Efecto del uso de ácido acético, cítrico e hipoclorito de calcio para control de *Escherichia coli* (ATCC 25922) en lechuga (*Lactuca sativa* L.) y chile dulce (*Capsicum annuum* L.)

Mario Mendoza Velásquez
Félix Roberto Cantor Barreiro

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2012

ZAMORANO
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto del uso de ácido acético, cítrico e hipoclorito de calcio para control de *Escherichia coli* (ATCC 25922) en lechuga (*Lactuca sativa* L.) y chile dulce (*Capsicum annuum* L.)

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingenieros en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

Mario Mendoza Velásquez
Félix Roberto Cantor Barreiro

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2012

RESUMEN

Cantor Barreiro, F.R. y M. Mendoza Velásquez. 2012. Efecto del uso de ácido acético, cítrico e hipoclorito de calcio para control de *Escherichia coli* (ATCC 25922) en lechuga (*Lactuca sativa* L.) y chile dulce (*Capsicum annuum* L.). Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. 27 p.

El consumo de vegetales ha incrementado debido a sus beneficios nutricionales y de salud, buscando los consumidores cada vez alternativas naturales para la desinfección. El objetivo de este estudio fue determinar los efectos del ácido acético (AA), cítrico (AC), e hipoclorito de calcio (CL), en factores microbiológicos y físicos en lechuga y chile dulce. Se empleó un diseño experimental completamente al azar evaluando dos concentraciones de cloro (50 y 100 mg/L) y ácidos orgánicos (1000 mg/L) de forma individual y mezclados, en chile dulce y lechuga inoculados con *E. coli* (ATCC 25922). La recuperación de *E. coli* en chile dulce no fue alcanzada, por lo cual la evaluación de antimicrobianos se continúo únicamente en lechuga (4.02 ± 0.01 Log UFC/cm^2). Los tratamientos con mayor reducción ($P<0.05$) fueron mezclas de CL+AA, CL+AC, y AA con reducciones entre 1.32±0.47 y 2.19±0.49 Log UFC/cm^2. Se analizó la capacidad inhibitoria del tratamiento (CL 50 mg/L+ AA 1000 mg/L), a los días cero, tres y cinco a temperaturas de 4 y 12°C. Adicionalmente, se evaluó color y tensión a los días cero, tres y cinco en muestras almacenadas a 12°C. No se pudo establecer efectos bactericidas y/o bacteriostáticos en los tratamientos evaluados. El tratamiento evaluado causó una disminución del valor L y a, mientras que el valor b fue igual al control. Se recomienda el uso de ácido acético para el lavado de lechuga en la planta Post-cosecha y realizar validaciones de su eficacia en condiciones de operación de la planta.

Palabras clave: Ácidos orgánicos, antimicrobianos, desinfección, hortalizas, patógenos.

CONTENIDO

Portadilla i
Página de firmas ii
Resumen iiii
Contenido iv
Índice de cuadros, figuras y anexos v

1 INTRODUCCIÓN 1

2 MATERIALES Y MÉTODOS 3

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 6

4 CONCLUSIONES 19

5 RECOMENDACIONES 20

6 LITERATURA CITADA 21

7 ANEXOS 25

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros Página

1. Conteo de coliformes totales y mesófilos totales en muestras de chile dulce..... 7
2. Validación de concentración inicial de *E. coli* (ATCC 25922) después de 24 horas a 35°C..... 7
3. Validación de inóculo y recuperación de *E. coli* (ATCC 25922) en lechuga..... 8
4. Efecto de tratamiento con cloro, ácido acético, cítrico y mezclas en la reducción de *E. coli* (ATCC 25922) en la superficie de lechuga, a una concentración inicial de 4.02±0.20 Log UFC cm^{-2}..... 9
5. Medición de pH en soluciones desinfectantes de cloro, ácido acético, cítrico y mezclas en la superficie de lechuga, a una concentración inicial de 4.02±0.20 Log UFC cm^{-2}..... 10
6. Recuentos en Log UFC cm^{-2} de *E. coli* (ATCC 25922) en cortes de lechuga inoculadas y tratadas con antimicrobianos..... 12
7. Cálculo de costos variables por litro de solución de cuatro soluciones desinfectantes para el control de *E. coli* para uso en la Planta Hortofrutícola Zamorano..... 17

Figuras Página

1. Efecto de un minuto de exposición a ozono, ácidos orgánicos, y sus combinaciones en poblaciones de *E. coli* O157:H7 en lechuga. 11
2. Cambios en la población de *E. coli* O157:H7 en cortes de lechuga fresca, almacenadas a 5 y 12°C. 12
3. Efecto de un minuto de exposición a 3 mg L^{-1} de ozono, 1000 mg L-1 de ácido cítrico y combinación de las dos en crecimiento poblacional de *E. coli* O157:H7 en lechuga almacenadas a 15°C. 13
4. Comportamiento del valor L (Luminosidad) en hojas expuestas a 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético y hojas sin tratar almacenadas a 12°C durante cinco días. 14
5. Comportamiento del valor a en hojas expuestas a 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético y hojas sin tratar almacenadas a 12°C durante cinco días. 15
6. Comportamiento del valor b en hojas expuestas a 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético y hojas sin tratar almacenadas a 12°C durante cinco días. 16
7. Comportamiento de tensión de ruptura (Newton) en hojas expuestas a 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético y hojas sin tratar almacenadas a 12°C durante cinco días. 17

Anexos Página

1. Composición del medio Violet Red Bile Agar W/ MUG (4-metilumbeliferil-β-D-glucorónido) por un litro. 25
2. Ficha técnica de *E. coli* (ATCC 25922) 25
3. Comportamiento del color de la lechuga tratada con 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético en valores L, a y b en el día cero. 26
4. Comportamiento del color de la lechuga tratada con 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético en valores L, a y b en el día tres 26
5. Comportamiento del color de la lechuga tratada con 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético en valores L, a y b en el día cinco 26
6. Comportamiento de tensión (Newtons) requerida para ruptura de lechuga tratada con 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético almacenada a 12°C durante 5 días. 26
7. Caracterización morfológica de *E. coli* (ATCC 25922). 27
8. Recuento de colonias de *E. coli* (ATCC 25922) 27

1. INTRODUCCIÓN

Las frutas y hortalizas son componentes esenciales de una dieta saludable. Una ingesta de 400 gramos, mínimo diariamente (excluidas las patatas y otros tubérculos feculentos), podría contribuir a la prevención de enfermedades importantes, como las cardiovasculares, la diabetes, la obesidad y algunos cánceres, además de mitigar carencias de micronutrientes. En general, se calcula que cada año podrían salvarse 1.7 millones de vidas si se aumentara lo suficiente el consumo de frutas y verduras (OMS 2012).

Sin embargo, por sus características físicas y de cultivo, los productores hortofrutícolas están expuestos a contaminación de tipo biológica y química, constituyendo un riesgo para la adquisición de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's). *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella, Listeria monocytogenes* y *Shigella* son los microorganismos de mayor incidencia en vegetales frescos y cortados. La contaminación con estos microorganismos puede darse en la pre-cosecha y post-cosecha de los vegetales, a través de irrigación con agua contaminada con heces de humanos o de animales, uso de de abonos orgánicos como estiércol, desconocimiento de las condiciones sanitarias básicas de manipulación, así como deficiente calidad sanitaria del agua utilizada para lavar los vegetales cosechados (Rincón *et al.* 2010). Procesos como cortado y picado incrementan la posibilidad de crecimiento microbiano en la superficie vegetal (Akbas y Ölmes 2007).

Escherichia coli patógeno es uno de los microorganismos que causa un elevado número de casos. En Alemania hubo una disminución en las ventas de frutas y vegetales, debido a un brote con *E. coli* O104:H4, causando síndrome urémico hemolítico en los pobladores; asociado al consumo de pepinos, tomates y lechuga (ECDC 2011). En Tennessee, Ohio y New York se registraron brotes de *E. coli* O145 debido al consumo de lechuga romana, adquiridos como ensaladas en tiendas y restaurantes de estos estados (CDC 2010).

La FAO (2009) tiene a la seguridad alimentaria como su principal mandato y, según la Declaración de la Cumbre Mundial sobre la Alimentación, que se llevó a cabo en noviembre de 1996, se reafirmó el derecho de todos a acceder a una alimentación sana y nutritiva. Por lo cual productores, agencias reguladoras y consumidores, han aumentado la atención en la búsqueda de métodos de desinfección para controlar microorganismos patógenos (Sapers 2001). Los tecnólogos de alimentos además de utilizar el cloro como un agente de desinfección, utilizan otros como el amonio cuaternario, yodo y glutaldehídos en la cadena de procesamiento (JIFSAN 2002).

Sin embargo, organizaciones como la EPA (Agencia de Protección Ambiental, por sus siglas en inglés) realizan estudios sobre los riesgos que puedan tener el uso de agentes químicos así como la resistencia que puedan desarrollar microorganismos patógenos. Por lo anterior se ha aumentado el enfoque en utilizar otras fuentes no químicas, sino

orgánicas para un buen control y una buena desinfección para prevenir la proliferación de esos microorganismos. Akbas y Ölmes (2007), evaluaron la inactivación de *E. coli* (ATCC 25922) y *L. monocytogenes* (ATCC 7644) en lechuga con ácido acético, cítrico y ascórbico. Zhang y Farber (1996) evaluaron combinaciones de ácido acético, láctico y cloro para reducir poblaciones de *L. monocytogenes* en lechuga. Así mismo Inatsu *et al.* (2005) evaluaron el uso de ácido cítrico para control de *E. coli* O157:H7 y Yuk *et al.* (2006) utilizaron ácido acético, cítrico y láctico en lechuga, también para control de *E. coli* O157:H7. Estos autores coinciden en la utilización de concentraciones de 1000 mg L^{-1} de ácido acético, cítrico y láctico con reducciones entre 0.17 a 1.07 Log UFC cm^{-2}. Sin embargo, al utilizar mezclas de ácidos orgánicos con químicos, la reducción de microorganismo es mayor por ejemplo al utilizar 1000 mg L^{-1} de ácido cítrico con 3000 mg L^{-1} de ozono, se observaron reducciones de 2.31 Log UFC cm^{-2} de *E. coli* O157:H7.

Actualmente en la Planta de Post-cosecha de Zamorano no utiliza ningún tipo de solución desinfectante para el tratamiento de hortalizas, específicamente lechuga. Sumado a esto existe la tendencia en la cadena de procesamiento agroindustrial, de una reducción en la utilización de químicos sustituyéndolos por compuestos orgánicos, pero otros argumentan que la mezcla de estos compuestos tanto químicos como orgánicos, son más eficientes reduciendo todavía más poblaciones de microorganismos patógenos. Por lo cual surge la importancia de evaluar ácido cítrico, acético y mezclas con cloro (desinfectante más utilizado en la industria alimentaria) para el proceso de desinfección de vegetales en dichas plantas.

La ventaja que toman los ácidos orgánicos versus tratamientos químicos es que son generalmente reconocidos como inocuos para utilizarlos en el tratamiento de alimentos (Cherry 1999). Tomando en cuenta que los vegetales frescos forman parte esencial de la dieta humana y además pueden estar asociados con la transmisión de microorganismos patógenos, los objetivos de esta investigación fueron:

- Evaluar el efecto del ácido acético, cítrico, hipoclorito de calcio y mezclas como desinfectantes para control de *E. coli* (ATCC 25922) en lechuga.
- Determinar el tratamiento con mayor poder de reducción de *E. coli* (ATCC 25922) y evaluar este a dos temperaturas (4 y 12°C) durante cinco días.
- Evaluar el efecto del tratamiento con mayor poder de reducción de *E. coli* (ATCC 25922) en características físicas como color y extensibilidad, durante cinco días en condiciones de refrigeración.
- Realizar un análisis de costos variables para los mejores tratamientos que resulten en cuanto a las soluciones desinfectantes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron muestras de chile dulce (*Capsicum annuum* L.) obtenidas de establecimientos de ventas de vegetales de las afueras de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, desconociendo su origen de procedencia en cuanto a productores. Así mismo, se analizaron muestras de lechuga (*Lactuca sativa* L.) adquiridas en el Puesto de Ventas y Planta Post-cosecha de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. Las muestras fueron adquiridas al azar, colocadas en bolsas plásticas y transportadas inmediatamente al Laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano (LMAZ), almacenados en refrigeración para su posterior análisis.

Preparación del inóculo: *E. coli* (ATCC 25922), no patógeno, liofilizado (FDA Strain, Seattle, USA), fue la cepa utilizada en este estudio. Esta cepa fue mantenida bajo condiciones de refrigeración (4°C) en tubos con agar soya tripticasa inclinado (TSA, Difco, Detroit, USA). Mediante un asa se transfirió *E. coli* a 10 ml de medio de preenrequecimiento (PB, Difco, Detroit, USA); seguidamente fue incubado (Incubadora Thermo Scientific, West Palm Beach, USA) a 35°C por 24 horas para activar las cepas y buscar la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo (Akbas y Ölmes 2007). Se realizaron dos transferencias consecutivas antes de realizar los experimentos.

Inoculación de lechuga y chile dulce: Hojas de lechuga y frutos de chile dulce, fueron lavados con agua potable y secados durante 15 minutos. Inmediatamente fueron rociados con etanol 70% y secados durante 15 minutos. Para remover residuos de etanol 70% se dio un pos-lavado con agua previamente esterilizada a 121°C por 15 minutos (Autoclave STERILMATIC®, Wettenberg, Alemania). Posterior a la desinfección de los vegetales se procedió a tomar porciones por medio de marcos de aluminio de 3.2 × 3.2 cm utilizando cuchillas desinfectadas con etanol 95%. Tres porciones de lechuga y chile dulce (3.2 × 3.2 cm) fueron sumergidas por un minuto en una solución con una concentración conocida de *E. coli* (ATCC 25922). Para mejorar la adherencia de la bacteria, las muestras se dejaron reposando por 30 minutos antes de someterlas a su desinfección (Perez 2010).

Preparación de soluciones desinfectantes: Todas las soluciones fueron preparadas utilizando agua potable utilizada en el campus de Zamorano (época no lluviosa). La preparación de agua clorada se realizó agregando hipoclorito de calcio (HTH® al 66%, Honduras). Para las soluciones con ácidos orgánicos se utilizó ácido acético glacial (Marc Chemical, México) y ácido cítrico anhídrido en polvo (Emprove® bio, Alemania).

Las soluciones finales utilizadas como tratamientos fueron los siguientes: 50 mg L^{-1} de cloro, 100 mg L^{-1} de cloro, 1000 mg L^{-1} ácido acético (v/v), 1000 mg L^{-1} ácido cítrico (w/v), 50 mg L^{-1} de cloro + 1000 mg L^{-1} ácido acético (v/v), 100 mg L^{-1} de cloro + 1000 mg L^{-1} ácido acético (v/v), 50 mg L^{-1} de cloro + 1000 mg L^{-1} ácido cítrico (w/v), 100 mg L^{-1} de cloro + 1000 mg L^{-1} ácido cítrico (w/v), y como control se utilizó solamente agua potable. A cada una de las soluciones desinfectantes se le realizó lectura de pH mediante el Potenciómetro ORION 3 STAR (Thermo Scientific, West Palm Beach, USA).

Inmersión de porciones de lechuga y chile dulce en los tratamientos: Se tomaron 3 porciones de 3.2 x 3.2 cm para chile dulce dando un total de 30.72 cm^2 y 61.44 cm^2 para lechuga, previamente inoculados con *E. coli* (ATCC 25922). Cada solución desinfectante se preparó en bolsas de polietileno de baja densidad (LDPE) transparentes y se mantuvieron a temperatura ambiente, hasta el momento de ser utilizadas. La inmersión se realizó por un minuto y para su manipuleo se utilizó pinzas previamente esterilizadas con etanol 70% y flameadas por 15 segundos. Se dejaron reposar las porciones inoculadas durante 30 minutos para luego sumergirlas en bolsas estériles con agua peptonada (0.1% w/v) para realizar las siembras y conteos de recuperación de *E. coli* (ATCC 25922). Las manos estuvieron cubiertas con guantes de nitrilo durante todo el experimento.

Análisis microbiológico: Luego de tratadas las porciones de vegetales en cada tratamiento, se procedió a trasladarlas mediante pinzas a bolsas estériles Fisherbrand® (Fisher Scientific, Inglaterra), con 100 ml de agua peptonada 0.1%. Inmediatamente se agitaron manualmente por 2 minutos. Fueron sembradas diluciones en platos petri de plástico (Greiner blo-one, Norte Carolina, USA), desde 10º hasta 10^{-6} mediante pipetas PIREX® de 1.1, 2 y 5 ml utilizando la técnica de vertido. Este procedimiento se llevó a cabo en una cámara de bioseguridad (LABCONCO). El medio de cultivo utilizado fue Violet Red Bile Agar + MUG (Difco, Detroit, USA), previamente agitado y calentado por medio del Agitador-Calentador IKA® C-MAG HS10, dicho medio fue selectivo para la *E. coli*. Las colonias de *E. coli* fueron identificadas por un color característico púrpura y un contorno rojizo, contadas después de incubar (Incubadora Thermo Scientific) por 24 horas a 35°C (Akbas y Ölmes 2007).

Análisis de inhibición: Se analizó el tratamiento más sobresaliente como reductor de *E. coli* (ATCC 25922) y se evalúo su efecto inhibidor crecimiento de *E. coli* (ATCC 25922) a dos temperaturas de almacenamiento (4 y 12°C) en una refrigeradora LG GM-314 SC durante cinco días. Conteos fueron realizados en los días cero, tres y cinco en medio VRBA+MUG como se explicó anteriormente.

Análisis físicos: Se realizó análisis sobre el efecto del tratamiento sobresaliente en reducción de *E. coli* (ATCC 25922), en parámetros físicos (Color y tensión) en hojas de lechuga. La lechuga fue adquirida en la Planta Post-cosecha, inmediatamente trasladada al Laboratorio de Análisis de Alimentos (LAAZ), Zamorano. Refrigerada a 12°C y 43% HR. Cada hoja fue sometida a tratamiento antimicrobiano y otras no (control). Para el color se

midió los valores L, a y b por medio del colorímetro Colorflex Hunterlab y su software. Primero se estandarizó el Hunterlab con el blanco y negro, seguidamente se realizó análisis de color a cada hoja tanto para el día cero, tres y cinco (siguiendo instrucciones LAA-I-001-003). Para tensión, se midió la fuerza necesaria para romper una muestra de lechuga (9×3 cm) en Newton mediante el texturómetro Brookfield CT3 4500, acople TA-DGA. Los análisis de tensión fueron realizados con una carga de activación de 0.067 Newton, 0.50mm seg^{-1} de velocidad y un valor meta de 25 mm (Siguiendo instrucción LAA-I-004-003).

Análisis estadístico: Cada uno de los tratamientos fue repetido tres veces. El análisis de varianza (ANDEVA) se llevó a cabo mediante el programa estadístico SAS 9.1 para Windows®, con un nivel de significancia de 0.05, y una separación de medias utilizando Tukey.

Análisis económico: Luego de elegir él o los mejores tratamientos, se analizaron los costos variables por cada litro de solución desinfectante.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La idea de riesgo para la salud de las personas está muy difundida en la sociedad actual. Por eso, no es extraño que la seguridad se haya convertido en una de las mayores preocupaciones sociales, dentro de las cuales cobra mayor relevancia la seguridad alimentaria (Agantangelo 2007). Actualmente la FDA (2012), tiene una lista de alimentos tanto para humanos y animales que son importantes para su estudio microbiológico debido al riesgo que tienen estos para transmitir enfermedades hacia el consumidor. En dicha lista aparecen alimentos como la leche, hojas verdes (Albahaca, cilantro, cebolla, espinaca, perejil y hojas de lechuga), frutas y verduras (Melón, papaya, tomate, pepino, chile dulce y picante), mariscos, huevos y agua, estos como alimento humano, en tanto que para animales mencionan que es importante enfocarse en el análisis de piensos y alimentos peletizados. La FDA (2012), también menciona que esta lista está sujeta a cambios dependiendo de los brotes de enfermedades asociadas con los alimentos.

Los criterios para evaluar la calidad microbiana de vegetales frescos generalmente son: coliformes totales, mesófilos totales y en ocasiones microorganismos específicos como *E. coli* ya sea patógena o no patógena (Rincón *et al.* 2010). En países latinoamericanos se han realizado varios estudios dirigidos a evaluar la calidad microbiológica de vegetales de consumo fresco y se reportan conteos que oscilan entre 10^2 y 10^9 NMP g^{-1} de coliformes totales (López *et al.* 2003., Monge *et al.* 1995 y Rivera *et al.* 2009).

Este estudio se inició con chile dulce (*Capsicum annuum* L.). Considerándose que los conteos que se esperan en una muestra obtenida en un supermercado son variados. Al llevar a cabo el experimento, sometiendo chile dulce a las soluciones desinfectantes, se observaron recuentos de colonias de coliformes y mesófilos en algunos casos, mientras que en otros no se observó ningún recuento incluyendo los tratamientos control (Cuadro 1).

También se consideró que los productores y distribuidores tratan de reducir contaminación en dichos vegetales poniendo en práctica las buenas prácticas agrícolas (BPA), disminuyendo así la carga microbiana que pueda estar presente en éstos. Por esta razón, se determinó que la carga microbiana en chile dulce fue contralada indirectamente por los productores, impidiendo así la recuperación de células para conteos de aerobios y mesófilos totales esperados en la primera repetición de esta fase (Análisis en chile dulce).

Se han realizado estudios sobre la acción de agentes antimicrobianos y su comportamiento como desinfectante en vegetales frescos, pero para poder analizar el poder bactericida de de estos agentes, es necesario inocular una carga conocida (Akbas y Ölmes 2007.; Agantelo 2007.; LeChevallier *et al.* 1988.; Perez 2010). Para poder inocular la superficie de chile dulce se realizaron pruebas preliminares. La primera parte fue determinar la

concentración inicial de *E. coli* (ATCC 25922), mediante el mismo proceso de validación que se mencionó anteriormente en la preparación del inóculo. Akbas y Ölmes (2007), mencionan que es necesario realizar tres transferencias consecutivas durante la preparación del inóculo para asegurar presencia de células totalmente viables de *E. coli* (ATCC 25922).

Cuadro 1. Conteo de coliformes totales y mesófilos totales en muestras de chile dulce.

Compuesto	Concentración (mg/L)	Aerobios Totales (Log UFC cm^{-2})	Coliformes Totales cm^2 (Log UFC cm^{-2})
Cloro[1]	50	3.51	1.51
	100	<2.51[3]	<2.51
Ácido Acético (AA)	1000	3.51	<3.21
Ácido Cítrico (AC)	1000	4.01	<3.21
Cloro + AA	50/1000[2]	4.11	<2.51
	100/1000	2.16	<1.51
Cloro + AC	50/1000	<2.51	<2.51
	100/1000	<1.51	<1.51
Lavado con agua		<4.51	<4.51
Sin tratar	-	7.29	4.81

[1]Hipoclorito de Calcio. [2]Mezcla hipoclorito de calcio/Ácido. [3]Menor al límite de detección.

Se analizaron en este estudio tres transferencias con períodos de incubación de 24 horas a 35°C cada una. No se observó diferencia significativa entre los recuentos de la primera, segunda y tercera transferencia (Cuadro 2), por lo cual, podría utilizarse cualquiera de estas transferencias para acondicionamiento de *E. coli* ATCC 25922. Sin embargo, Akbas y Ölmes (2007), mencionan que es importante utilizar tubos de la segunda ó tercera transferencia esto para asegurar la fase estacionaria y la expresión genética de las células. En este estudio se utilizaron tubos incubados durante 24 horas (segunda transferencia) teniendo una población final de 8.58±0.01 Log UFC ml^{-1} de *E. coli* (ATCC 25922).

Cuadro 2. Validación de concentración inicial de *E. coli* (ATCC 25922) después de 24 horas a 35°C.

Transferencia	Media ± DS (Log UFC ml^{-1}) [1]
1	8.58±0.01 [a]
2	8.57±0.10 [a]
3	8.55±0.07 [a]
CV (%)	0.64%

[1]Letras iguales en la columna no son significativamente diferentes (P>0.05).

Luego de determinar la concentración inicial de la cepa de *E. coli* (ATCC 25922), se procedió a validar la capacidad de adhesión en la superficie del chile. Se inocularon tres concentraciones de *E. coli* (ATCC 25922) en chile dulce de 4.0, 5.0 y 6.0 Log UFC cm^{-2} buscando una adherencia cercana a 4.0 Log UFC cm^{-2}.

En la repetición uno del estudio no se recuperó *E. coli* de las muestras de fruto inoculada analizadas, a pesar que se utilizó un medio selectivo para *E. coli.* Estos resultados también fueron encontrados por Sapers (2001), quién realizó estudios de recuperación de *E. coli* (ATCC 25922) en manzana inoculando 4.37 Log UFC cm^{-2}, con un intervalo de 30 minutos entre inoculación y lavado, observó conteos de 1.0 Log UFC cm^{-2}. Este autor argumentó que en algunas frutas y vegetales la recuperación de células era poca debido a que se localizaban en los poros de los mismos, irregularidades de la superficie ó en lugares de unión como el pedúnculo dificultando su remoción.

Otro factor importante en la recuperación de bacterias es la formación de biofilm (matriz de polisacáridos que mantiene a las células juntas y las pega a la superficie del vegetal), haciéndolas más resistentes a la inactivación ó desprendimiento durante técnicas de lavado ó desinfección (Solomon y Sharma, 2009.; Sapers 2001.; LeChevallier *et al.* 1988). Patógenos humanos, como *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp, L. monocytogenes*, así como otras bacterias como *Pseudomonas y Erwinia*, son capaces de formar películas de biofilm, limitando la capacidad de desinfectar frutas, vegetales y equipos de procesamiento (Somers *et al.*, 1994). Para efecto de evaluar los desinfectantes al inocular *E. coli* (ATCC 25922) y debido a las dificultades anteriores se determinó necesario realizar el estudio en superficies de hojas verdes como la lechuga, debido a que es uno de los vegetales importantes en donde se deben realizar más estudios microbiológicos, por ser un vector para la transmisión de ETA´s (FDA 2012). Al igual que en el chile dulce, se inocularon concentraciones de *E. coli* (ATCC 25922) en lechuga. Se observó que a partir de un inóculo con una concentración de 6.39±0.08 Log UFC cm-^{2}, se obtuvo una recuperación en la lechuga de 3.72±0.14 Log UFC cm^{-2} (Cuadro 3).

Cuadro 3. Validación de inóculo y recuperación de *E. coli* (ATCC 25922) en lechuga.

Concentración Esperada Log UFC cm^{-2}	Concentración Inóculo (Log UFC ml^{-1}) Media ± DS	Recuperación[3] (Log UFC cm^{-2}) Media ± DS
6.0[1]	6.39±0.08[2]	3.72±0.14
CV (%)	1.26	3.76

[1]Concentración esperada (Log UFC cm^{-2}). [2]Concentración en solución (Inóculo). [3]Superficie de lechuga.

Partiendo de una solución (inóculo) de aproximadamente 6.0 Log UFC ml^{-1} de *E. coli* (ATCC 25922), se inocularon las superficies de lechuga, esperando una recuperación aproximada a 4.0 Log UFC cm^{-2} y se evalúo el efecto de ácidos orgánicos y cloro en dicha superficie para el control de *E. coli* (ATCC 25922). La concentración inicial recuperada fue de 4.02±0.20 Log UFC cm^{-2}. Confirmando lo que menciona Perez (2010), que al momento de realizar una inoculación se pierden alrededor de 2.0 Log UFC cm^{-2} durante el manejo y manipulación de cepas microbiológicas.

El efecto del uso de ácidos orgánicos y cloro en lechuga tuvieron efecto en la reducción de *E. coli* ATCC 25922. Los mejores tratamientos estadísticamente ($P<0.05$) fueron 50 mg L^{-1} de cloro más 1000 mg L^{-1} de ácido acético, 50 mg L^{-1} cloro más 100mg L^{-1} de ácido cítrico, 100 mg L^{-1} cloro más 1000 mg L^{-1} de ácido acético y 1000 mg L^{-1} de ácido acético con reducciones de 2.19±0.49, 1.75±0.53, 1.69±0.61 y 1.32±0.47 Log UFC cm^{-2} respectivamente (Cuadro 4 y 5). Sin embargo, se observa que el tratamiento con 50 mg L^{-1} de cloro más 1000 mg L^{-1} de ácido acético sobresale de las demás.

Cuadro 4. Efecto de tratamiento con cloro, ácido acético, cítrico y mezclas en la reducción de *E. coli* (ATCC 25922) en la superficie de lechuga, a una concentración inicial de 4.02±0.20 Log UFC cm^{-2}.*

Tratamiento	Concentración (mg L^{-1})	Reducciones[3] (Log UFC cm^{-2})
Cloro[1]	50	0.88±0.23 ^{bcd}
	100	0.78±0.36 ^{bcd}
Ácido Acético (AA)	1000	1.32±0.47 ^{abc}
Ácido Cítrico (AC)	1000	0.96±0.45 ^{bcd}
Cloro + AA	50/1000[2]	2.19±0.49 ^{a}
	100/1000	1.69±0.61 ^{ab}
Cloro + AC	50/1000	1.75±0.53 ^{ab}
	100/1000	1.20±0.88 ^{bcd}
Lavado con Agua	-	0.40±0.17 ^{cd}
Sin tratar	-	0.00±0.00 ^{d}
CV (%)		34.97

[1]Hipoclorito de Calcio. [2]Mezcla hipoclorito de calcio/Ácido. [3]Reducción dada por diferencia de conteo sin tratar con cada tratamiento. [*]Letras iguales dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($P>0.05$).

El cloro es uno de los agentes desinfectantes más utilizados, sin embargo en este estudio no presentó reducciones significativas ($P>0.05$), después de un minuto de sumersión en cada tratamiento. Sapers (2001), indica que el pH óptimo para el buen funcionamiento del cloro y así poder reducir, entre 1.0 a 2.0 Log UFC cm^{-2} es de 6.5. El pH del agua utilizado fue de 4.92±0.12, por consiguiente, para mejorar la eficacia de estos tratamientos es necesario realizar ajustes de pH.

Es importante mencionar también que los tratamientos con cloro (50 y 100 mg L^{-1}) alcanzaron valores de pH de 7.26±0.31 y 7.62±0.12 respectivamente. Dlamini y Buys (2008), mencionan que ambientes óptimos para crecimiento de bacterias patógenas como *E. coli* O157:H7 tienen valores de pH cercano a 7. Por lo cual el valor de pH de estos tratamientos es óptimo para crecimiento de *E. coli* O157:H7.

La concentración, el tiempo de contacto y la fuente son factores determinantes para el poder bactericida del cloro; en concentraciones de 1000 mg L^{-1}, utilizando hipoclorito de sodio y en contacto durante 15 minutos con la superficie vegetal, logró una reducción de 3.0 Log UFC cm^{-2} de *E. coli* (ATCC 25922) (Sapers 2001).

Cuadro 5. Medición de pH en soluciones desinfectantes de cloro, ácido acético, cítrico y mezclas en la superficie de lechuga, a una concentración inicial de 4.02±0.20 Log UFC cm^{-2}.*

Tratamiento	Concentración (mg L^{-1})	pH Solución desinfectante
Cloro[1]	50	7.26±0.31 [a]
	100	7.62±0.12 [a]
Ácido Acético (AA)	1000	2.79±0.07 [c]
Ácido Cítrico (AC)	1000	2.24±0.07 [d]
Cloro + AA	50/1000[2]	2.87±0.07 [c]
	100/1000	2.91±0.10 [c]
Cloro + AC	50/1000	2.26±0.07 [d]
	100/1000	2.28±0.06 [d]
Lavado con Agua	-	4.92±0.13 [b]
Sin tratar	-	-
CV (%)		3.38

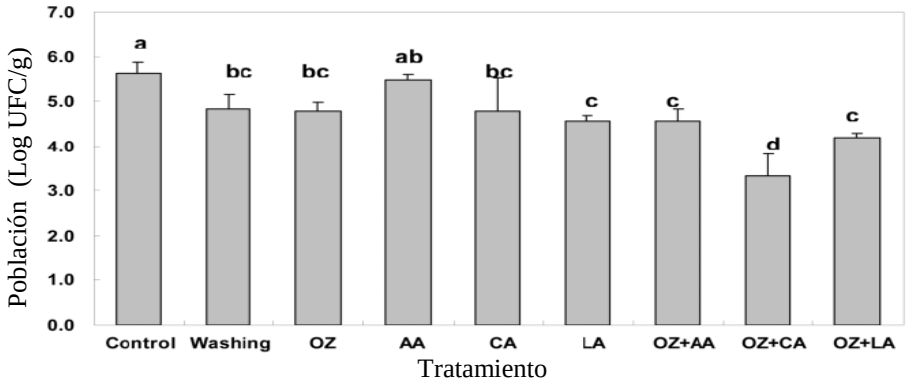
[1]Hipoclorito de Calcio. [2]Mezcla hipoclorito de calcio/Ácido. [*]Letras iguales dentro de la misma columna no son significativamente diferentes (P>0.05).

Alternativas al uso de cloro y otros químicos, son los ácidos orgánicos, como el ácido acético y cítrico. Tratamiento con 1000 mg L^{-1} de ácido acético resultaron en reducciones de 1.32±0.47 Log UFC cm^{-2} y para 1000 mg L^{-1} de ácido cítrico de 0.96±0.45 Log UFC cm^{-2}. Estas reducciones son similares a las obtenidas por Fong *et al.* (2011), donde la eficiencia de ácido acético (ÁA) y ácido cítrico (AC) fueron desde 1 a 5 log de reducción de microbios con tiempos de contacto entre 0.5 a 15 minutos, respectivamente. Mientras que Gil *et al.* (2009), mencionan que las reducciones utilizando ácido cítrico, acético y peroxiacético oscilan entre 1 y 2 Log UFC cm^{-2}.

El pH es el factor donde los ácidos orgánicos intervienen, debido a que valores de pH entre 5 y 9 son los ambientes comunes donde sobreviven los microorganismos como la *E. coli* O157:H7, valores de pH menores ó cercanos a 2 y mayores a 10 son ambientes inadecuados para la mayoría de microorganismo patógenos. Tratamientos donde se utilizaron tanto ácido acético y cítrico tuvieron un rango de pH entre 2.24±0.07 a 2.91±0.10, logrando tener un medio ácido.

Investigaciones llevadas a cabo por distintos autores, determinaron que mezclas con 100 mg L^{-1} de cloro (hipoclorito de sodio) más 100 mg L^{-1}ácido acético, 3 mg L^{-1} Ozono más 1000 mg L^{-1} ácido cítrico, 100 mg L^{-1} cloro más 500 mg L^{-1} ácido láctico, en *E. coli*

O157:H7, *L. monocytogenes* y *Yersenia enterocolitica*, fueron más eficientes controlando estos microorganismos que individualmente. La Figura 1 muestra los resultados evaluados de los tratamientos anteriores, excepto de hipoclorito de sodio (Yuk *et al.* 2006.; Inatsu *et al.* 2005.; Escudero 1999), los cuales fueron muy similares a los encontrados en este estudio.



OZ=Ozono, AA=Ácido Acético, CA=Ácido cítrico, LA=Ácido Láctico. Letras iguales (P>0.05) no son significativamente diferentes.

Figura 1. Efecto de un minuto de exposición a ozono, ácidos orgánicos, y sus combinaciones en poblaciones de *E. coli* O157:H7 en lechuga (Yuk *et al.* 2006).

La temperatura se encuentra entre los factores más críticos para el logro de un suministro alimentario que reúna las propiedades sanitarias y organolépticas necesarias. Probablemente la temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afectan la viabilidad y desarrollo microbiano (Agatangelo 2007). En general, bajas temperaturas disminuyen la tasa de respiración y actividad enzimática de los microorganismos; disminuyendo así el deterioro del alimento. Almacenar vegetales a una temperatura de 1 a 3°C es recomendado para prolongar la vida de anaquel del alimento (Luo *et al.* 2010).

En este estudio se evaluó uno de los tratamiento con mayor poder de reducción de *E. coli* (ATCC 25922) (50 mg L^{-1} cloro más 1000 mg L^{-1} de ácido acético), así como cada tratamiento por individual que compone este (50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético), y un control para conocer la concentración inicial inoculada por cm^2 de vegetal. Los resultados obtenidos (Cuadro 6) confrontan a los que Luo *et al.* (2010), obtuvieron (Figura 2), mencionando que a una temperatura de 12°C, *E. coli* O157:H7 tiene la capacidad de sobrevivir y adaptarse observándose crecimiento, mientras que a temperaturas de 1-4°C se lograron observar disminución de población debido a la reducción de la tasa de respiración del patógeno.

Cuadro 6. Recuentos en Log UFC cm^{-2} de *E. coli* (ATCC 25922) en cortes de lechuga inoculadas y tratadas con antimicrobianos.*

Tratamiento	Concentración (mg/L-1)	Inicio	Día 3		Día 5	
		25°C	4°C	12°C	4°C	12°C
Cloro[1]+ÁA[2]	50/1000	3.13±0.48 [a]	<1.80 [a]	<1.80 [a]	<1.80 [a]	<1.80 [a]
ÁA	1000	3.93±0.15 [b]	<3.82 [b]	<3.82 [c]	<3.82 [b]	<3.82 [b]
Cloro	50	3.18±0.05 [a]	1.34±0.76 [a]	1.34±0.76 [b]	<1.80 [a]	<1.80 [a]
Sin tratar	-	4.37±0.02 [b]	<3.82 [b]	2.21±0.30 [d]	<3.82 [b]	2.17±0.45 [c]
CV (%)		15.7	36.5		39.8	

[1]Hipoclorito de Calcio. [2]Ácido Acético. *Letras iguales dentro de la misma columna no son significativamente diferentes (P>0.05).

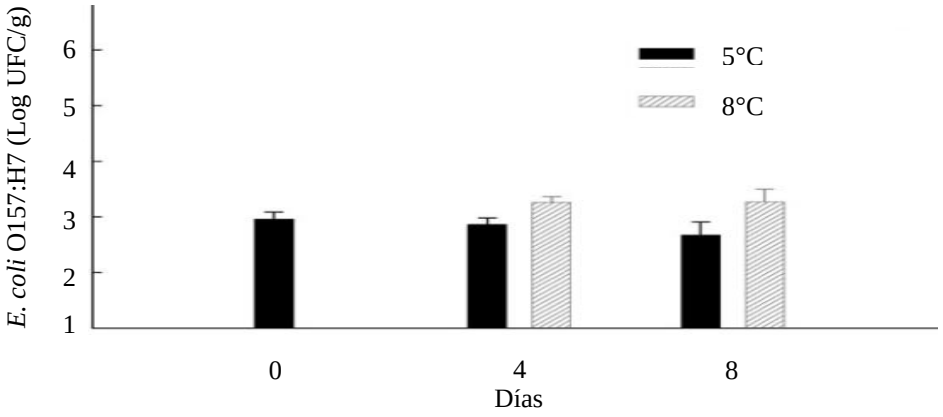
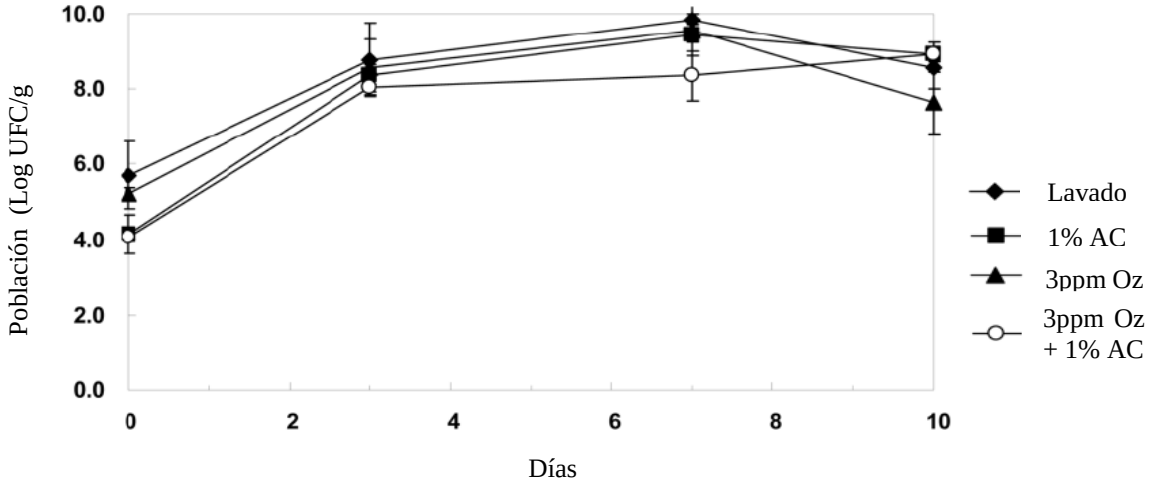


Figura 2. Cambios en la población de *E. coli* O157:H7 en cortes de lechuga fresca, almacenadas a 5 y 12°C (Luo *et al.* 2010).

Yuk *et al.* (2006), mencionan que a temperaturas mayores a 8°C la población de *E. coli* O157:H7 se adapta adecuadamente y observándose crecimiento de las mismas a pesar de ser tratadas con 1000 mg L^{-1} de ácido cítrico, 3000 mg L^{-1} de ozono y mezcla de las anteriores (Figura 3). Caso contrario sucedió en este estudio, a una temperatura de 4°C y 12°C, se observaron reducciones de población de *E. coli* (ATCC 25922) en los tratamientos, incluso en algunas hubo ausencia de UFC, por lo cual fue necesario reportar el límite de detección de cada uno. A pesar de esto se observó que los tratamientos constituidos por cloro (50 mg L^{-1}) más ácido acético (1000 mg L^{-1}) y acido acético (1000 mg L^{-1}) presentaron menor población comparado con cloro (100 mg L^{-1}), confirmando los resultados obtenidos en el cuadro 4.



CA=1000 mg L^{-1} Ácido Cítrico
Oz=Ozono

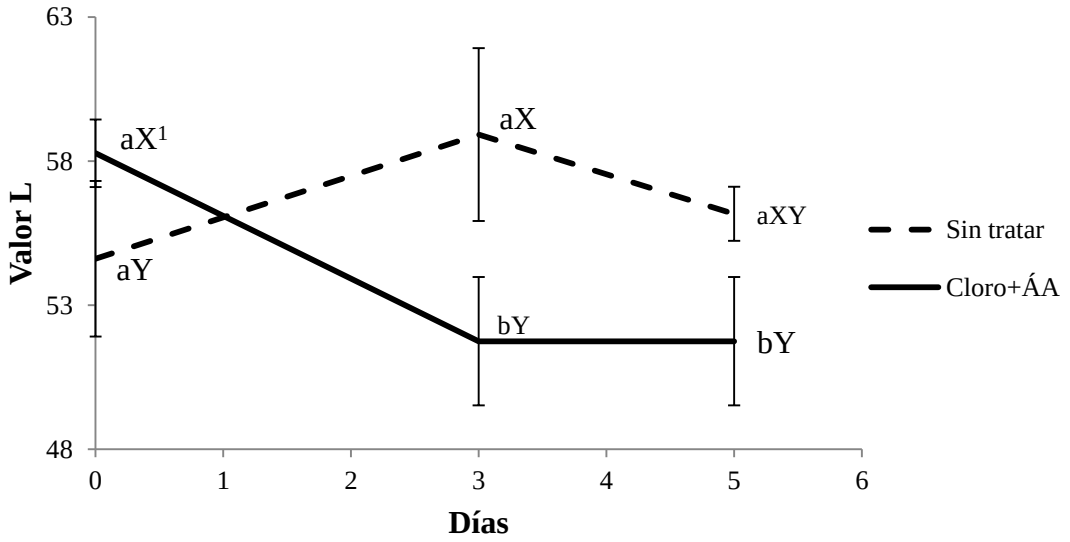
Figura 3. Efecto de un minuto de exposición a 3 mg L^{-1} de ozono, 1000 mg L-1 de ácido cítrico y combinación de las dos en crecimiento poblacional de *E. coli* O157:H7 en lechuga almacenadas a 15°C (Yuk *et al.* 2006).

Factores que influyeron en los resultados obtenidos en este estudio, fueron los intervalos entre la inoculación y el lavado, ya que intervalos mayores a 72 horas dificultan la remoción de microorganismos de la superficie vegetal, además cuando un vegetal se deshidrata, como sucedió en los cortes de lechuga en las dos temperaturas (4 y 12°C), el biofilm formado es más resistente. En tanto que las heridas causadas al momento del corte promueven que los microorganismos penetren en estos lugares (Sapers 2001). Debido a lo anterior la recuperación de *E. coli* (ATCC 25922) fue mínima e incluso nula, por eso la contrariedad de los resultados obtenidos por otros autores. La inocuidad de un alimento es de suma importancia para el consumidor, pero nunca deja por un lado los aspectos visuales y sensoriales de un vegetal. Se evaluó el comportamiento del tratamiento de 50 mg L^{-1} cloro más 1000 mg L^{-1} de ácido acético comparado con un control (sin tratar) en parámetros físicos de fuerza máxima de ruptura y color, almacenadas a 12°C durante cinco días. La apariencia, especialmente el color verde de la lechuga es importante, asemejando dicho color con frescura. Vásquez *et al.* (2008), encontraron que las lechugas presentan valores L, a y b de 79±6.0, -10.1±2.1 y 29.7±5.8 respectivamente en lechuga de cabeza, pero también mencionan que el color varía y depende de muchos factores, los más importantes son madurez fisiológica, variedad y micro-clima donde se produce.

Los valores L, a y b que se obtuvieron en el día cero (inicio) para la lechuga tratada fueron estadísticamente iguales que para la lechuga sin tratar, por lo tanto tuvieron la misma luminosidad (L), el mismo desplazamiento hacia el color verde (Valores negativos de a) y el mismo desplazamiento hacia el color amarillo (Valores positivos de b) (Cuadro 6).

En el tercer día se observaron diferencias estadísticas en los valores de L y a entre los tratamientos mientras que para el valor b fueron estadísticamente iguales. La muestra tratada mostró una coloración verde y oscura con respecto a las muestras no tratadas

Al finalizar el análisis en el día cinco hubo diferencias entre los valores L y a, por lo cual la coloración de la lechuga se mantuvo con respecto las muestras del día tres. El comportamiento del valor L durante los cincos días de almacenamiento fueron cambiando. Para las muestras tratadas con una mezcla de cloro y ácido acético (50 mg L^{-1} y 1000 mg L^{-1} respectivamente) tuvieron un descenso significativo del día inicial al día tres, a partir de este día el valor se mantuvo igual estadísticamente (Figura 4). Al llevar a cabo desinfección por medio de inmersión, requiere manipulación de las hojas de lechuga, causando daños en el tejidos celulares y cloroplastos, aumentando la actividad de oxidación de fenoles (Polifenol oxidasa), disminuyendo así la luminosidad de las hojas además Ilh *et al.* (2003), mencionan que el oscurecimiento está asociado también con la perdida de clorofila asociada a los a ambientes ácidos, que para una solución con estas concentraciones de cloro y ácido acético alcanzan valores de pH de 2.87±0.07. Las muestras no tratadas mostraron aumento del valor L del día inicial al día tres, porque según como menciona León *et al.* (2007), luego de la cosecha las nervaduras de las hojas de lechuga tienden a extenderse en los primero días, aumentando así el valor L (Luminosidad) en estas muestras sin tratar (Figura 4).



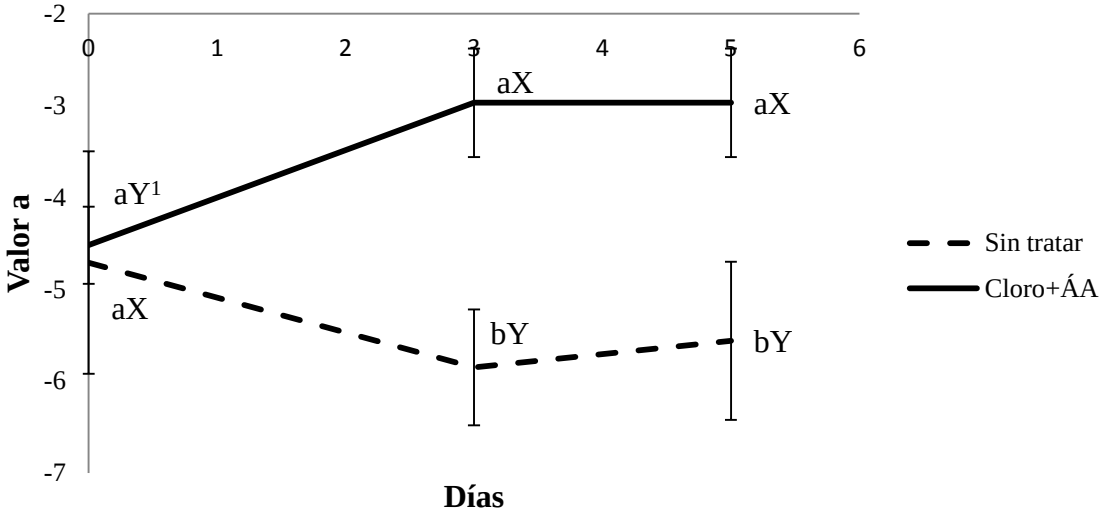
[1]Letras minúsculas se comparan entre tratamientos del mismo día, letras mayúsculas comparan resultados entre días.

Figura 4. Comportamiento del valor L (Luminosidad) en hojas expuestas a 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético y hojas sin tratar almacenadas a 12°C durante cinco días.

Los dos tratamientos iniciaron estadísticamente con el valor a, lo que indica que tuvieron una misma tendencia al color verde, sin embargo al tercer día en las muestras tratadas el valor a tuvo una reducción significativa con respecto al día inicial, pero a partir del día tres al día cinco mantuvo el mismo valor a. Este resultado es muy similar al obtenido por Ihl *et al.* (2003), donde ellos sometieron lechuga a tratamientos de 2 g L^{-1} de ácido cítrico y mencionan que en medios ácidos el contenido de clorofila (µg g^{-1}) tiende a disminuir, como sucedió en este estudio.

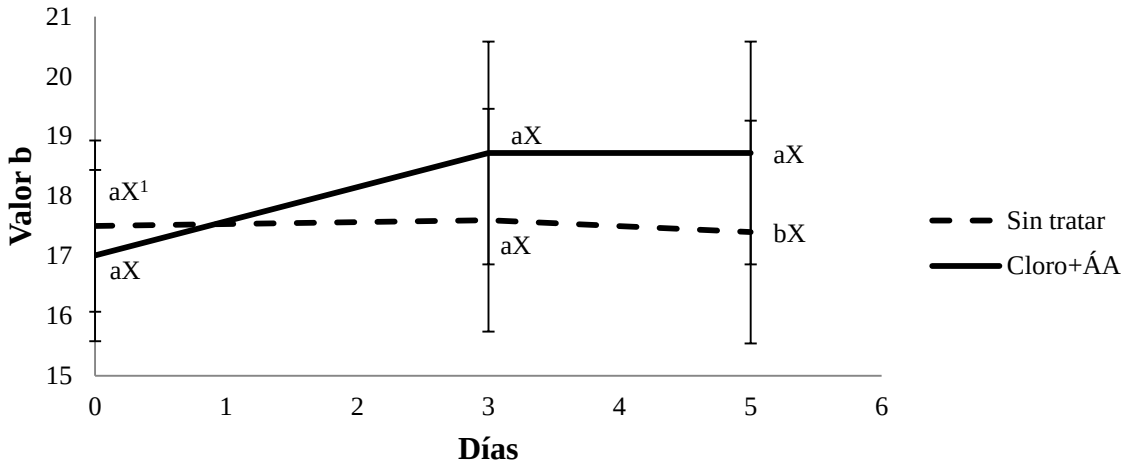
El comportamiento del valor a de las muestras sin tratar estadísticamente fueron lo contrario a las muestras tratadas, aquí se observó un aumento en el valor a hacia la coloración verde. Vásquez *et al.* (2008), encontraron en su estudio que el pH de la lechuga de cabeza oscila cerca de 6.35±0.02, por lo cual la producción de clorofila no se ve afecta, entonces es debido a eso que la tendencia hacia el verde en lechugas sin tratar aumenta del día inicial al tercer día, y en el último día se mantiene igual (Figura 5).

Durante el almacenamiento no ocurrieron cambios de color en el carácter amarillo de las hojas (Valor b) (Figura 6). León *et al.* (2007), encontraron aumento de este valor pero cuando la lechuga se almacenaba durante mayor tiempo (12 días) por lo cual en este estudio no se encontraron diferencias entre los primero días, únicamente en el último día en las hojas sin tratar, esto puede estar relacionado con la madurez de la lechuga.



[1]Letras minúsculas se comparan entre tratamientos del mismo día, letras mayúsculas comparan resultados entre días.

Figura 5. Comportamiento del valor a en hojas expuestas a 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético y hojas sin tratar almacenadas a 12°C durante cinco días.

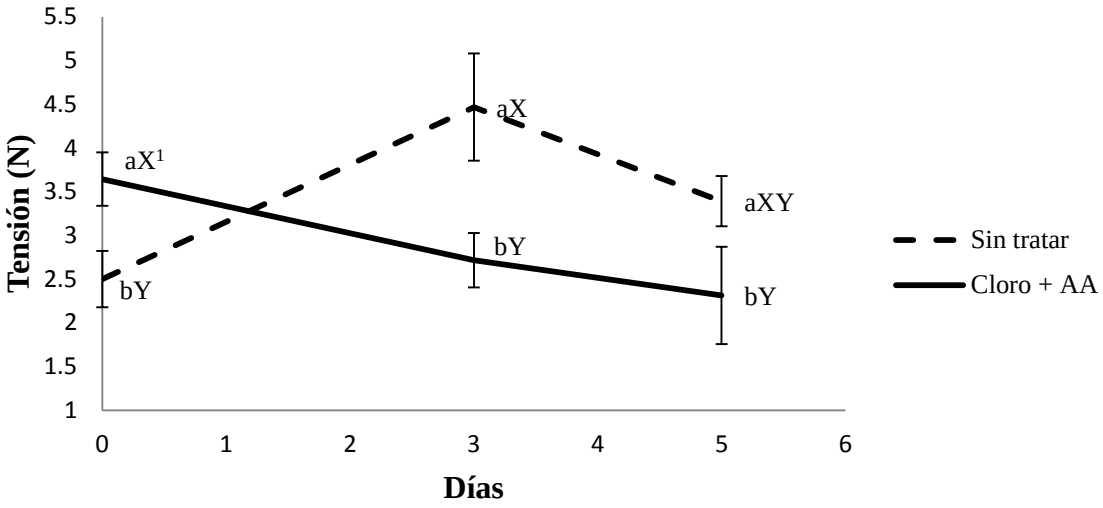


[1]Letras minúsculas se comparan entre tratamientos del mismo día, letras mayúsculas comparan resultados entre días.

Figura 6. Comportamiento del valor b en hojas expuestas a 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético y hojas sin tratar almacenadas a 12°C durante cinco días.

La textura es un atributo importante que afecta la aceptación, procesamiento y manejo del alimento. La evaluación de la textura se puede realizar mediante la fuerza requerida (tensión) para la ruptura de una porción de hoja de lechuga. León *et al.* (2008), menciona que las porciones se deben tomar de las puntas o partes medias de las hojas. En este estudio las muestras se tomaron de las puntas.

La pared celular cumple la función de mantener la textura y turgencia de un vegetal como la lechuga, gracias a sustancias pécticas presentes depende mucho de su turgencia (Hormazabal 1999). Al comparar los tratamientos entre sí, se observó que al inicio las muestras tratadas con 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético, presentaron mayores tensiones de ruptura por ende más crujiente comparado con la muestra sin tratar (Figura 7). Lo anterior debido a que al someter la lechuga a una solución acuosa no se deshidrata, al contrario que la muestra sin trata. Durante el tiempo trascurrido desde lugar de origen hasta el análisis sufrió una deshidratación por lo cual se observa que tuvo menor tensión de ruptura. Sin embargo, al tercer día la misma humedad que permitió que la lechuga tratada fuera mayor al inicio la afectó. Según Hormazabal (1999), al procesar mínimamente vegetales como la lechuga se activan enzimas endógenas como la poligalacturonasa, p-galactosidasa y la pectinmetil estearasa afectando así la textura de la lechuga, contrario a las muestras sin tratar, que al ser almacenadas a 12°C se recuperaron de la deshidratación y presentaron estadísticamente mejores texturas.



[1]Letras minúsculas se comparan entre tratamientos del mismo día, letras mayúsculas comparan resultados entre días.

Figura 7. Comportamiento de tensión de ruptura (Newton) en hojas expuestas a 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético y hojas sin tratar almacenadas a 12°C durante cinco días.

El análisis de costos variables para un proceso en una planta agroindustrial es de mucha importancia. Este análisis permite tomar una decisión en respuesta a las exigencias de los consumidores, pero más importante para ofrecer a éstos, productos que no comprometan la inocuidad y no se conviertan en un riesgo para la salud al ser consumidos. En el cuadro 7 se muestra un análisis de costos de las soluciones desinfectantes que redujeron por igual ($P<0.05$) la carga microbiana de *E. coli* en la superficie de lechuga. Donde se observa que al utilizar solamente ácido acético es la solución desinfectante más económica versus las otras soluciones.

Cuadro 7. Cálculo de costos variables por litro de solución de cuatro soluciones desinfectantes para el control de *E. coli* para uso en la Planta Hortofrutícola Zamorano.

Compuesto	Concentración (mg/L)	Cloro (Lps)[3]	Ácido Acético (Lps)	Ácido Cítrico (Lps)	Total (Lps)
Ácido Acético (ÁA)	1000	0.325			0.325
Cloro + ÁA	50/1000[2]	0.15	0.325		0.475
	100/1000	0.30	0.325		0.625
Cloro + ÁC	50/1000	0.15		0.31	0.460

[1]Hipoclorito de Calcio (HTH, 66%). [2]Mezcla hipoclorito de calcio/Ácido. [3]Tasa de cambio: 1 dólar=19.90 Lps (Lempiras).

El lavado y la desinfección juegan un papel importante en el rol de reducir la carga microbiana en alimento. En este estudio se observó que existen factores que limitan la eficacia de agentes desinfectantes en hortalizas como la formación de biofilm. Aunque existen químicos como el amonio cuaternario, glutaraldehídos y cloro (más usado), aún así el sector alimentario se preocupa para asegura la inocuidad de los alimentos. Nuevos agentes han surgido en años recientes, como el uso de ácidos orgánicos. Este estudio confirmo lo que algunos autores mencionan en sus investigaciones, que es la eficacia del uso de ácidos orgánicos, como el ácido acético y cítrico, brindando así calidad e inocuidad a hortalizas frescas. Es importante implementar estas soluciones desinfectantes en plantas de procesamiento hortofrutícola de Zamorano como de otro sitio.

4. CONCLUSIONES

- Se determinó que al utilizar ácido acético (1000 mg L^{-1}), cítrico (1000 mg L^{-1}) y mezclas con hipoclorito de calcio (50 mg L^{-1}) se observan reducciones de hasta 2.19±0.49 Log UFC cm^{-2} de *E. coli* (ATCC 25922) en superficies de lechuga, y la solución desinfectante basada en ácido acético (1000 mg L^{-1}) es la de menor costo variable.

- No se recuperaron conteos en la superficie de chile dulce, la propia naturaleza de la superficie pudo haber alojado en ella a las bacterias conglomerándolas en las fisuras o en sitios como el pedúnculo dificultando la recuperación en conteos de dichos tejidos.

- Se determinó que utilizar cloro (hipoclorito de calcio) en concentraciones de 50 a 100 mg L^{-1} no presentó diferencias significativas en la reducción de *E. coli* (ATCC 25922) con respecto a un lavado sólo con agua potable de Zamorano.

- Los resultados sugieren que en el análisis bacteriostático no se pudo medir el efecto inhibitorio y/o bactericida de los tratamientos evaluados. Condiciones ambientales y locales afectaron el estado de la lechuga, desde el transporte post-cosecha hasta el LMAZ, humedad relativa, temperatura, cortes en las hojas y el manipuleo de la lechuga afectaron el desarrollo del experimento.

- Hubo una reducción en el valor L debido a que simultáneamente hubo una reducción del valor a (luminosidad y verde, respectivamente). El manipuleo al inicio del tratamiento, ligación de agua de las células pudo haber afectado a las células liberando compuestos que mantienen el color en la lechuga.

5. RECOMENDACIONES

- Validar los resultados obtenidos en este estudio en planta, debido a que los condiciones de un laboratorio microbiológico no se asemeja a las condiciones de una planta de post-cosecha ó una planta de procesamiento hortofrutícola.

- Realizar otras investigaciones donde se utilicen otras fuentes de ácido como el ácido láctico y peroxiacético. Así mismo también evaluar otras cepas de microorganismos importantes en las incidencias de ETA, como *Listeria monocytogenes*, evaluando así microorganismos Gram positivos.

- Evaluar nuevamente tratamientos almacenados a temperaturas de 4°C y 12°C debido a que no se pudieron controlar adecuadamente, factores que pudieron influir en los resultados, por ejemplo la utilización de una refrigeradora convencional. De esta manera contribuir a mantener las condiciones de la lechuga en cuanto a humedad relativa para evitar secamiento del tejido en almacenamiento.

- Para el recuento de bacterias donde se esperan concentraciones muy bajas, utilizar métodos de cuantificación más sensibles como la técnica de número más probable (NMP).

- Evaluar todos los tratamientos en las dos temperaturas y análisis físicos realizados. En este estudio se enfocó únicamente en uno de los mejores tratamientos debido a limitantes en el presupuesto del estudio.

6. LITERATURA CITADA

Agatangelo, E. 2007. Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Memoria presentada para optar al Título de Doctor en Veterinaria, correspondiente al programa de Doctorado en Ciencias de los Alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España. 282 p.

Akbas, M.; H. Ölmes. 2007. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. Journal compilation The society for applied Microbiology. Institute of Technology, Gebze, Kocaeli, Turkey. 6 p.

CDC (Centro de Control y Prevención de Enfermedades). 2010. Multistate outbreak of human *E. coli* O145 infections linked to shredded romaine lettuce from a single processing facility. Department of Health and Human Services (en línea). Consultado el 5 de Octubre de 2012. Disponible en: http://www.cdc.gov/ecoli/2010/ecoli_o145/index.html

ECDC (Centro Europeo de Control y Prevención de Enfermedades). 2011. *Escherichia coli* outbreak in Germany: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) (en línea). Consultado el 5 de Octubre de 2012. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/food/coli_outbreak_germany_en.htm

Cherry, J. 1999. Improving the safety of fresh produce with antimicrobials. Food Technology. 53: 54-58 p.

Dlamini, B.; E. Buys. 2008. Survival and growth of acid adapted Escherichia coli strains. In broth at different pH levels. Journal of Food Safety. Department of Food Science. University of Pretoria, Lynnwood Road. Petoria. South Africa. 14 p.

Escudero, M.E.; L. Velázquez.; M.S. Di Genaro.; A.M. De Guzmán. 1999. Effectiveness of various disinfectants in the elimination of *Yersinia enterocolitica* on fresh lettuce. Journal of Food. Vol. 62. No. 6. 665 p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2009. Buenas prácticas de higiene en la preparación y venta de los alimentos en la vía pública en América Latina y Caribe (en línea). Consultado el 25 de Mayo, 2012. Disponible en: http://www.rlc.fao.org/es/inocuidad/pdf/higiene.pdf

FDA (Food and Drug Administration). 2012. FDA Food and Feed Items that are of current Interest to the FDA for Microbiological Methods Validation (en línea) Consultado el 31 de Agosto de 2012. Disponible en: http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm301008.htm#refstar

Fong, D.; C. Gaulin.; M. Lê.; M. Shum. 2011. Effectiviness of alternative antimicrobial agents for disinfection of hard surfaces. Centre for Environmental Health. 18 p.

García, R.; J. Chávez.; A. Mejía.; C. Durán de Bazúa. 2002. Microbiological determinations of some vegetales from the Xochimilco, Mexico. Latinoam Microbiology. 24-24 p.

Gil, M.; A. Allende.; F. López-Gálvez.; M. Selma. ¿Hay alternativas al cloro como higienizante para productos de IV gama? No. 69. Grupo de calidad, seguridad y bioactividad de alimentos vegetales. Departamento de Ciencias y Tecnologías de Alimento CEBAS-CSIC. Campus de Espinardo, Murcia, España. 45 p.

Han, Y.; D. Sherman.; R. Linton.; S. Nielsen.; P. Nelson. 2000. The effects of washing and chlorine dioxide gas on survival and attachment of Escherichia coli O157:H7 to green pepper surfaces. Vol. 17. Issue 5. Purdue University, Agricultural Research Program. West Lafayette, USA.

Hormazabal, A.1999. Efecto de la IV gama en la mezcla de Lechuga (*Lactuca sativa*) tipo escarola y palta (Persea americana Mill) cvs. Edranol , Hass y negra de la cruz. Taller de licenciatura. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. Área de Hortalizas y Flores. Quillota, Chile. 53 p.

Ihl, M.; L. Aravena.; E. Scheuermann.; E. Uqiche.; V. Bifani. 2003. Effect of immersion solutions on shelf-life of minimally processed lettuce. Journal Elsiever. Departamento de Ingeniería Química. Universidad La Frontera. Temuco, Chile. 10 p.

Inatsu, Y.; M. Bari.; S. Kawasaki.; K. Isshiki.; S. Kawamoto. 2005. Efficacy of acidified sodium chlorite treatments in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on Chinese cabbage. Journal of Food. Vol. 68. No. 2. 251 p.

Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition (JIFSAN). 2002. Mejorando la Seguridad y Calidad de Frutas y Hortalizas Frescas: manual de formación para instructores. Sección II. 62 p.

LeChevallier, M.; C. Cawthon.; R. Lee. 1998. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. Applied and Environmental Microbiology. 649 p.

León, A.; D. Frezza.; A. Chiesa. 2007. Evolución del color en lechuga (Lactuca sativa L.) mantecosa mínimamente procesada: Efecto del troceado y la inmersión en cloruro de calcio. V congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. Cátedra de Horticultura. Facultad de Agronomía. San Martín, Buenos Aires, Argentina. 10 p.

López, L.; J. Romero.; F. Duarte. 2003. Calidad microbiológica y efecto del lavado y desinfección en vegetales pre-trozados expendidos en Chile. Archivo Latinoamericano de nutrición. 88 p.

Luo, Y.; Q. He.; J. McEvoy. 2010. Effect of storage temperature and duration on the behavior of Escherichia coli O157:H7 on packaged fresh-cut salad containing romaine and iceberg lettuce. Journal of Food Science. Vol.75. No. 7. 390 p.

Monge, R.; M. Chinchilla.; L. Reyes. Estacionalidad de parásitos y bacterias intestinales en hortalizas que se consumen en Costa Rica. Revista Biológica Tropical. Vol. 5. 375 p.

OMS (Organización Mundial de la Salud) 2012. Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud: Fomento del consumo mundial de frutas y verduras (en línea). Consultado el 1 de Octubre de 2012. Disponible en: http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/es/index1.html

Perez, K. 2010. Efficacy of consumer-available antimicrobials for the disinfection of pathogen contaminated green bell pepper and efficacy of consumer cleaning methods for the decontamination of knives. Submitted to the Office of Graduate Studies of Texas A&M University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. Texas. USA. 79p.

Rincón, V.; M. Ginestre.; S. Romero.; M. Castellano.; Y. Ávila. 2010. Calidad microbiológica y bacterias enteropatógenas en vegetal de hoja. Cátedra de biotecnología clínica. Escuela de bioanálisis, Universidad del Zuila. Maracaibo, Venezuela. 10 p.

Rivera, M.; C. Rodriguez.; J. López. 2009. Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. Revista Peruana de Salud Pública. 48 p.

Sapers, G. 2001. Efficacy of washing and sanitizing methods for disenfection of fresh fruit and vegetables products. U.S. Department of Agriculture, Agricultural research service, Eastern regional research center, East Mermaid Lane, Wyndmoor, U.S.A. 7 p.
Somers, E., Schoeni, J., Wong, C. 1994 Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*and *Salmonella typhimurium*. Int. J. Food Microbiology. 269 p.

Solomon, E.; M. Sharma, 2009. Microbial attachment and limitations of decontamination methodologies. Elsiever. 25 p.

Somers, E.; S. Schoeni.; A. Wong. 1994. Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. Journal of Food Microbiology. 269 p.

Vásquez, A.; M. Gras.; D. Vidal. 2008. Lechuga de 4ª gama enrequecida en calcio. Evaluación de algunos parámetros de calidad. Master en Gestión y Seguridad Alimentaria. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 18 p.

Yuk, H.; M. Yoo.; J. Yoon.; K. Moon.; D. Marshall.; D. OH. 2006. Effect of combined ozone and organic acid treatment for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on lettuce. Journal of Food Science. IFT. Vol. 71, No. 3. 5 p.

Zhang, S.; J.M. Farber. 1996. The effects of various disinfectants against *Listeria Monocytogenes* on fresh-cut vegetables. Food Microbiology. 311 p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio Violet Red Bile Agar W/ MUG (4-metilumbeliferil-β-D-glucorónido) por un litro.

Compuesto	Cantidad
Enzima digestiva de gelatina	7 g
Extracto de levadura	3 g
Sales biliares	1.5 g
Lactosa	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Rojo neutral	0.03 g
Cristal violeta	0.002 g
MUG	0.1 g
Agar	15 g

pH final: 7.4 ± 0.2 a 25°C.

Fuente: Cheeptham y Lal 2010. http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3201-use-of-ec-mug-media-to-confirm-escherichia-coli-contamination-in-water-samples-protocol

Anexo 2. Ficha técnica de *E. coli* (ATCC 25922).

Organismo	*Escherichia coli* (Migula)
Aislamiento	Clínico
Depositor	FDA (Food and Drug Administration)
Transporte	Congelado-seco
Condiciones de crecimiento	Medio de agar tripticasa de soya, 37°C, aerobio
Usos	Cepa similar a E. coli patógenos para estudios de laboratorio

Fuente: ATCC 2012. http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=25922&Template=bacteria

Anexo 3. Comportamiento del color de la lechuga tratada con 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético en valores L, a y b en el día cero.*

Tratamiento	Concentración (mg/L^{-1})	Día cero (Inicio)		
		L	a	b
Cloro[1] + ÁA[2]	50/1000[3]	58.27±1.17 [a]	-4.52±0.42 [a]	17.01±1.43 [a]
Sin tratar		54.61±2.70 [a]	-4.70±1.21 [a]	17.50±3.72 [a]
CV		3.69%	20.79%	16.32%

[1]Hipoclorito de Calcio. [2]Ácido Acético. [3]Mezcla hipoclorito de calcio/Ácido. [*]Letras iguales dentro de la misma columna no son significativamente diferentes (P>0.05).

Anexo 4. Comportamiento del color de la lechuga tratada con 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético en valores L, a y b en el día tres.*

Tratamiento	Concentración (mg/L^{-1})	Día Tres		
		L	a	b
Cloro[1] + ÁA[2]	50/1000	51.75±2.23 [b]	-2.97±0.59 [b]	18.72±1.86 [a]
Sin tratar	-	58.92±3.00 [a]	-5.85±0.63 [a]	17.60±0.93 [a]
CV		4.78 %	13.90 %	8.09 %

[1]Hipoclorito de Calcio. [2]Ácido Acético. [*]Letras iguales dentro de la misma columna no son significativamente diferentes (P>0.05).

Anexo 5. Comportamiento del color de la lechuga tratada con 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético en valores L, a y b en el día cinco.*

Tratamiento	Concentración (mg/L^{-1})	Día cinco		
		L	a	b
Cloro[1] + ÁA[2]	50/1000	51.75±2.23 [b]	-2.97±0.59 [b]	18.72±1.86 [a]
Control	-	56.17±0.94 [a]	-5.56±0.86 [a]	17.40±1.77 [a]
CV				

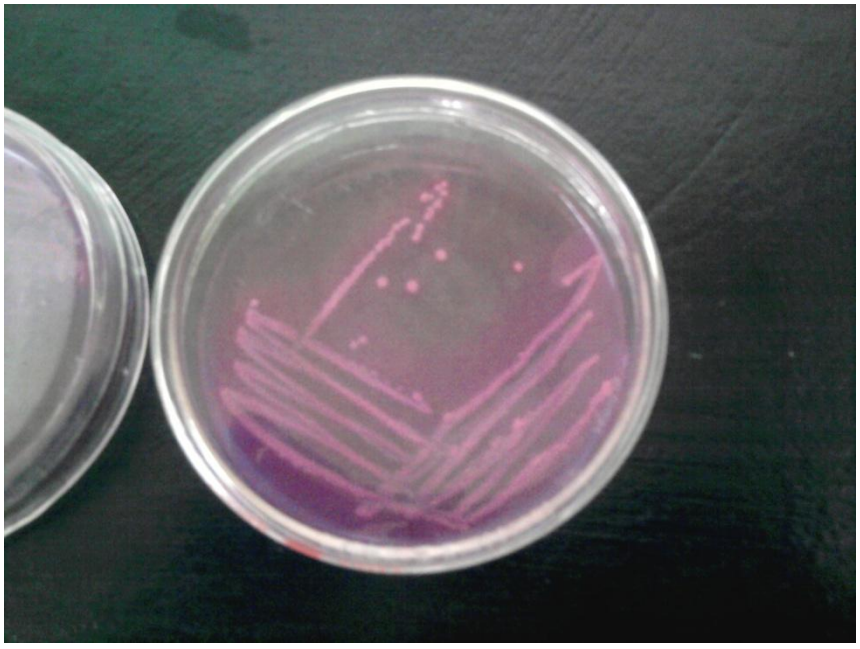
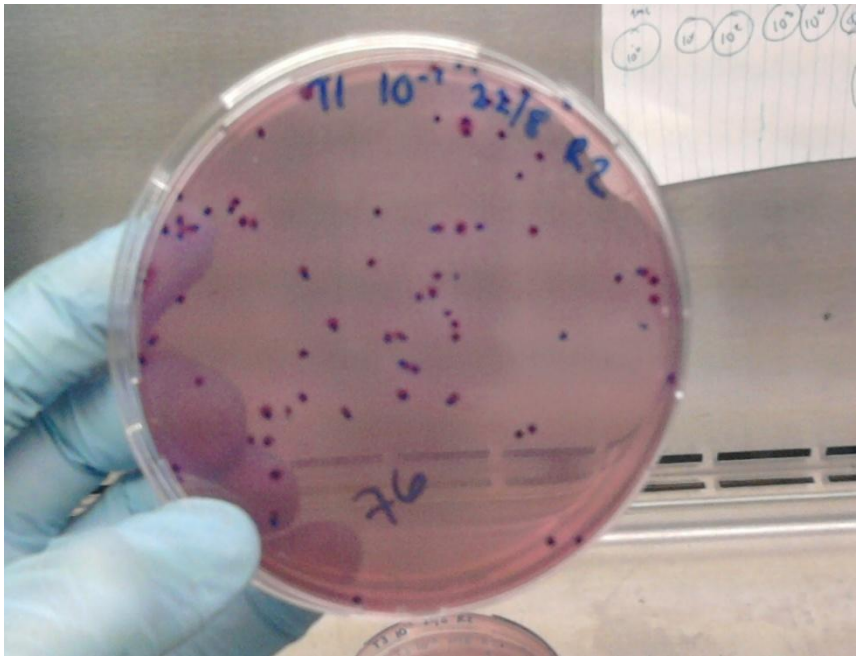
[1]Hipoclorito de Calcio. [2]Ácido Acético. [*]Letras iguales dentro de la misma columna no son significativamente diferentes (P>0.05).

Anexo 6. Comportamiento de tensión (Newtons) requerida para ruptura de lechuga tratada con 50 mg L^{-1} de cloro y 1000 mg L^{-1} de ácido acético almacenada a 12°C durante 5 días.*

Tratamiento	Concentración (mg/L^{-1})	Tensión (Newtons)		
		Inicio	Día tres	Día cinco
Cloro[1] + ÁA[2]	50/1000	3.64±0.31 [a]	2.72±0.31 [b]	2.31±0.56 [b]
Control	-	2.5±0.32 [b]	4.47±0.61 [a]	3.39±0.29 [a]
CV		10.23%	13.53%	15.55%

[1]Hipoclorito de Calcio. [2]Ácido Acético. [*]Letras iguales dentro de la misma columna no son significativamente diferentes (P>0.05).

Anexo 7. Caracterización morfológica de *E. coli* (ATCC 25922).



Anexo 8. Recuento de colonias de *E. coli* (ATCC 25922).