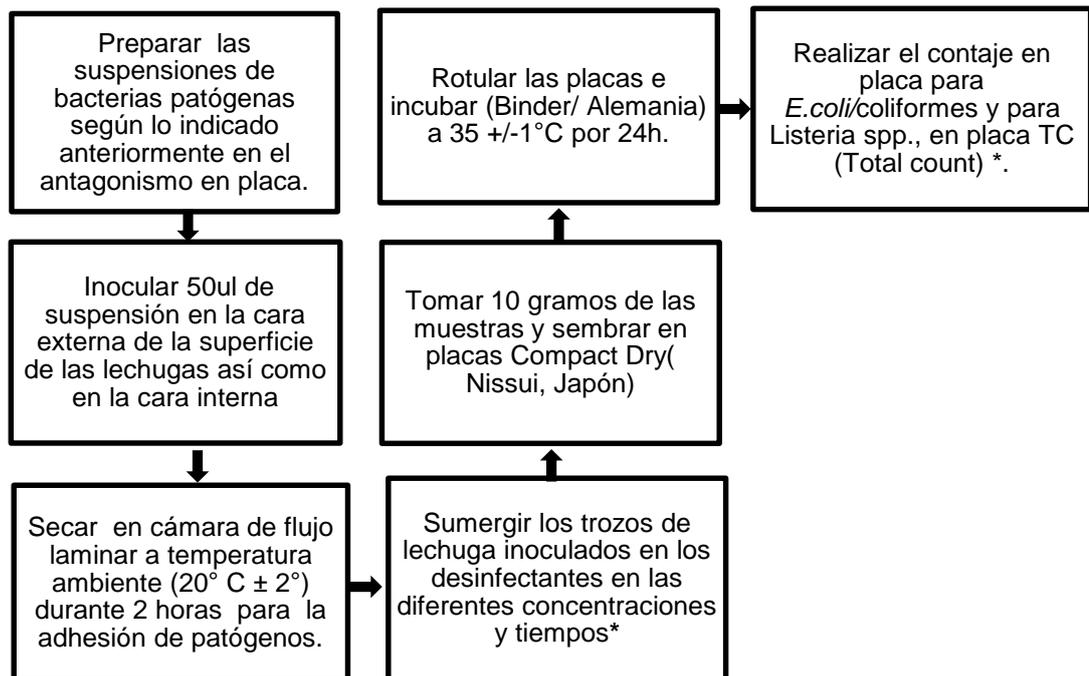
Para lo cual las lechugas que se inocularon fueron adquiridas en un punto de abasto proveniente de un mismo cultivo y recolectado el día anterior, se despojaron de sus dos o tres hojas externas y las hojas restantes se lavaron con agua potable durante un minuto. Las hojas lavadas se cortaron en trozos de 5x5 cm (Jaimes & Gomez, 2011), con bisturí estéril según pesando 10g de las mismas en recipientes estériles y se dejaron secar en la cámara de flujo laminar



Figura 8. Lechuga cortada en trozos de 5x5

Fuente: autor

### 1.8.2.1 Diagrama de Flujo de prueba de inoculación



#### \* Tiempos:

recomendado en la etiqueta (5min),  
 mitad (2 ½ minutos)  
 doble tiempo (10 minutos)

\* Placas Compact dry TC que es un medio que contiene agar de cultivo estándar y que sirve para comprobar el recuento total. Debido a la sal de tetrazoilo, indicador redox, las colonias de bacterias presentan una coloración roja, pudiéndose con ello distinguir muy fácilmente de posibles restos de alimentos.

Los resultados se expresaron como eficiencia germicida porcentual (% E), calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{N_0 - N_t}{N_0} \times 100$$

donde  $N_0$  = número de microorganismos iniciales

$N_t$  = número de microorganismos sobrevivientes a tiempo  $t$

Como criterio de eficacia se utilizó lo estipulado por el test de Chambers, el cual considera como buen desinfectante un producto que, a la concentración recomendada, cause un 99,999% de muerte equivalente a una reducción de 3 logs, a una cantidad entre  $7,5 \times 10^7$  y  $1,3 \times 10^8$  células por ml en 30 segundos (López, et al, 2001).

### **1.8.3 Prueba in vivo (lechuga con contaminación real)**

Este estudio se aplicó solamente frente a *E.coli*/ coliformes en lechuga obtenida de los mercados, supermercados y ferias agroecológicas puesto que *Listeria spp.* no es común encontrarla según el presente estudio realizado en el que se halló dos muestras de las 60 analizadas.

Para esta prueba se realizó en el mismo día la determinación del recuento inicial presente en la lechuga procedente de los tres estratos así como el recuento final, es decir luego de la aplicación de los 4 desinfectantes estudiados en concentración y tiempo recomendado por el fabricante puesto que es el que se utiliza rutinariamente.

Para la obtención de los 2 recuentos se siguieron los procedimientos descritos anteriormente sobre contaje en placa de *E.coli*/coliformes en placas Compact dry (Nissui, Japón).

Los resultados se interpretaron en UFC/g y log UFC/g, se calculó el %E según el criterio de Chambers así como la reducción logarítmica, se realizaron las comparaciones respectivas y se tabularon los datos.

### **1.8.4 Análisis sensorial de los desinfectantes en lechuga**

Se realizó la apreciación general de la lechuga luego de ser aplicada los cuatro tipos de desinfectantes en la concentración y tiempo recomendado en la etiqueta a un grupo de 30 jueces no entrenados los cuales determinaron cual era el producto de mayor agrado (Anexo 6).

## CAPITULO 2

### RESULTADOS

#### 2.1 Lugares de Procedencia

Del análisis de las 60 muestras recolectadas de los Mercados, Ferias agroecológicas y Supermercados de la Ciudad de Cuenca se observa que el lugar de procedencia fue distinto pudiendo provenir de varios sectores como Sayausí, San Joaquín, Baños, Barabón, Tutupali, Sidcay, El Valle, Tarqui, etc. siendo Sayausí y San Joaquín en el caso de los Mercados los lugares de mayor procedencia según se presenta en la anexo 3.

En el caso de las Ferias agroecológicas los lugares de procedencia corresponden a los sectores de Sayausí, Quingeo, Sinincay, Octavio Cordero, Tarqui, Jadán, San Joaquín, Barabón siendo Quingeo y Jadán los principales proveedores (anexo 4), en cambio en el caso de los Supermercados las muestras recolectadas en cada uno de ellos proceden de un mismo sector (anexo 5).

#### 2.2 Contaminación microbiológica de las lechugas

##### 2.2.1 Resultados del análisis microbiológico *E.coli* /coliformes (Compact dry EC)

Los resultados obtenidos de la contaminación con coliformes totales así como de *E. coli* de las lechugas variedad criolla de los mercados, supermercados y ferias agroecológicas fueron comparados con la norma cubana NC 585:2015, la que establece como criterios microbiológicas ( $<10^2$ - $10^3$ ) para coliformes totales y ( $10^1$  - $10^2$ ) para *E.coli* según el plan de muestreo de 3 clases según el cual se clasifican en tres grados de calidad, “aceptable”, “medianamente aceptable” y “rechazable”.

En el anexo 7 se encuentran los valores de *E.coli* y coliformes obtenidos en cada una de las 60 muestras analizadas separadas en los tres estratos: mercados, supermercados y ferias agroecológicas.

A continuación mediante en las gráficas se compara los resultados obtenidos tanto de *E.coli* como de coliformes totales, encontrados en cada uno de las lechugas recolectadas de los cinco mercados, supermercados y ferias agroecológicas, además de los lugares de producción de los mismos.

MERCADOS

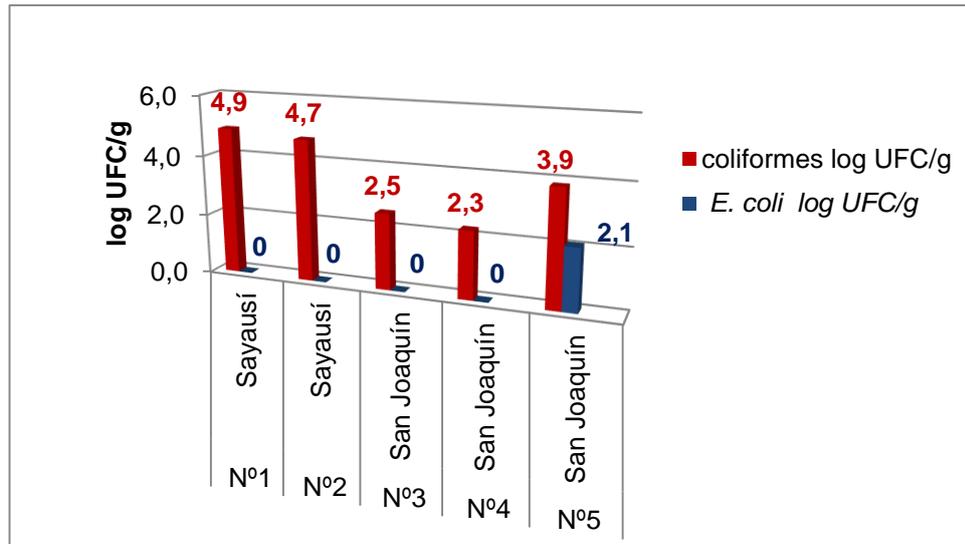


Figura 9. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y *E.coli* en lechugas recolectadas del mercado 12 de abril

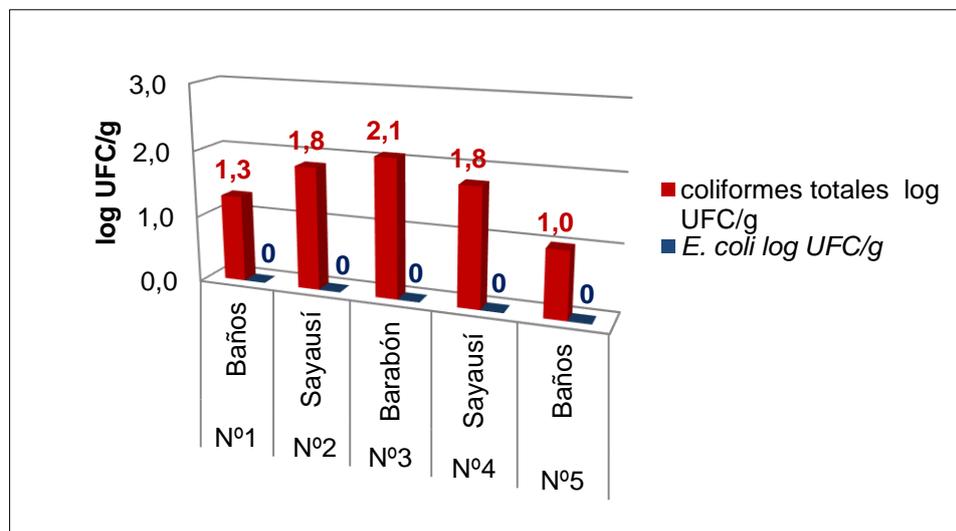


Figura 10. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y *E.coli* en lechugas recolectadas del mercado Feria Libre

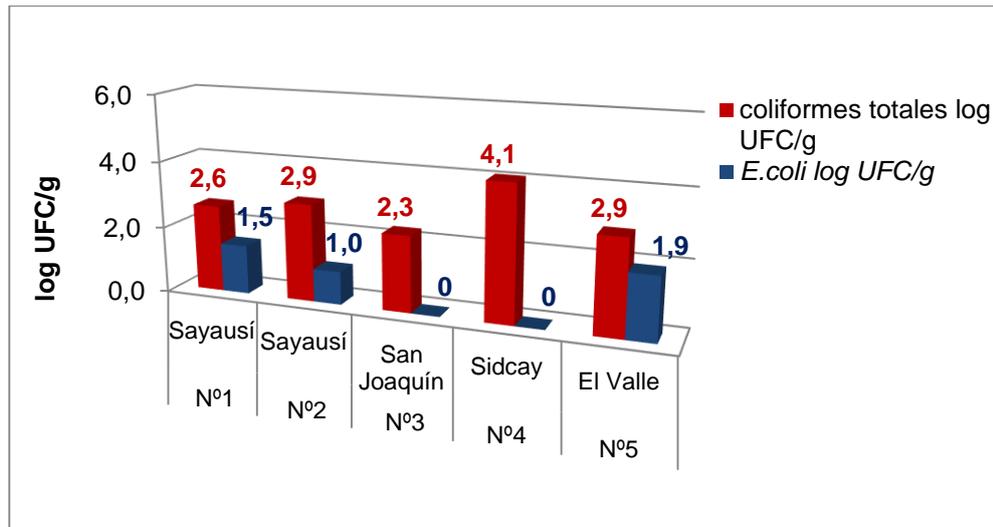


Figura 11. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y E.coli en lechugas recolectadas del mercado 10 de Agosto

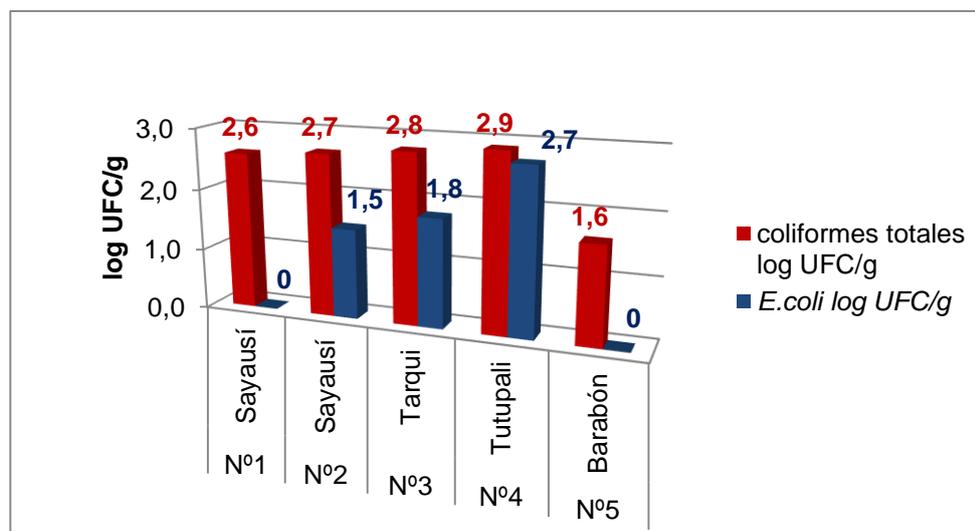


Figura 12. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y E.coli en lechugas recolectadas del mercado 9 de Octubre

FERIAS AGROECOLÓGICAS

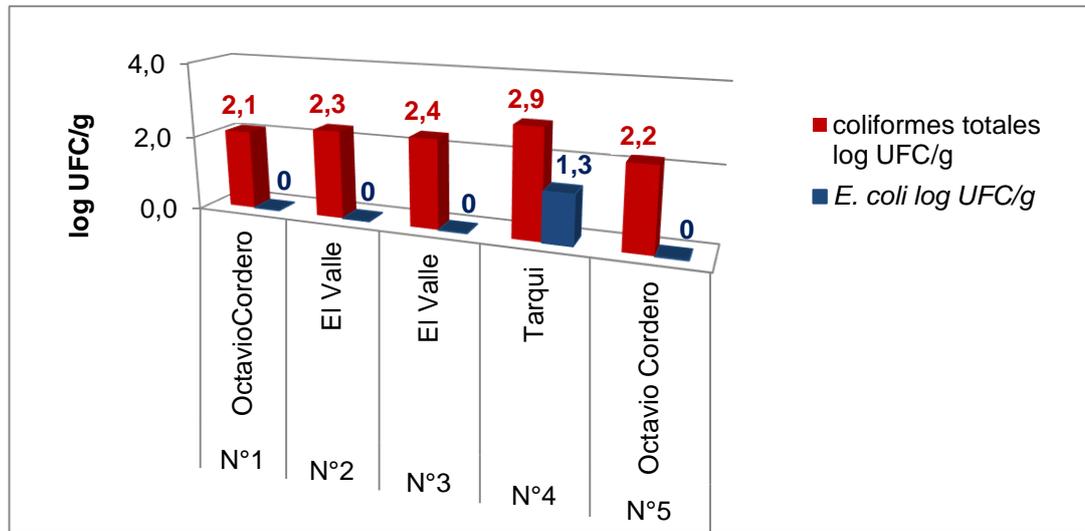


Figura 13. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y *E.coli* en lechugas recolectadas de la Feria agroecológica 12 de abril.

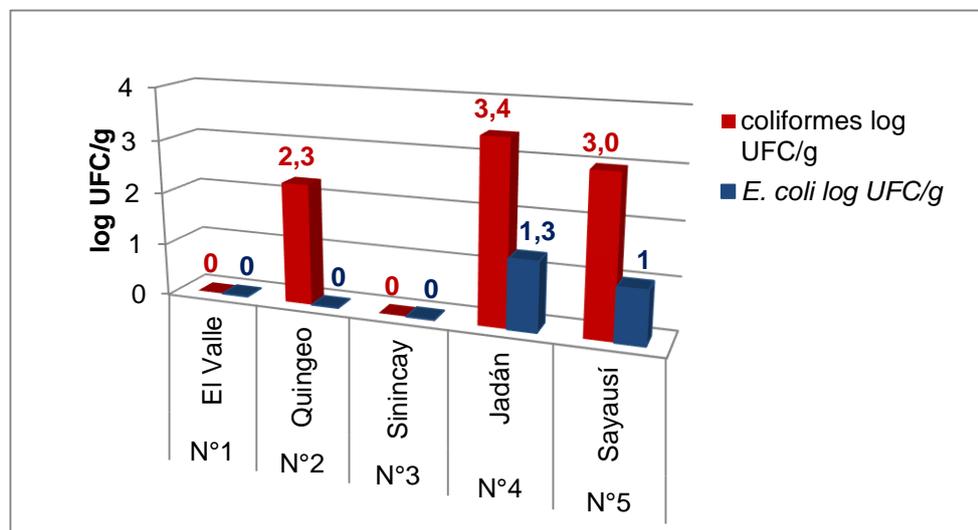


Figura 14. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y *E.coli* en lechugas recolectadas de la Feria agroecológica Feria Libre

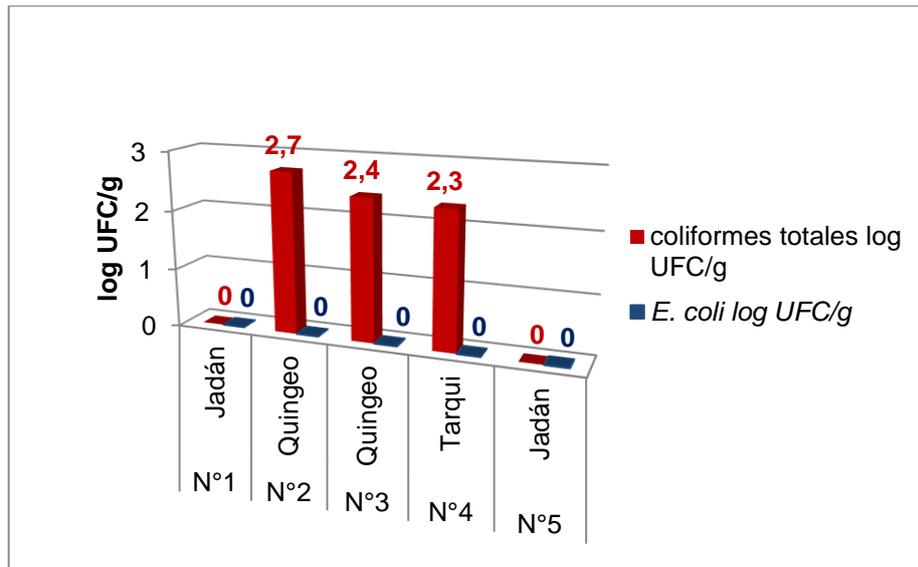


Figura 15. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y *E.coli* en lechugas recolectadas de la Feria agroecológica del Consejo Provincial

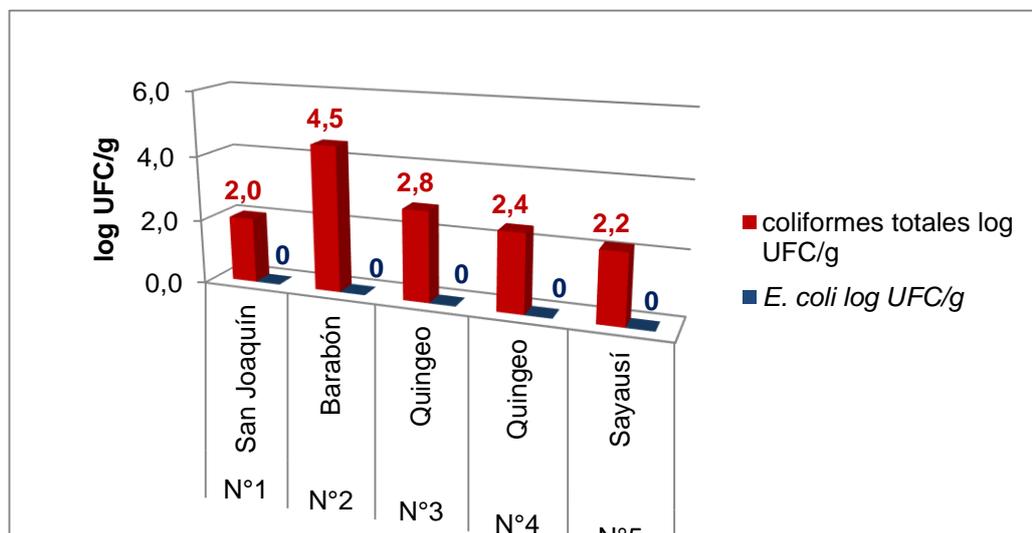


Figura 16. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y *E.coli* en lechugas recolectadas de la Feria agroecológica de Totoracocha

**SUPERMERCADOS**

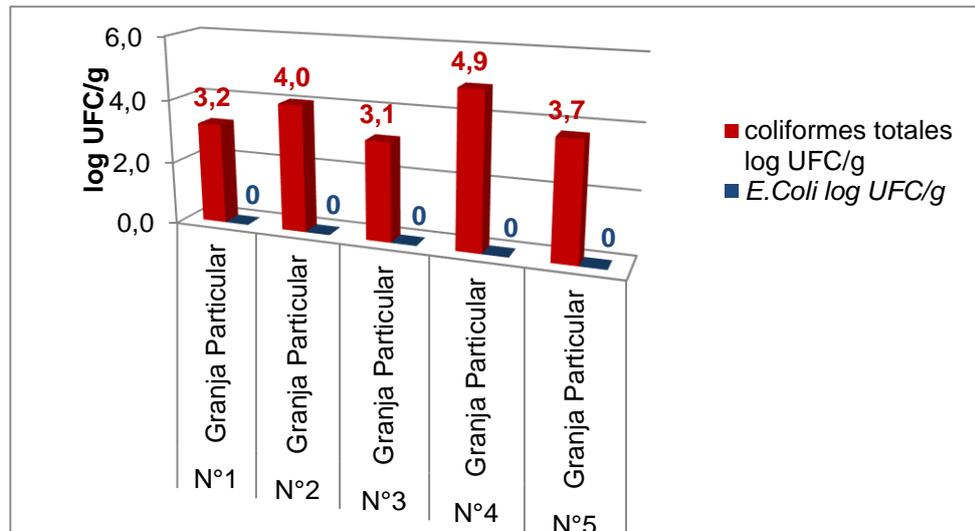


Figura 17. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y *E.coli* en lechugas recolectadas del Supermercado Comisariato Popular

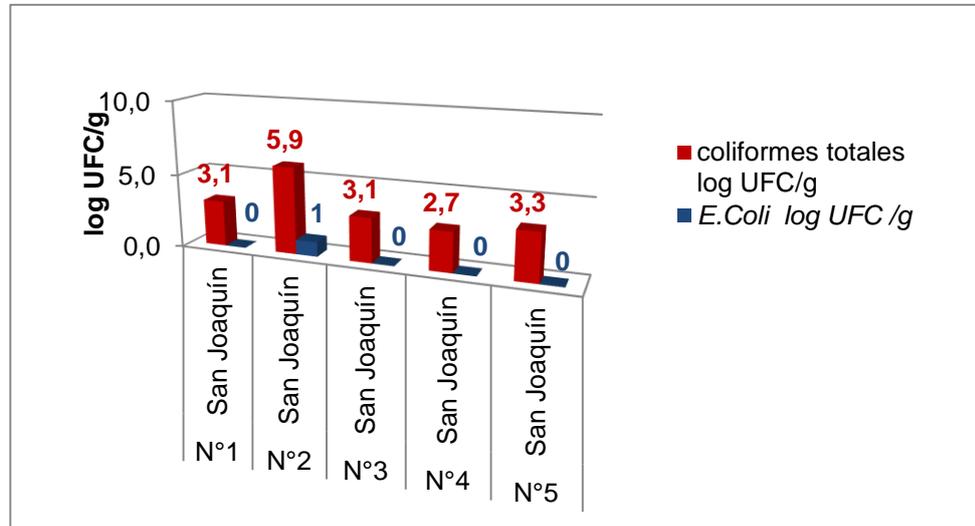


Figura 18. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y *E.coli* en lechugas recolectadas del Supermercado Gran Sol

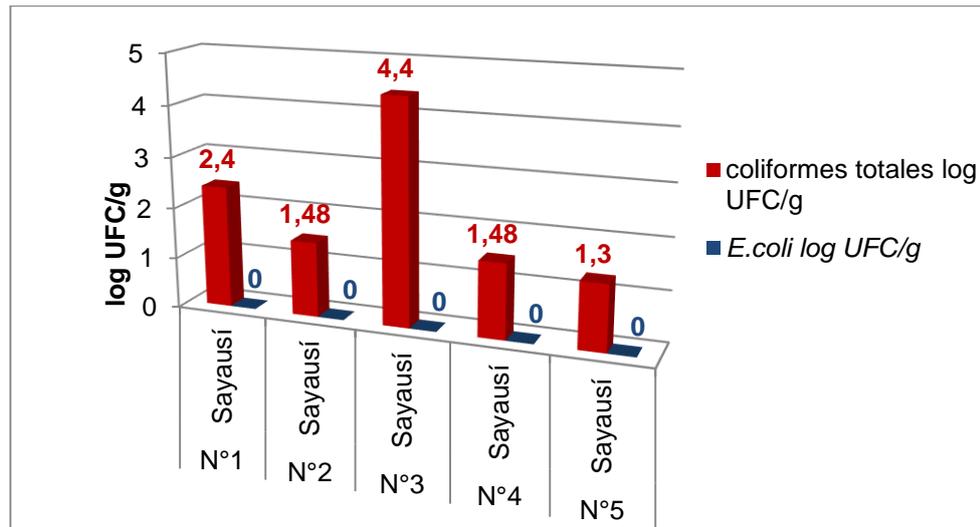


Figura 19. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y *E.coli* en lechugas recolectadas del Supermercado Santa Cecilia

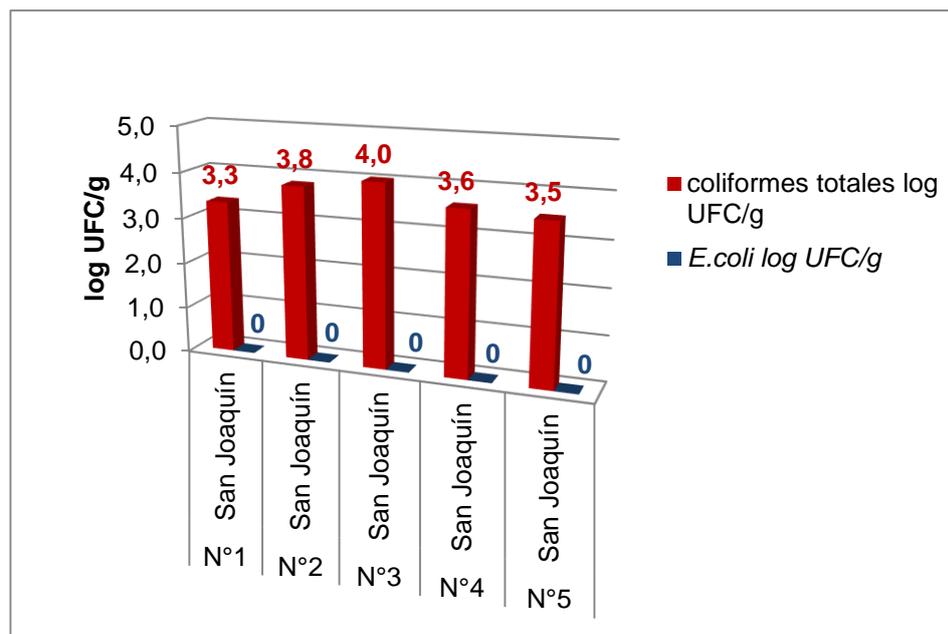


Figura 20. Resultados de la contaminación microbiológica por coliformes totales y *E.coli* en lechugas recolectadas del Coral Hipermercados

De todos estos resultados obtenidos se determinó el porcentaje de contaminación microbiológica de coliformes totales y *E. coli* (Tabla 2) mediante la aplicación de estadística descriptiva tomando como referencia la clasificación del plan de 3 clases: aceptable, medianamente aceptable y rechazable (NC 585:2015 numeral 3.7).

Tabla 2.

Porcentajes de contaminación de coliformes totales y *E.coli* de mercados, supermercados y ferias agroecológicas

BACTERIAS	Grados de Calidad NC 585:2015	%Contaminación			
		Total	Mercados	Ferias Agroecológicas	Supermercados
	aceptable (0-10 <sup>2</sup> )	20%	8%	7%	5%
Coliformes totales	medianamente aceptable(10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup> )	43%	18%	22%	3%
	rechazable(>10 <sup>3</sup> )	37%	7%	5%	25%
	aceptable (0-10 <sup>1</sup> )	82%	22%	28%	32%
<i>E. coli</i>	medianamente aceptable(10 <sup>1</sup> -10 <sup>2</sup> )	15%	8%	5%	2%
	rechazable(>10 <sup>2</sup> )	3%	3%	0%	0%

Al analizar los resultados de coliformes totales comparada con la norma cubana anteriormente descrita vemos que el 7% de las lechugas de los mercados, el 5% de las ferias agroecológicas y el 25% de los supermercados superan el límite M (>10<sup>3</sup>) por lo que se encuentran en la categoría rechazable, constituyendo un riesgo para la salud del consumidor. En cambio con respecto a *E.coli* es el 3% de muestras que sobrepasan los niveles de aceptabilidad y corresponden únicamente a los mercados puesto que las ferias agroecológicas y supermercados no presentan muestras con valores superiores a M es decir inaceptables o rechazables.

Se observa además que de las 60 muestra analizadas con respecto a coliformes totales el mayor porcentaje se encuentra dentro de la categoría medianamente aceptable (10<sup>1</sup>-10<sup>2</sup>) mientras que en el estudio de *E.coli* un porcentaje alto (82%) están dentro de los límites de aceptabilidad (0-10<sup>1</sup>).

Los resultados obtenidos de las medias muestrales tanto intragrupo como intergrupo para la realización del método estadístico ANOVA así como los valores de la X gran media constan en la tabla siguiente.

Tabla 3.  
Medias muestrales intragrupo e intergrupo

MEDIAS					Xgran media
Mercados	3,6 (12 de abril)	1,6 (Feria Libre)	3,0 (10 de agosto)	2,5 (9 de octubre)	2,7
Ferias agroecológicas	2,4 (12 de abril)	1,7 (Feria libre)	1,5 (Consejo Provincial)	2,8 (Totoracocha)	2,1
Supermercados	3,8 (Comisariato popular)	3,2 (Gran Sol)	2,2 (Santa Cecilia)	3,7 (Supermercados)	3,2
Tres estratos	2,7 (Mercados)	2,1 (Ferias agroecológicas)	3,2 (Supermercados)	-----	2,7

Tabla 4.  
Tabla de Análisis de Varianza generalizada respecto a la contaminación con coliformes

#### B. Tabla de ANOVA

fuelle de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	cuadrado medio	valor F
entre muestras (tratamiento)	11,03	3	3,6781424	6,19
dentro de muestras (error)	9,51	16	0,59416951	
variación total	20,6	19		

Ho:  $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$

Ha: no todas las medias son iguales

alfa: 0,05

Regla de decisión: No rechazar la Ho si  $F \leq 3,24$ . Rechazar la hipótesis nula si  $F > 3,24$

Conclusión: Ya que  $F=6,19 > 3,24$ , se rechaza la hipótesis nula

Interpretación:

Mercados: Hay diferencias significativas entre las medias, se rechaza la hipótesis nula no existe por lo tanto relación de la contaminación entre un mercado y otro.

Tabla 5.  
Tabla de Análisis de Varianza generalizada (Ferias agroecológicas)

**B. Tabla de ANOVA**

fuelle de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	cuadrado medio	valor F
entre muestras (tratamiento)	5,23	3	1,74355228	1,23
dentro de muestras (error)	22,68	16	1,4177757	
variación total	27,9	19		

Ho:  $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$   
Ha: no todas las medias son iguales  
alfa: 0,05  
Regla de decisión: No rechazar la Ho si  $F \leq 3,24$ . Rechazar la hipótesis nula si  $F > 3,24$   
Conclusión: Ya que  $F=1,22 < 3,24$ , no se rechaza la hipótesis nula

Interpretación:

Ferias agroecológicas: no hay diferencia significativa entre las medias no se rechaza por tanto la hipótesis nula, existiendo relación de contaminación entre las ferias agroecológicas estudiadas.

Tabla 6. Tabla de Análisis de Varianza generalizada (Supermercados)

**B. Tabla de ANOVA**

fuelle de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	cuadrado medio	valor F
entre muestras (tratamiento)	7,74	3	2,57941486	4,18
dentro de muestras (error)	9,87	16	0,61711775	
variación total	17,6	19		

Ho:  $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$   
Ha: no todas las medias son iguales  
alfa: 0,05  
Regla de decisión: No rechazar la Ho si  $F \leq 3,24$ . Rechazar la hipótesis nula si  $F > 3,24$   
Conclusión: Ya que  $F=4,18 > 3,24$ , se rechaza la hipótesis nula

Interpretación:

Supermercados: Hay diferencias significativas entre las medias, se rechaza por tanto la hipótesis nula no existe relación de la contaminación entre los supermercados estudiados.

Tabla 7.

Tabla de Análisis de Varianza generalizada ( Mercados, Supermercados y Ferias agroecológicas)

**B. Tabla de ANOVA**

fuerza de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	cuadrado medio	valor F
entre muestras (tratamiento)	2,53	3	0,84306955	2,77
dentro de muestras (error)	4,87	16	0,30424766	
variación total	7,4			

Ho:  $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$   
 Ha: no todas las medias son iguales  
 alfa: 0,05  
 Regla de decisión: No rechazar la Ho si  $F \leq 3,24$ . Rechazar la hipótesis nula si  $F > 3,24$   
 Conclusión: Ya que  $F=2,77 < 3,24$ , no se rechaza la hipótesis nula

Interpretación:

De los 3 estratos: No existen diferencias significativas entre las medias, no se rechaza la hipótesis nula existe por lo tanto relación de la contaminación entre los mercados, ferias y supermercados estudiados.

**2.3 RESULTADOS DEL ANALISIS DE *Listeria spp.***

Los resultados obtenidos del análisis de *Listeria* mediante el Método ANSR revelan que de las 60 muestras recolectadas solamente dos muestras resultaron positivas lo cual representa un 3,33%. La primera muestra correspondiente al mercado Feria libre cuyo proveedor corresponde al sector de Sayausí y la segunda de las Feria agroecológicas de Totoracocha correspondiente al sector de Quingeo (Fig. 21 y 22).

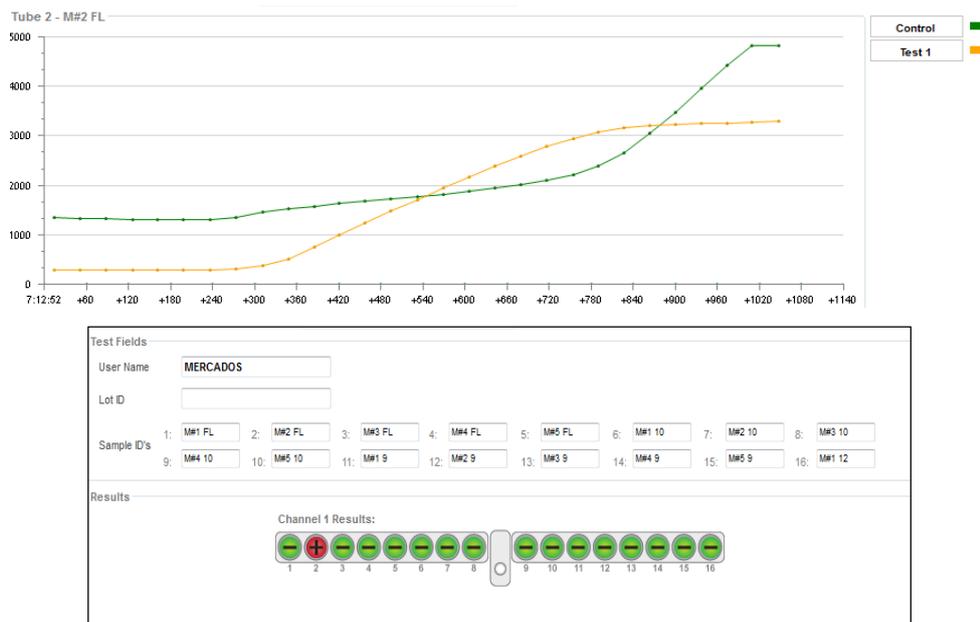


Figura 21 .Curvas de control y resultados positivo y negativos por el método de ANSR para *Listeria spp* en lechuga recolectada de mercados.



Figura 22. Curvas y resultados positivos y negativos por el método de ANSR para *Listeria* spp. en lechuga recolectada de ferias agroecológicas.

En las dos muestras la curva amarilla representa la muestra de lechuga variedad criolla recolectada mientras que la curva verde corresponde al control.

Se observa que en las muestras positivas la curva del test sube y se cruza con la del control.

## 2.4 RESULTADOS DE EFECTIVIDAD DE LOS DESINFECTANTES COMERCIALES FRENTE a *Listeria* spp. y *E. coli*

### 2.4.1 ANALISIS IN VITRO POR ANTAGONISMO EN PLACA

Los siguientes resultados se refieren a la actividad inhibitoria expresada en mm obtenidos de los cuatro tipos de desinfectantes, aplicados para los dos microorganismos evaluados (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados de la prueba de inhibición de los desinfectantes frente a las bacterias patógenas.

Desinfectante	Bacterias inoculadas					
	<i>E. coli</i>			<i>L. monocytogenes</i>		
	Concentración desinfectante			Concentración desinfectante		
	Mitad	Normal	Doble	Mitad	Normal	Doble
	Halos de inhibición en mM			Halos de inhibición en mM		
Vinagre comercial	0	12	13	0	11	13
Extracto de toronja comercial	0	14	16	14	17	17
Solución cítrica comercial	13	19	22	45	50	50
Amonio cuaternario comercial	0	17	19	35	37	40

Para escoger los mejores desinfectantes y la concentración se aplicó el siguiente indicador:

S (sensible): halos > 20 mM

I (intermedio): halos entre 15 y 19 mM.

R (resistente): halos < 15 mM.

Por lo tanto el vinagre comercial, fue el menos adecuado para la desinfección frente a las bacterias patógenas, ya que presentó halos menores a 15mM.

El extracto de toronja resultó en un nivel intermedio contra *E. coli*, al doble de concentración, pero no fue efectivo a la concentración normal (indicada por el proveedor). Para *L. monocytogenes*, el extracto de toronja presentó un mejor comportamiento al encontrarse como intermedio tanto a la concentración normal como al doble.

La solución cítrica comercial, presenta halos de inhibición mayores entre 19 y 22 mm, tanto a concentración normal como doble para *E. coli* y para *L. monocytogenes* los diámetros de los halos sobrepasaron los 20 mM, lo que indica que esta bacteria fue sensible al producto en las diferentes concentraciones.

Para el caso del amonio cuaternario, se tiene diámetros entre 17 y 19 mM, para concentraciones normal y doble, respectivamente, lo que indica que *E. coli* es un poco sensible para este desinfectante. *L. monocytogenes* tiene un mejor comportamiento y es muy sensible al amonio cuaternario.

#### 2.4.2 Efectividad de los tratamientos frente a inoculación de *E.coli* y *Listeria spp.*

Las lechugas inoculadas fueron sembradas en placas Compact Dry (Nissui, Japon), se realizó el contaje en placa y luego se determinó la eficacia germicida (%E) con la formula (1). En la tabla 9, se encuentran los resultados del % E.

De esta tabla se desprende como los desinfectantes de uso casero actúan sobre las bacterias patógenas, la solución cítrica a una concentración normal y doble y en un tiempo de 5 y 10 minutos presenta un 99,999% de efectividad germicida (%E) contra *E. coli*. Así mismo a estas concentraciones y tiempos es efectiva al 100% contra *L. monocytogenes*, reduciendo 6,2 log.

La solución de amonio cuaternario tiene una buena efectividad del 99,999% contra ambas bacterias al doble de concentración entre 5 y 10 minutos para *E.coli* y de 10 minutos para *Listeria monocytógenes*.

**Tabla 9. Resultados de las pruebas in vivo en lechugas inoculadas con bacterias patógenas**

Solución cítrica prueba contra <i>E. coli</i>									
Tiempo (min)	Conc. Mitad			Conc. Normal			Conc. Doble		
	log UFC /g	% E	Reducción	log UFC /g	% E	Reducción	log UFC	% E	Reducción
			en log			en log			en log
2.5	6	99.333	2,2	5,7	99.667	2,5	4,1	99.992	4,1
5	5,8	99.533	2,4	3,2	99.999	5	3,1	99.999	5,1
10	5,5	99.800	2,7	3,1	99.999	5,1	2,9	99.999	5,3

Solución cítrica prueba contra <i>L. monocytogenes</i>									
Tiempo (min)	Conc. Mitad			Conc. Normal			Conc. Doble		
	log UFC /g	% E	Reducción	log UFC /g	% E	Reducción	log UFC	% E	Reducción
			en log			en log			en log
2.5	4	99.380	2,2	2,8	99.961	3,4	2,7	99.970	3,5
5	3,9	99.500	2,3	0	100	6,2	0	100	6,2
10	2,9	99.941	3,3	0	100	6,2	0	100	6,2

Solución amonio cuaternario prueba contra <i>E. coli</i>									
Tiempo (min)	Conc. Mitad			Conc. Normal			Conc. Doble		
	log UFC/g	% E	Reducción	log UFC/g	% E	Reducción	log UFC/g	% E	Reducción
			en log			en log			en log
2.5	—	—	—	6,3	98.667	1,9	3,5	99.998	4,7
5	—	—	—	4	99.993	4,2	3,2	99.999	5
10	—	—	—	4	99.994	4,2	2,9	99.999	5,3

Solución amonio cuaternario prueba contra <i>L. monocytogenes</i>									
Tiempo (min)	Conc. Mitad			Conc. Normal			Conc. Doble		
	log UFC/g	% E	Reducción	log UFC/g	% E	Reducción	log UFC/g	% E	Reducción
			en log			en log			en log
2.5	4,5	97.800	1,7	4,3	98.667	1,9	3,9	99.467	2,3
5	4,5	98.000	1,7	3,97	99.373	2,23	3,7	99.667	2,5
10	4,2	99.000	2	3,18	99.900	3,02	0	99.999	6,2

Extracto de toronja prueba contra *E. coli*

Tiempo (min)	Conc. Mitad			Conc. Normal			Conc. Doble		
	log UFC/g	% E	Reducción	log UFC/g	% E	Reducción	log UFC/g	% E	Reducción
			en log			en log			en log
2.5	—	—	—	4,9	100	3,3	4,3	99.986	3,9
5	—	—	—	4	100	4,2	3,5	99.998	4,7
10	—	—	—	3,2	100	5	3,3	99.999	4,9

Extracto de toronja prueba contra *L. monocytogenes*

Tiempo (min)	Conc. Mitad			Conc. Normal			Conc. Doble		
	log UFC/g	% E	Reducción	log UFC/g	% E	Reducción	log UFC/g	% E	Reducción
			en log			en log			en log
2.5	5,1	91.200	1,1	4,9	94.200	1,3	3,7	99.673	2,5
5	4,6	97.200	1,6	4	99.393	2,2	3,2	99.900	3
10	4,6	97.467	1,6	3,2	99.900	3	3,1	99.921	3,1

vinagre prueba contra *E. coli*

Tiempo (min)	Conc. Mitad			Conc. Normal			Conc. Doble		
	log UFC/g	% E	Reducción	log UFC/g	% E	Reducción	log UFC/g	% E	Reducción
			en log			en log			en log
2.5	—	—	—	6,3	98.667	1,9	4,5	99.978	3,7
5	—	—	—	6	99.293	2,2	4	99.993	4,2
10	—	—	—	6	99.327	2,2	3,3	99.999	4,9

vinagre prueba contra *L. monocytogenes*

Tiempo (min)	Conc. Mitad			Conc. Normal			Conc. Doble		
	log UFC/g	% E	Reducción	log UFC/g	% E	Reducción	log UFC/g	% E	Reducción
			en log			en log			en log
2.5	—	—	—	5	93.670	1,2	4,8	95.930	1,4
5	—	—	—	4,4	98.130	1,8	4,8	96.000	1,4
10	—	—	—	4,1	99.130	2,1	3,4	99.830	2,8

El extracto de toronja demostró una excelente efectividad (99,999%) en concentración normal y en los tres tiempos contra *E. coli* y en la doble concentración a los 10 minutos. Pero contra *L. monocytogenes* no es tan efectivo, obteniéndose %E de menos de 99,999%.

El vinagre es efectivo a una concentración doble en 10 minutos contra la bacteria *E. coli*. Pero presenta una baja efectividad contra *L. monocytogenes* similar al comportamiento del extracto de toronja.

### 2.4.3 EFECTIVIDAD DE TRATAMIENTOS in vivo (Lechuga con contaminación real)

En este estudio se encontró que los 4 desinfectantes frente a la contaminación real con coliformes totales muestran una buena reducción logarítmica en la mayoría de los casos cercana a 3 logs obteniéndose recuentos finales (después de la aplicación de los desinfectantes) de 0 log UFC/g y en otros casos como las ferias agroecológicas llegan incluso a reducir 3,8 logs exceptuando el extracto de toronja en este caso particular, sin embargo sus porcentajes de %E se encuentran entre el 99,630 al 99,973% frente a coliformes totales y entre el 90 y 99,8% frente a *E. coli* ya que con respecto a ésta última

bacteria las reducciones logarítmicas son menores(1 a 1,3 ) y en la lechuga de los mercados de 2,7 ninguno llega por lo tanto al 99,999% según el criterio de eficacia del test de Chambers (López, Romero, & Ureta, 2001).

Tabla 10. Resultados de las pruebas con la flora bacteriana normal de las lechugas frente a *E.coli/coliformes*

Mercados						
muestra: Mercado 9 de Octubre #4						
Recuento inicial:		Coliformes			<i>E.coli</i>	
		2,9 log			2,7 log	
Desinfectantes	Recuento final: log UFC/g	% E	Reducción en log	Recuento final: log UFC/g	% E	Reducción en log
Extracto de toronja comercial	0	99,87	2,9	0	99,8	2,7
Vinagre comercial	0	99,87	2,9	0	99,8	2,7
Solución cítrica comercial	0	99,87	2,9	0	99,8	2,7
Amonio cuaternario comercial	0	99,87	2,9	0	99,8	2,7

Ferias agroecológicas						
muestra: Feria Agroecológica 12 de abril #4						
Recuento inicial:		Coliformes			<i>E.coli</i>	
		3,6 log			1,3 log	
Desinfectantes	Recuento final: log UFC/g	% E	Reducción en log	Recuento final: log UFC/g	% E	Reducción en log
Extracto de toronja comercial	1,8	98,108	1,8	0	95,000	1,3
Vinagre comercial	0	99,973	3,8	0	95,000	1,3
Solución cítrica comercial	0	99,973	3,8	0	95,000	1,3
Amonio cuaternario comercial	0	99,973	3,8	0	95,000	1,3

Supermercados  
muestra: Supermercado Gran Sol # 2

	Coliformes			<i>E.coli</i>		
Recuento inicial:	5,9 log			1 log		
Desinfectantes	Rcto final: log UFC/g	% E	Reducción en log	Rcto final: log UFC/g	% E	Reducción en log
Extracto de toronja comercial	3,5	99,630	2,4	0	90	1
Vinagre comercial	3,3	99,753	2,6	0	90	1
Solución cítrica comercial	3,2	99,802	2,7	0	90	1
Amonio cuaternario comercial	3	99,881	2,9	0	90	1

#### 2.4.4 ANALISIS SENSORIAL DEL PRODUCTO POSTRATAMIENTO CON DESINFECTANES COMERCIALES.

Del análisis sensorial realizado a 30 jueces no entrenados se determinó que el vinagre es el de mayor agrado seguido del amonio cuaternario comercial, extracto de toronja y solución cítrica (Figura 23)

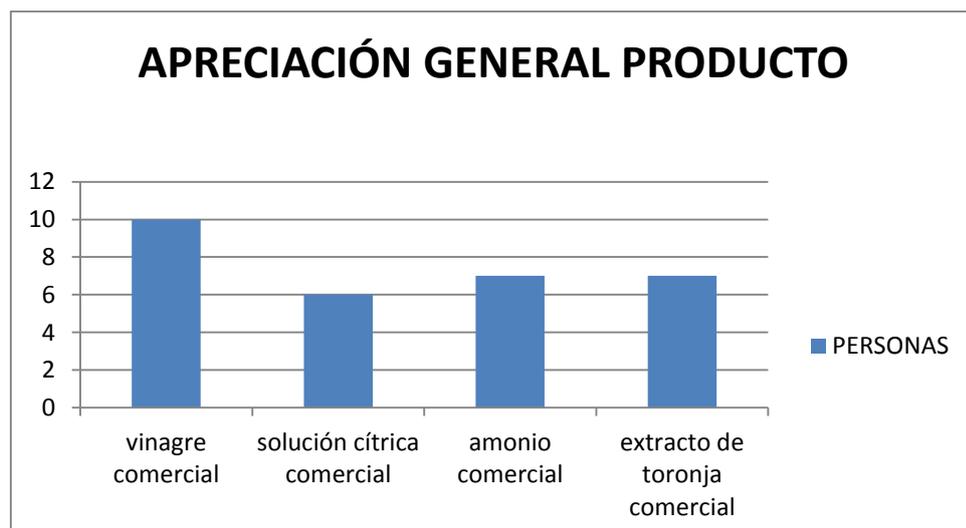


Figura 23. Resultados de Apreciación general a 30 jueces no entrenados

## CAPITULO 3

### DISCUSIÓN

Se observa en este estudio que las lechugas recolectadas de los mercados y ferias agroecológicas proceden de diferentes sectores de la Ciudad de Cuenca siendo más comunes en el caso de los mercados: Sayausí y San Joaquín, en el caso de las ferias agroecológicas: Quingeo y Jadán mientras en los supermercados tienen uno o dos proveedores frecuentes, sin embargo según los resultados obtenidos en estos lugares no se observa una relación de contaminación por la fuente de procedencia.

Los resultados del análisis microbiológico con respecto a coliformes totales revela que el 37% del total de muestras de lechugas recolectadas de los mercados, supermercados y ferias agroecológicas superan los límites de M ( $>10^3$ ) por lo que pertenecen a la categoría rechazables o que constituyen un riesgo para la salud del consumidor según lo establecido por la normativa cubana NC 585:2015 numeral 3.7, presentando un mayor índice de contaminación los supermercados (25%) y un menor índice (5%) las ferias agroecológicas), lo cual podría deberse a la baja rotación de estos productos en los supermercados a pesar de que se encuentren refrigerados, puesto que la gente que acude a estos lugares comúnmente buscan las lechugas hidropónicas y que están empacadas en funda antes que las que están sin protección en los anaqueles como es el caso de nuestro producto, lo que no ocurre en los mercados y ferias agroecológicas en donde la rotación de estos productos es mayor.

Según (Dominguez, García, & Arias, 2009) la temperatura y el tiempo juegan un papel importante en la conservación y transporte de los productos perecederos como es el caso de la lechuga siendo la duración recomendada de 7 a 21 días, la cual requiere condiciones óptimas de almacenamiento: 0-2°C, 97-99% HR, según lo señalado por (Aguero, 2011) esto se relaciona además con un estudio de (Rojas, 2005), el cual encontró que tres tipos de patógenos de *E.coli* se multiplicaron en rebanadas de jitomate, pepino, lechuga picada mantenidos en refrigeración, no obstante la multiplicación se presentó después del tercer día de almacenamiento de los vegetales.

Debido a que *E.coli* en este estudio tiene un 3% de rechazables del total de las 60 muestras recolectadas que pertenecen únicamente a los mercados puesto que los supermercados y ferias agroecológicas tiene un mayor índice de lechugas dentro de los límites de aceptabilidad que corresponden al 32 y 28% respectivamente se realizó el análisis estadístico de varianza con los resultados obtenidos de coliformes totales hallándose que no existe una diferencia significativa ( $\alpha=0,05$ ) en la contaminación entre las ferias agroecológicas no rechazándose por tanto la hipótesis nula mientras que en los

mercados y supermercados se rechaza la hipótesis nula debido a que presentan diferencias significativas en su contaminación con coliformes ( $\alpha=0,05$ ). Esto se debe a que los productores en las ferias agroecológicas se apegan a un modelo de gestión que deben cumplir para ser considerados como agroecológico y es él mismo productor el que vende sus productos, no hay intermediarios lo que disminuye además la contaminación por manipulación, esto explica además que las ferias agroecológicas presenten una menor proporción de lechugas que superan los límites de aceptabilidad que corresponde al 15%, comparados con los mercados y supermercados.

Se observa además en este estudio que los resultados de coliformes totales entre los tres tipos de estratos o sectores no tienen diferencia significativa en contaminación ( $\alpha =0,05$ ) no rechazándose por lo tanto la hipótesis nula, ya que si bien hay diferencias entre las medias intragrupo con excepción de las ferias agroecológicas sin embargo no son tan amplias repercutiendo por tanto en la igualdad de las medias totales.

En el presente trabajo, el porcentaje de aislamiento de *Listeria spp.*, mediante el método ANSR fue bajo, únicamente se aislaron dos muestras, una de ellas a partir de una lechuga recolectada de los mercados y la otra de las ferias agroecológicas .representando el 3,33 % del total de muestras recolectadas. Una de las posibles causas sería el uso de aguas de riego o aguas contaminadas para el desarrollo del cultivo según lo señalado por (Clavijo, 2011), estos resultados se relacionan con un estudio realizado en 90 muestras de lechuga variedad Batavia y Romana aislándose *Listeria monocytógenes* en tres muestras para una prevalencia del 3,3% lo cual nos indica la importancia de establecer las fuentes y rutas de contaminación en este tipo de productos. (Luna, Romero, & Lozada, 2009).

Los resultados además muestran la importancia de mantener las condiciones higiénicas a lo largo de la poscosecha a fin de lograr un mayor control microbiológico porque a pesar que *Listeria spp.* se encuentre a niveles bajos en el producto contaminado el microorganismo puede multiplicarse durante el almacenamiento incluso en la refrigeración ya que es un psicótrofo según lo señalado por (Luna, Romero, & Lozada, 2009)

De los desinfectantes analizados en los ensayos con bacterias inoculadas en la lechuga se observa según el criterio de eficiencia estipulado por el test de Chambers que la solución cítrica comercial es la que presenta mayor efectividad sobre *Listeria monocytógenes* y *E.coli* en concentración normal (0,33%v/v) y doble (0,66%v/v), los tiempos más efectivos corresponden a 5 y 10 minutos ya que en el primer caso el conteo inicial de 6,2 log luego de la desinfección pasa a 0 log, es decir 100% efectivo, en cambio para *E.coli*, el conteo inicial es de 8,2 log y luego de la desinfección pasa a 3,1 log, un 99,999% de eficacia, estos resultados se relacionan con los obtenidos en los ensayos de inhibición debido a que el producto evaluado contiene varios componentes como: ácido

cítrico, ácido ascórbico así como compuestos de amonio cuaternario (cloruro de benzalconio), entre otros que pudieran estar causando un efecto sinérgico antimicrobiano en comparación con el resto de los tratamientos utilizados (Troya, 2007)

Los otros desinfectantes estudiados no cumplen con las características de un desinfectante "ideal" según lo señalado por (Romero, 2013) ya que a baja concentración debe tener un amplio espectro de actividad antimicrobiana (tanto Gram positivas como Gram negativas) lo cual no ocurre puesto que según los resultados obtenidos son efectivas frente a *E.coli* o *L. monocytógenes* y requieren mayor concentración e incluso tiempo de contacto encareciendo por lo tanto el producto desinfectante.

Además se observa una mayor actividad inhibitoria de la solución cítrica sobre *Listeria monocytógenes* que sobre *E.coli*, ya que ésta última al ser una bacteria Gram negativa es más resistente a los antisépticos y desinfectantes que las Gram positivas debido a que poseen una barrera de permeabilidad selectiva adicional que es la membrana externa. (Medina & Valencia, 2008).

El amonio cuaternario comercial en las pruebas in vitro de inhibición muestran mejor efectividad que en los resultados de las pruebas de inoculación in vivo lo cual puede deberse a la presencia de materia orgánica en la superficie de la lechuga que contribuye a disminuir la efectividad (Luna, Romero, & Lozada, 2009) requiriendo por lo tanto doble concentración (0,66%v/v) y mayor tiempo de contacto (10 minutos) para alcanzar 99,999% de efectividad frente a *E.coli* y *L. monocytógenes*.

Según el criterio Chambers los resultados obtenidos de la prueba in vivo luego de aplicar los desinfectantes sobre la contaminación real de coliformes y *E.coli* de las lechugas provenientes de los mercados, supermercados y ferias agroecológicas muestran en su mayoría una buena reducción de la carga microbiana presente produciéndose incluso la reducción total en las muestras que parten de un recuento inicial bajo sin embargo ninguno presentaría una acción desinfectante ideal tomando en cuenta que los niveles de contaminación fueron menores que los que se usaron al ser inoculados artificialmente en el producto de la prueba in vitro (8 log) y que los tiempos de acción superan los 30 segundos establecidos según lo estipulado por Chambers. Estos datos hallados concuerdan con los obtenidos en estudios similares como el realizado por (López, Romero, & Ureta, 2001), los cuales encontraron que al aplicar dos tipos de desinfectantes (ácido peracético y extracto de toronja) ninguno tenía el 99,999% de eficiencia o una reducción de tres logs al aplicarse sobre frutilla y lechuga, deduciéndose por lo tanto que ningún tratamiento químico o físico usado corrientemente para desinfectar frutas y vegetales puede ser confiable para eliminar todo tipo de patógenos de los tejidos superficiales o internos.

La diferencia del porcentaje de eficiencia entre las dos pruebas in vivo se explicaría porque las condiciones de contaminación del producto en fresco son diferentes que al ser inoculados ya que en éste existe flora asociada cuya remoción es difícil debido que se encuentra formando biofilms o están ocupando lugares poco accesibles como aberturas naturales o heridas según lo señalado por (Garmendia & Vero, 2006) o pueden introducirse en los estomas impidiendo la actividad eficiente de los desinfectantes (Vidaver & Lambrecht, 2004). Existe también un balance competitivo entre la población de *E.coli* y la microbiota presente en el alimento que ha adquirido del suelo, agua, manipulación, favoreciendo el desarrollo del patógeno e impidiendo la acción efectiva del desinfectante (Luna, Romero, & Lozada, 2009).

El análisis de la apreciación general del producto muestra que no hay una diferencia significativa en la aceptación entre los cuatro desinfectantes utilizados, sin embargo la lechuga con vinagre tiene mejor aceptabilidad debido a su sabor ácido agradable proveniente de la fermentación de frutas utilizadas para su preparación, al cual se está acostumbrado en nuestro medio debido a su uso común en la preparación de las vinagretas, estos resultados permiten establecer que al aplicar estos desinfectantes en la concentración y tiempo recomendado por el fabricante no se vería afectada la calidad sensorial de la lechuga.

## CONCLUSIONES

1. Todos los mercados, supermercados y ferias agroecológicas presentan contaminación con coliformes totales, siendo el 37% las que superan los criterios microbiológicos establecidos en la norma cubana NC 585:2005 utilizada como referencia al no existir en el Ecuador este tipo de norma para productos vegetales frescos, por lo que pueden constituir un riesgo para la salud de los consumidores..
2. El mayor porcentaje de contaminación con coliformes totales (25%) corresponde a los supermercados, lo cual pudiera deberse a la poca rotación de este producto en esos establecimientos.
3. El porcentaje de muestras contaminadas con *E. coli* que superan los límites normativos de referencia ( $>10^2$ ), corresponde al 3% del total de muestras recolectadas.
4. *Listeria* spp. se aisló solamente en dos muestras mediante el método de Biología Molecular ANSR de Neogen, representando el 3,33% del total de muestras analizadas.
5. No se encontró una relación estadísticamente significativa entre el tipo de mercado y el lugar de procedencia con el grado de contaminación de las lechugas.
6. De los desinfectantes utilizados la solución cítrica comercial es la que presenta mejor efectividad ya que actúa sobre las 2 bacterias patógenas (*E.coli* y *L. monocytogenes*) y en el tiempo y dosis recomendada por el fabricante según las pruebas de laboratorio tanto in vitro por inhibición como in vivo por inoculación.
7. El resto de desinfectantes estudiados (extracto de toronja comercial, amonio cuaternario comercial y el vinagre), presenta más efectividad frente al uno u otro contaminante o requieren mayor concentración o tiempo de contacto.
8. In vivo sobre la flora bacteriana normal de las lechugas de los mercados se pudo determinar que estos desinfectantes logran una buena reducción de las cargas microbianas presentes naturalmente en las lechugas frescas pero no alcanzan el 99,999% de eficiencia de acuerdo al criterio de Chambers.
9. En general los resultados muestran que los diversos desinfectantes analizados presentan variación en su eficiencia contra la contaminación microbiana sin

embargo se debe utilizar posterior al enjuague de la fruta o vegetal crudo, alguno de estos desinfectantes para reducir significativamente las cargas microbianas que pudiesen estar presentes evitar de esta manera las ETA.

## RECOMENDACIONES

1. Los supermercados donde se expenden lechugas de la variedad criolla deben realizar controles permanentes de la cadena de frío, así como el control de la rotación de estos productos.
2. Sería importante establecer las rutas y fuentes de contaminación mediante la implementación de un sistema de trazabilidad en estos productos a fin de aplicar las medidas preventivas necesarias.
3. Debe tenerse en cuenta que la mejor forma de lograr un producto con baja carga microbiana es evitar que el mismo se contamine siguiendo Buenas Prácticas Agrícolas previo y posterior a la cosecha y no depender de medidas correctivas de descontaminación.
4. Cabe recalcar que la efectividad del desinfectante se ve afectada por el tiempo de exposición y la dosificación, por lo que es muy importante seguir las recomendaciones del fabricante. Por otro lado, en caso de que por instrucciones del fabricante se requiera un enjuague después de la desinfección, se debe usar agua purificada o hervida, para evitar la recontaminación.
5. Se debe tener en cuenta que existen marcas que tienen presentaciones con diferente concentración del desinfectante y diferente dosificación por lo que antes de adquirir el producto, se debe leer bien la etiqueta para obtener un rendimiento óptimo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguero, V. (2011). *Modelado de la evolución de los índices de calidad integral de lechuga mantecosa desde la precosecha hasta el consumidor*. Tesis, Universidad de la Plata.
- Burt, S. (1 de Agosto de 2004). *Aceites esenciales: sus propiedades antibacterianas y aplicaciones potenciales en alimentos*. Universidad de Utrecht, P.O, Departamento de salud publica y alimentación sana. Int J Food Microbiol.
- Campos D, & Manzano, W. (2007). *Evaluación de métodos de desinfección para hortalizas que se consumen en crudo*. Tesis, Universidad de el Salvador, Ingeniería de alimentos.
- Clavijo, G. (3 de julio de 2011). Hortalizas contaminadas. *Diario el Mercurio*.
- Dominguez, L., Badiola, J., Cepeda, A., Rodriguez, E., Zurera, G., & Téllez, S. (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria. *Revista del Comité científico*(12), 48 Y 49.
- Garmendia, G., & Vero, V. (2006). *"Métodos de desinfección de frutas y hortalizas"*. UDELAR, Cátedra de Microbiología. Facultad de Química.
- Ginestre, M., Añez, S., Rincón, G., Castellano, M., Avila, V., Colina, G., y otros. (2009). Ingredientes indicadores entéricos en Vegetales frescos que se comercializan en mercados populares de Maracaibo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 2(1), 52-56.
- Iáñez, E. (1998). Acción de los agentes químicos sobre las bacterias. En H. d. Biología (Ed.), *Curso de Microbiología general*. Argentina.
- Jaimes, S., & Gomez, L. (2011). *EVALUACIÓN DE UN PRODUCTO A BASE DE ÁCIDOS ORGÁNICOS FRENTE A E.coli y Salmonella spp, EN LA DESINFECCIÓN DE LECHUGA FRESCA*.
- Levin, R., & Rubin, D. (2004). *Estadística para Administración y Economía*. México: Pearson Educación Inc. .
- López, L., Romero, J., & Ureta, V. (2001). Tratamientos de desinfección de lechugas (*Lactuca sativa*) y frutillas (*Fragaria chiloensis*). (ALAN, Ed.) 51(4), 376-381.
- Luna, G., Romero, A., & Lozada, H. (2009). *Evaluación de la efectividad de algunos antimicrobianos frente a Listeria monocytógenes en lechuga*. Universidad Jorge Tadeo Lozano, Dirección de Investigación. Bogotá: UTADDO.
- Marriot, N. (2003). *Principles of food sanitation*. Gaithersburg(MD) Aspen.
- Medina, L., & Valencia, L. (2008). *Evaluación de la eficacia de un desinfectante de alto nivel, a base de peróxido de hidrogeno, empleado en la esterilización de dispositivos e instrumentos hospitalarios*. Tesis, Pontifica Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial, Bogotá.

- Muñoz, A., Vargas, M., Otero, L., & Guzmán, V. (Septiembre de 2011). Presencia de *Listeria monocytógenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena. *Biomédica*, 31(3), 428-439.
- Normativa cubana 585. (2015). *Criterios microbiológicos en alimentos requisitos sanitarios:67.020; 07.100.30 4ta.edición*. Recuperado el 25 de junio de 2015, de [www.nc.cubaindustria.cu](http://www.nc.cubaindustria.cu) cuban national bureau of standards.
- Ocares, M. (2012). *Acción antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas sobre Escherichia coli y Salmonella spp.* Tesis, Universidad austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Ingeniería en Alimentos, Valdivia-Chile.
- Pachuca, H. (2006). *Frecuencia y comportamiento de Salmonella, Escherichea coli y organismos coliformes en chile serrano y jalapeño.* Tesis, Universidad autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básucas e Ingeniería. Centro de Investigaciones Químicas.
- Rojas, M. (2005). *Comportamiento de tres grupos de patógenos de E.coli en 4 tipos de verduras crudas.* Tesis de Licenciatura química, Universida autónoma del Estado de Hidalgo, Centro de Investigaciones químicas.
- Romero, N. (2013). *"Evaluación del Efecto de desinfectantes y Desengrasantes Naturales en Equipos de pasteurización de una planta de Lácteos"*. Tesis, Escuela de Ingeniería en Industrias Pecuarias. Facultad de Ciencias Pecuarias, Riobamba-Ecuador.
- Socco. (2004). *El estado de los mercados productos básicos agrícolas.* Boletín, Departamento Económico y social. FAO.
- Tenesaca, A. (2010). *Dosis letales invitro de cuatro funguicidas químicos en el control de la pudrición basal de la lechuga producida por sclerotinia sclerotiorumde bary.* Tesis, Facultad de Ingeniería Agronómica.
- Tixilema, S. (2015). *Desarrollo de una tecnología innovadora de procesamiento mínimo para la conservación de hortalizas frescas lechuga (Lactuca sativa l.), col de repollo (Brassica oleracea var. capitata), col morada (Brassica oleracea var. lambarda), espinaca (Spinacia ol.* Tesis, Universidad Técnica de Ambato, Ingeniería de alimentos, Ambato.
- Troya, J. (2007). *Evaluación de la Efectividad de los desinfectantes Divosan Forte y MH en la desinfección de Equipos y áreas de Trabajo en una empresa procesadora de helados.* Tesis, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología Industrial, Bogotá.
- Vidaver, A., & Lambrecht, P. (2004). *Las bacterias como patógenos vegetales. Introducción a los grupos de patógenos.* (Romero, & A. M. Romero, Trads.)

## REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

- Dominguez, M., García, C., & Arias, J. (2009). *Recomendaciones para la conservación y transporte de alimentos perecederos*. Recuperado el 8 de junio de 2015, de Grupo Dominguez Instituto del Frío : <http://www.grupodominguezinstitutodelfrio.es/>
- García, J. (2007). *Ingredientes antimicrobianos*, power point. pdf. (Chemital s.a.) Recuperado el 5 de junio de 2015, de <http://www.higienealimentaria.com/jornadalucta/Ingredientes%20antimicrobianos.pdf>
- García, J. (2011). *Aplicación de ácidos orgánicos como conservantes de productos cárnicos.*, power point. pdf. (Chemital Tecnicas alimentarias BTC) Recuperado el 16 de junio de 2015, de [http://www.inofood.cl/neo\\_2011/pdf/PRE\\_PDF/LUNES\\_TARDE\\_2/Microsoft%20PowerPoint%20-%20JAVIER%20GARCIA%20PINA%20-%20CHEMITAL%20%5BModo%20de%20compatibilidad%5D.pdf](http://www.inofood.cl/neo_2011/pdf/PRE_PDF/LUNES_TARDE_2/Microsoft%20PowerPoint%20-%20JAVIER%20GARCIA%20PINA%20-%20CHEMITAL%20%5BModo%20de%20compatibilidad%5D.pdf)
- Granda, J. (2014). *Anuario de vigilancia Epidemiológica*. Recuperado el 3 de junio de 2015, de <https://public.tableau.com/profile/vvicentee80#!/vizhome/ETAS-2014/ANUARIO>
- HyServe. (2010). *Compact dry para la detección de la bacteria*. Recuperado el 29 de junio de 2015, de <http://www.hyserve.com/index.php?lang=es>
- La AOAC y la aprobación de métodos oficiales (en línea). <http://www.innovay.info/docs/presentaciones/20111013/MarinaTorres.pdf>. (Consulta: 17 de mayo del 2015)
- Neogen, C. (2012). *ANSR para Listeria*. Recuperado el 28 de mayo de 2015, de [www.neogenansr.com](http://www.neogenansr.com)

## ANEXOS

## Anexo 1

Tabla de límites establecidos por Norma Cubana 585 2015 para coliformes totales y *E.coli*

Grupo 12 – Frutas y hortalizas						
Alimento	Categoría	Parámetro	Límites por g o mL			
			n	c	m	M
Frutas frescas y congeladas	5	<i>E. coli</i>	5	2	<10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
	10	St. coagulasa posit.	5	Ausencia		
	10	<i>Salmonella</i> en 25 g	5			
Hortalizas frescas y congeladas	5	Coliformes	5	2	<10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
	5	<i>E. coli</i>	5	2	10	10 <sup>2</sup>

## Anexo 2

Tabla de límites establecidos por Norma Peruana (2003) para *Listeria spp.* basada en límites de *Listeria monocytógenes*.

14.2 Frutas y hortalizas frescas semiprocesadas (lavadas, desinfectadas, peladas, cortadas y/o precocidas), refrigeradas y/o congeladas.						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g.	
					m	M
Aerobios Mesófilos	1	3	5	3	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	2	10	10 <sup>2</sup>
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia/25 g	-----
<i>Listeria monocytógenes</i> (*)	10	2	5	0	Ausencia/25 g	-----

## Anexo 3

Numero total de muestras de lechuga según el lugar de procedencia de Mercados

LUGAR DE PROCEDENCIA									
MERCADOS	Sayausí	San Joaquín	Baños	Barabón	Sidcay	El Valle	Tarqui	Tutupali	Total
12 DE ABRIL	2	3							5
FERIA LIBRE	2		2	1					5
10 DE AGOSTO	2	1			1	1			5
9 DE OCTUBRE	2			1			1	1	5
TOTAL DE MUESTRAS	8	4	2	2	1	1	1	1	20

**Anexo 4****Numero total de muestras de lecuga según el lugar de procedencia de Ferias agroecológicas**

FERIAS AGROECOLOGICAS	LUGAR DE PROCEDENCIA									Total
	Sayausí	Quingeo	Sinincay	Octavio Cordero	Tarqui	Jadán	San Joaquín	El valle	Barabón	
12 DE ABRIL				2	1			2		5
FERIA LIBRE	1	1	1			1		1		5
CONSEJO PROVINCIAL		2			1	2				5
TOTORACOCHA	1	2					1		1	5
<b>TOTAL DE MUESTRAS</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>		<b>1</b>	<b>20</b>

**Anexo 5****Numero total de muestras de lecuga según el lugar de procedencia de Supermercados.**

SUPERMERCADOS	LUGAR DE PROCEDENCIA			TOTAL
	Sayausí	San Joaquín	Granja Particular	
COMISARIATO POPULAR			5	5
GRAN SOL		5		5
SANTA CECILIA	5			5
CORAL HIPERMERCADOS		5		5
<b>TOTAL DE MUESTRAS</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>20</b>

**Anexo 6****Encuesta para establecer la apreciación general del producto.**

Por favor hacer la siguiente degustación tomando en consideración el color, olor sabor, textura, aspecto general y señale con una X cual es el de su mayor agrado.

MUESTRAS	RESULTADO
0806V	
0806K	
0806S	
0806Vn	

## Anexo 7

Tabla de resultados obtenidos de coliformes totales y E.coli en cada uno de los mercados, ferias agroecológicas y supermercados.

MERCADOS					FERIAS AGROECOLOGICAS					SUPERMERCADOS				
MERCADO 12 DE ABRIL	LUGAR DE PROCEDENCIA	COLIFORMES log UFC/g	<i>E.coli</i> / log UFC/g	RESULTADOS <i>Listeria spp.</i>	FERIAS AGROECOLOGICAS 12 DE ABRIL	LUGAR DE PROCEDENCIA	COLIFORMES log UFC/g	<i>E. coli</i> / log UFC/g	RESULTADO <i>Listeria spp.</i>	SUPERMERCADO COMISARIATO POPULAR	LUGAR DE PROCEDENCIA	COLIFORMES log UFC/g	<i>E. coli</i> / log UFC/g	RESULTADOS <i>Listeria spp.</i>
M 12 Nº 1	SAYAUSI	4,9	<1	NEGATIVO	FA12 Nº1	OCTAVIO CORDERO	2,1	<1	NEGATIVO	SCPNº1	LUGAR PARTICULAR	3,2	<1	NEGATIVO
M12 Nº2	SAYAUSI	4,7	<1	NEGATIVO	FA12 Nº2	EL VALLE	2,3	<1	NEGATIVO	SCPNº2	LUGAR PARTICULAR	4,0	<1	NEGATIVO
M12 Nº3	SAN JOAQUIN	2,5	<1	NEGATIVO	FA12 Nº3	EL VALLE	2,4	<1	NEGATIVO	SCPNº3	LUGAR PARTICULAR	3,1	<1	NEGATIVO
M12 Nº4	SAN JOAQUIN	2,3	<1	NEGATIVO	FA12 Nº4	TARQUI	2,9	1,3	NEGATIVO	SCPNº4	LUGAR PARTICULAR	4,9	<1	NEGATIVO
M12 Nº5	SAN JOAQUIN	3,9	2,08	NEGATIVO	FA12 Nº5	OCTAVIO CORDERO	2,2	<1	NEGATIVO	SCPNº5	LUGAR PARTICULAR	3,7	<1	NEGATIVO
MERCADO FERIA LIBRE	LUGAR DE PROCEDENCIA	COLIFORMES log UFC/g	<i>E.coli</i> / log UFC/g	RESULTADOS <i>Listeria spp.</i>	FERIA AGROECOLOGICA FERIA LIBRE	LUGAR DE PROCEDENCIA	COLIFORMES log UFC/g	<i>E. coli</i> / log UFC/g	RESULTADO <i>Listeria spp.</i>	SUPERMERCADO GRAN SOL	LUGAR DE PROCEDENCIA	COLIFORMES log UFC/g	<i>E. coli</i> / log UFC/g	RESULTADOS <i>Listeria spp.</i>
MFL Nº1	BAÑOS	1,3	<1	NEGATIVO	FAFLNº1	EL VALLE	<1	<1	NEGATIVO	SGSNº1	SAN JOAQUIN	3,1	<1	NEGATIVO
MFL Nº2	SAYAUSI	1,8	<1	POSITIVO	FAFLNº2	QUINGEO	2,3	<1	NEGATIVO	SGSNº2	SAN JOAQUIN	5,9	1	NEGATIVO
MFLNº3	BARABON	2,1	<1	NEGATIVO	FAFLNº3	SININCAI	<1	<1	NEGATIVO	SGSNº3	SAN JOAQUIN	3,1	<1	NEGATIVO
MFLNº4	SAYAUSI	1,8	<1	NEGATIVO	FAFLNº4	JADAN	3,4	1,3	NEGATIVO	SGSNº4	SAN JOAQUIN	2,7	<1	NEGATIVO
MFLNº5	BAÑOS	1,0	<1	NEGATIVO	FAFLNº5	SAYAUSI	3,0	1	NEGATIVO	SGSNº5	SAN JOAQUIN	3,3	<1	NEGATIVO
MERCADO 10 DE AGOSTO	LUGAR DE PROCEDENCIA	COLIFORMES log UFC/g	<i>E.coli</i> / log UFC/g	RESULTADOS <i>Listeria spp.</i>	FERIA AGROECOLOGICA CONSEJO PROVINCIAL	LUGAR DE PROCEDENCIA	COLIFORMES log UFC/g	<i>E. coli</i> / log UFC/g	RESULTADO <i>Listeria spp.</i>	SUPERMERCADO SANTA CECILIA	LUGAR DE PROCEDENCIA	COLIFORMES log UFC/g	<i>E. coli</i> / log UFC/g	RESULTADOS <i>Listeria spp.</i>
M10 Nº1	SAYAUSI	2,6	1,5	NEGATIVO	FACPNº1	CARMEN DE JADÁN	<1	<1	NEGATIVO	SSCNº1	SAYAUSI	2,4	<1	NEGATIVO
M10 Nº2	SAYAUSI	2,9	1,0	NEGATIVO	FACPNº2	QUINGEO	2,7	<1	NEGATIVO	SSCNº2	SAYAUSI	1,5	<1	NEGATIVO
M10 Nº3	SAN JOAQUIN	2,3	<1	NEGATIVO	FACPNº3	QUINGEO	2,4	<1	NEGATIVO	SSCNº3	SAYAUSI	4,4	<1	NEGATIVO
M10 Nº4	SIDCAY	4,1	<1	NEGATIVO	FACPNº4	TARQUI	2,3	<1	NEGATIVO	SSCNº4	SAYAUSI	1,5	<1	NEGATIVO
M10 Nº5	EL VALLE	2,9	1,9	NEGATIVO	FACPNº5	JADÁN	<1	<1	NEGATIVO	SSCNº5	SAYAUSI	1,3	<1	NEGATIVO
MERCADO 9 DE OCTUBRE	LUGAR DE PROCEDENCIA	COLIFORMES log UFC/g	<i>E.coli</i> / log UFC/g	RESULTADOS <i>Listeria spp.</i>	FERIA AGROECOLOGICA TOTORACOCHA	LUGAR DE PROCEDENCIA	COLIFORMES log UFC/g	<i>E. coli</i> / log UFC/g	RESULTADO <i>Listeria spp.</i>	SUPERMERCADO CORAL HIPERMERCADOS	LUGAR DE PROCEDENCIA	COLIFORMES log UFC/g	<i>E. coli</i> / log UFC/g	RESULTADOS <i>Listeria spp.</i>
M9Nº1	SAYAUSI	2,6	<1	NEGATIVO	FATNº1	SAN JOAQUÍN	2,0	<1	NEGATIVO	SCHNº1	SAN JOAQUÍN	3,3	<1	NEGATIVO
M9Nº2	SAYAUSI	2,7	1,5	NEGATIVO	FATNº2	BARABÓN	4,5	<1	NEGATIVO	SCHNº2	SAN JOAQUÍN	3,8	<1	NEGATIVO
M9Nº3	TARQUI	2,8	1,8	NEGATIVO	FATNº3	QUINGEO	2,8	<1	POSITIVO	SCHNº3	SAN JOAQUIN	4,0	<1	NEGATIVO
M9Nº4	TUTUPALI	2,9	2,7	NEGATIVO	FATNº4	QUINGEO	2,4	<1	NEGATIVO	SCHNº4	SAN JOAQUÍN	3,6	<1	NEGATIVO
M9Nº5	BARABON	1,6	<1	NEGATIVO	FATNº5	SAYAUSI	2,2	<1	NEGATIVO	SCHNº5	SAN JOAQUÍN	3,5	<1	NEGATIVO

Anexo 8

FOTOS



Recolección y transporte de muestras



Siembra en compact dry

Colonias de E. coli/coliformes



Cortes de lechuga 5x5 en cámara flujo Laminar

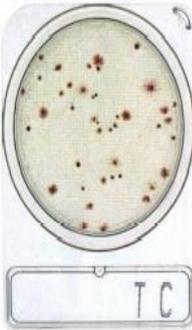
Halos de inhibición



Análisis de Listeria por método ANSR

Anexo 9

**Compact Dry TC**



**Es una placa cromogenica lista para usar para el recuento total de gérmenes vivos** Compact Dry TC es un medio que contiene agar de cultivo estándar y que sirve para comprobar el recuento total. Debido a la sal de tetrazolo, indicador redox, las colonias de bacterias presentan una coloración roja, pudiéndose con ello distinguir muy fácilmente de posibles restos de alimentos.

**Tratamiento previo de las muestras**  
**Cantidad de gérmenes vivos en el agua o en alimentos líquidos**  
 Aplique 1 ml de la muestra (dilúyala en caso necesario) en el centro de la placa Compact Dry.

**Cantidad de gérmenes vivos en alimentos sólidos**  
 Agregue una solución búfer a la prueba y homogenice la en el Stomacher®, Aplique 1 ml de la muestra (dilúyala en caso necesario) en el centro de la lámina seca de la placa Compact Dry.

**Cantidad de gérmenes vivos en la muestra de la prueba de hisopo**  
 Frote la superficie con el hisopo y colóquelo en el dispositivo con la solución de absorción. Aplique 1 ml de la solución de absorción (dilúyala en caso necesario) en el centro de la placa Compact Dry.

**Instrucciones para la prueba**

1. Abra la cubierta y deje caer una gota de la muestra sobre la parte central de la placa Compact Dry.
2. La muestra se dispersa automática y homogéneamente sobre la lámina, y transforma la lámina seca en un gel en pocos segundos.
3. Vuelva a colocar la cubierta sobre la placa y anote la información necesaria en la sección de memorando.
4. Gire la placa cerrada y colóquela en la incubadora.
5. Después de la incubación, cuente el número de colonias coloreadas en la parte posterior de la placa. El papel blanco colocado debajo de la placa le ayudará a contar las colonias.

**Tiempo de incubación** 48 ± 3 horas

**Temperatura de incubación** 35 ± 2 °C ( AOAC) 30 ± 2 °C ( NordVal, MicroVal)

También puede utilizar el tiempo/temperatura de incubación recomendados en las reglamentaciones nacionales para el recuento total de gérmenes vivos.

**Interpretación de los resultados**  
 Casi todas las colonias que crecen son de color rojo. Las colonias rojas, junto con las de otros colores, arrojan el recuento total

**Conservación y vida en almacenaje**  
 Consérvese a temperatura ambiente (+ 1 a +30 ° C). Vida en almacenaje total después de la fabricación: 18 meses.

**Notas**

- Es posible que algunas colonias no presenten un color rojo claramente definido.
- Las altas concentraciones en las placas hacen que toda el área de crecimiento se vuelva roja/rosa. En este caso, diluya la muestra.
- Después del uso, tenga en cuenta las regulaciones vigentes sobre la eliminación de residuos.
- El área de crecimiento es de 20 cm². En la parte posterior de la placa hay una cuadrícula de 1 cm x 1 cm, gravada para facilitar el recuento de las colonias. Si tiene dificultades en contar las colonias debido a que existe un gran número de ellas, el recuento total de gérmenes vivos se puede obtener multiplicando por 20 el número promedio de colonias por cuadrícula de varias cuadrículas.
- Las placas Compact Dry se producen en una ubicación certificada según ISO 9001.

• AOAC approval No. 010404  
 • MicroVal approval No.0703-001LR  
 • NordVal approval No. 033

ITEM	ESPECIFICACION	OBSERVACIONES
Apariencia	Hoja de amarillo claro. No presenta partículas	Control visual
pH	6.8 – 7.2	Medida con pHmetro
Perdida por desecación	Menor al 10%	Control visual
Prueba de esterilidad	No hay crecimiento de colonias si se incuban a 30C por 5 días	Control visual
Rendimiento	Los siguientes cepas de prueba se inocularon y se incubaron a 35 C durante 44- 48 horas, debe observarse buen crecimiento de: <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Control Visual



V CONGRESO BINACIONAL DE CIENCIA TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN DE LAS UNIVERSIDADES  
DEL SUR DEL ECUADOR Y NORTE DEL PERÚ (AUSENP 2015)

Chimbote, 14 de septiembre de 2015

Docente:  
Malena Herrera Arcentales  
Universidad de Cuenca  
Ecuador

Asunto: Aceptación de trabajo para  
Ponencia V AUSENP 2015

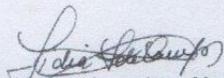
Tengo a bien dirigirme a usted para expresarle un cordial saludo y, a la vez, comunicarle que su trabajo:

**VALIDACIÓN DE DESINFECTANTES CASEROS PARA EL CONTROL DE ESCHERICHIA COLI Y  
LISTERIA MONOCYTOGENES EN LECHUGA**

ha sido revisado por el Comité Científico respectivo y aceptado como Ponencia para ser expuesto en el V AUSENP 2015. Pudiendo cancelar el derecho de inscripción en cuanto se haga presente en el evento.

Le informo para asegurar su participación en el citado evento.

Atentamente,

  
Lidia Marina Lizaraburu Montero  
V C. B. AUSENP 2015

C.c. Archivo