

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación

Bio-control con bacteriófagos para reducir la contaminación por *Escherichia coli* en lechuga romana (*Lactuca sativa L. var. longifolia*) en el mínimo proceso

Estudiantes

Gabriela Ester Ardón Ticas

Diego Alejandro Cazares Laguna

Asesores

Ligia Elizabeth Luna Jarrin, M.Sc.

Jorge Alfredo Cardona Ponce, Ph.D.

Honduras, septiembre 2024

Autoridades

SERGIO ANDRÉS RODRÍGUEZ ROYO

Rector

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidente y Decana Académica

ADELA M. ACOSTA MARCHETTI

Directora Departamento de Agroindustria Alimentaria

JULIO NAVARRO

Secretaría General

Agradecimientos

Extendemos nuestro sincero agradecimiento a la Licenciada Mayel Mateo y a la Licenciada Sayda Guzmán, por su invaluable apoyo y orientación a lo largo de todo el desarrollo del proyecto. Su dedicación y conocimiento fueron esenciales para que pudiéramos alcanzar esta meta con éxito.

Contenido

Agradecimientos	3
Contenido.....	4
Índice de Cuadros.....	6
Índice de Figuras	7
Índice de Anexos	8
Abstract	10
Introducción	11
Ubicación.....	15
Materiales	15
Diseño Experimental	15
Fase I. Aislamiento de Bacteriófagos	16
Obtención de la Muestra de Agua	16
Enriquecimiento y Purificación de Fagos	16
Fase II. Preparación del Inóculo	18
Activación de la Cepa	18
Preparación del Inóculo	18
Fase III. Desinfección e Inoculación de la Lechuga.....	18
Fase IV. Preparación de Tratamientos	19
Tiempos de Muestreo	19
Fase V. Inmersión de Hojas de Lechuga en los Tratamientos.....	20
Análisis Microbiológico	20
Análisis Físicos.....	21
Análisis de Color.....	21
Análisis de Textura	21
Resultados y Discusión.....	22

Análisis Microbiológicos.....	22
Color.....	25
Textura.....	28
Conclusiones	31
Recomendaciones	32
Referencias.....	33
Anexos.....	36

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Descripción de los tratamientos	19
Cuadro 2 Preparación de Tratamientos Desinfectantes	20
Cuadro 3 Recuentos de E. coli en la lechuga a los días 0, 1 y 7 de almacenamiento en refrigeración.	25
Cuadro 4 Valor del ángulo de matiz a través del tiempo	26
Cuadro 5 Valor de Croma a través del tiempo	28
Cuadro 6 Dureza de la lechuga a los días 0, 1 y 7 de almacenamiento en refrigeración.	30

Índice de Figuras

Figura 1 Comparación de los Parámetros de Color (a^* y b^*) en Lechugas Tratadas con Diferentes Desinfectantes en: a) Hora 0; b) Día 1; c) Día 7.....	27
---	----

Índice de Anexos

Anexo A Valor de L a través del tiempo	36
Anexo B Valor de a^* a través del tiempo	37
Anexo C Valor de b^* a través del tiempo	38

Resumen

El mercado de frutas y verduras mínimamente procesadas ha crecido rápidamente en las últimas décadas, gracias a su frescura, conveniencia y beneficios para la salud. En los últimos 30 años, el consumo per cápita de productos frescos en EE. UU. ha aumentado un 25%. No obstante, la susceptibilidad de estos productos a la contaminación por microorganismos patógenos ha generado crecientes preocupaciones sobre su inocuidad. Aunque desinfectantes tradicionales como el hipoclorito de calcio y el ácido peracético son eficaces para reducir la contaminación, han surgido inquietudes sobre sus posibles efectos negativos y los riesgos asociados con su mal uso. Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas más naturales y seguras. Esta investigación evaluó la eficacia de los bacteriófagos líticos como alternativa a los desinfectantes químicos convencionales para reducir la contaminación por *E. coli* en lechugas romanas mínimamente procesadas. Se emplearon dos concentraciones de bacteriófagos (10^6 y 10^8 UFP) y se probaron diferentes tiempos de aplicación (2 y 10 minutos). Los resultados indicaron que los tratamientos con bacteriófagos durante 10 minutos lograron una reducción significativa de la carga microbiana de *E. coli*, comparable a la efectividad de los desinfectantes químicos tradicionales. Además, el uso de bacteriófagos no afectó negativamente las propiedades físicas de la lechuga, como el color y la textura, manteniendo su calidad sensorial. Esta investigación sugiere que los bacteriófagos pueden ser una opción eficaz y segura para reducir la contaminación por *E. coli* en lechugas, promoviendo prácticas libres de químicos.

Palabras clave: Color, contaminación, desinfectantes naturales, inocuidad, textura.

Abstract

The market for minimally processed fruits and vegetables has rapidly expanded in recent decades, driven by their freshness, convenience, and health benefits. Over the past 30 years, per capita consumption of fresh produce in the U.S. has increased by 25%. However, their susceptibility to contamination by pathogenic microorganisms has raised significant food safety concerns. While traditional disinfectants such as calcium hypochlorite and peracetic acid effectively reduce contamination, there are growing concerns about their potential negative effects and risks associated with improper use. This has spurred interest in safer, more natural alternatives. This study assessed the effectiveness of lytic bacteriophages as an alternative to conventional chemical disinfectants for reducing *E. coli* contamination on minimally processed romaine lettuce. Two concentrations of bacteriophages, 10^6 and 10^8 CFU, were used, and different application times (2 and 10 minutes) were tested. The results showed that 10-minute treatments with bacteriophages achieved a significant reduction in *E. coli* microbial load, comparable to the effectiveness of traditional chemical disinfectants. Additionally, the use of bacteriophages did not negatively impact the physical properties of the lettuce, such as color and texture, thus preserving its sensory quality. This study suggests that bacteriophages could be a highly effective and safe option for reducing *E. coli* contamination on lettuce, promoting chemical-free practices.

Keywords: Color, contamination, food safety, natural disinfectants, texture.

Introducción

El consumo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) ha aumentado en años recientes, tanto en su forma de lechuga entera lavada y empacada mínimamente procesada, como en presentaciones troceadas, ya sea sola o como parte de ensaladas (Capozzi et al., 2009). Según el (National Agricultural Statistics Service USDA; National Agricultural Statistics Service USDA), la producción total de lechuga romana en 2019 fue de 27.4 millones de libras, destinada íntegramente al mercado de productos frescos. Asimismo, el (Marketing Resource Center, 2021) reportó que el valor de la producción de lechuga en los EE. UU. en 2015 alcanzó casi 1,900 millones de dólares, posicionándola como el cultivo vegetal de mayor valor económico. Sin embargo, en países de Latinoamérica, se ha demostrado la presencia de contaminación parasitaria y bacteriana en las hortalizas, siendo la lechuga el vegetal con mayor riesgo de contaminación microbiológica (Rodríguez Q et al., 2015).

Esto se debe, en gran parte, a la mala calidad del agua de riego, la presencia de animales y la manipulación inadecuada durante la cosecha y postcosecha (Rodríguez Q et al., 2015). Como resultado, el consumo de lechuga puede implicar un riesgo significativo de contraer enfermedades transmitidas por alimentos. Entre los microorganismos más comunes presentes en vegetales frescos y procesados se encuentran *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Shigella* spp. (Mendoza et al., 2022).

A pesar de los avances en la en la industria alimentaria para asegurar la inocuidad, como las intervenciones antimicrobianas y la implementación de sistemas HACCP, la contaminación por *E. coli* O157:H7 sigue siendo un desafío, especialmente en alimentos como la carne roja y los productos frescos (Vikram et al., 2020). Aunque *E. coli* es el anaerobio facultativo predominante en la flora intestinal humana y generalmente permanece en el organismo de forma inofensiva, en individuos inmunodeprimidos o con barreras gastrointestinales alteradas, incluso cepas no patógenas pueden provocar infecciones (Gomes et al., 2016). Debido a la frecuente implicación de los productos frescos en brotes de enfermedades alimentarias, ha ganado mayor relevancia el uso de agentes desinfectantes efectivos durante el lavado para garantizar la inocuidad del producto (Petri et al., 2015).

Históricamente, el primer método de limpieza consistió en lavar los vegetales frescos con agua para eliminar la suciedad y materiales extraños (Castro-Ibáñez et al., 2017). Sin embargo, es necesario utilizar agentes desinfectantes o técnicas físicas para reducir la carga microbiana en frutas y verduras. Los desinfectantes y los métodos de desinfección deben garantizar que los productos mínimamente procesados (PMP) mantengan una calidad, inocuidad y bajos residuos similares a los de los productos frescos. Por ello, las industrias de PMP deben implementar diversas estrategias, combinando o introduciendo técnicas sostenibles, con un enfoque particular en los procedimientos estándar de desinfección (Mendoza et al., 2022).

Diversos agentes químicos de lavado han sido estudiados para evaluar su eficacia en la inactivación de bacterias patógenas en vegetales. Si bien el cloro sigue siendo el desinfectante más utilizado por su efectividad, bajo costo y facilidad de uso, es probable que futuras regulaciones impulsen el desarrollo de alternativas más funcionales. En este sentido, compuestos como los ácidos orgánicos, el dióxido de cloro, el ácido peracético, el peróxido de hidrógeno y el ozono ya han sido aprobados para su uso en productos frescos, cada uno con distintas tasas de eficacia, costos y métodos de aplicación. En conjunto, estas intervenciones son fundamentales para reducir la presencia de patógenos en los alimentos (Vikram et al., 2020). Entre ellos, el ácido peracético se destaca como una opción prometedora en la industria de productos frescos cortados, gracias a su potente capacidad oxidante (Petri et al., 2015).

Una alternativa prometedora en el proceso de desinfección es el uso de bacteriófagos líticos. Estos virus parasitan a las bacterias y las eliminan durante su ciclo reproductivo, lo que representa un enfoque novedoso y ecológicamente amigable para el control de patógenos. “Los bacteriófagos pueden presentar dos estados funcionales: el ‘estado lítico’ o ‘virulento’, en el cual el fago se replica y causa la lisis de la bacteria huésped, liberando nuevos fagos” (Domínguez Navarrete, 2020). Los fagos líticos son muy efectivos para lisar cepas bacterianas específicas, pero no son eficaces contra especies bacterianas no relacionadas. Por otro lado, los bacteriófagos también pueden encontrarse en un estado ‘lisogénico’, en el cual no provocan una lisis inmediata de la bacteria. En este estado, los

bacteriófagos inyectan su material genético en la bacteria hospedadora y permanecen en una forma latente conocida como "profago".

Los bacteriófagos lisogénicos replican y transmiten su material genético de manera estable hasta que se desencadena un ciclo lítico. Este proceso puede ser inducido por factores como la radiación UV, agentes químicos o la competencia entre bacteriófagos por la bacteria hospedadora, lo que provoca daño en el ADN de la bacteria y desencadena la lisis (Sieiro et al., 2020). Los bacteriófagos pueden ser aislados a partir de aguas residuales debido a su composición. Las aguas residuales contienen una fase líquida, que es agua, y una fase sólida compuesta de partículas de lodo, heces, bacterias y virus. La fase sólida de las aguas residuales suele asociarse a la presencia de bacteriófagos (Gabriel Gaviria A et al., 2012). A partir de este medio se ha empleado un método de aislamiento de bacteriófagos para su uso en la investigación.

El uso de fagos como biocontrol ofrece un enfoque antimicrobiano no químico, ecológico y altamente específico para mejorar la inocuidad de los alimentos (Moye et al., 2018). Varios productos basados en fagos han sido reconocidos como seguros (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA, por sus siglas en inglés) y ya se comercializan en Estados Unidos y otros países para aplicaciones en inocuidad alimentaria. Además, los bacteriófagos han demostrado su efectividad la reducción de la contaminación por *E. coli* en diversos entornos, como en laboratorios, reduciendo significativamente la carga microbiana de patógenos en canales de pollo (Wójcicki et al., 2019) y utilizándose como mecanismo de control biológico en vegetales frescos (Abuladze et al., 2008).

Para que el biocontrol con fagos se adopte de manera más amplia, será esencial educar tanto al público como a los procesadores de alimentos sobre la seguridad, eficacia y ubicuidad de los bacteriófagos, explicando sus beneficios y promoviendo su aceptación en el ámbito de la inocuidad alimentaria.

El alcance de este estudio está asociado a los Objetivos de Desarrollo Sostenible, que buscan poner fin al hambre, mejorar la seguridad alimentaria y promover una agricultura sostenible. La implementación de alternativas de biocontrol, como el uso de bacteriófagos, no solo reduce el riesgo

de enfermedades transmitidas por alimentos, sino que también promueve la adopción de prácticas más sostenibles y ecológicas en la producción de alimentos. Al garantizar la inocuidad de los productos frescos sin recurrir a productos químicos tradicionales, se asegura un acceso más equitativo a alimentos seguros y nutritivos, contribuyendo así a la mejora de la salud y nutrición de la población, especialmente en regiones con alta vulnerabilidad.

Esta investigación tuvo como objetivo identificar la capacidad de los bacteriófagos aislados de aguas residuales para actuar como agentes líticos en el control de *E. coli* en el mínimo proceso de lechugas romanas, proponiéndolos como una alternativa a los desinfectantes químicos en la industria de postcosecha. Asimismo, busca determinar el efecto de diferentes tiempos de contacto (2 y 10 minutos) y concentraciones de bacteriófagos en su capacidad para lograr un nivel de desinfección comparable al de los tratamientos tradicionales. Finalmente, se evaluó el impacto de los tratamientos con bacteriófagos sobre las características de calidad de la lechuga, como el color y la textura, en comparación con los efectos de los desinfectantes convencionales.

Materiales y Métodos

Ubicación

La investigación se desarrolló en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, ubicada en el kilómetro 30 carretera de Tegucigalpa a Danlí, Valle del Yeguaré, Municipio de San Antonio de Oriente, Francisco Morazán, República de Honduras. La preparación de la materia prima y los análisis microbiológicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ) y el análisis de color y textura se realizó en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ).

Materiales

Se utilizó lechuga romana (*Lactuca sativa L. var. longifolia*) como insumo principal, adquirida en la Planta de Poscosecha de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Las lechugas fueron seleccionadas al azar, colocadas en bolsas plásticas y transportadas al Laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano (LMAZ), donde se acondicionaron para su posterior uso.

Los fagos empleados en el proceso de desinfección poscosecha fueron aislados en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ) a partir de una muestra de agua residual recolectada en la laguna de oxidación de Zamorano.

Diseño Experimental

Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) para evaluar nueve tratamientos mediante medidas repetidas a las horas 0, 24 y 7 días, con un total de tres repeticiones por tratamiento, para un total de 81 unidades experimentales. Se hizo un Análisis de Varianza (ANDEVA) utilizando el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS, versión 9.4), y una separación de medias mediante el método de Duncan, con un nivel de significancia del 95%.

Fase I. Aislamiento de Bacteriófagos

Obtención de la Muestra de Agua

Se recolectó una muestra de agua residual proveniente de la laguna de oxidación de Zamorano en un frasco desechable, la cual fue debidamente rotulada y trasladada al Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano, donde se almacenó a temperatura ambiente.

Enriquecimiento y Purificación de Fagos

Dado que la concentración de fagos en la muestra recolectada era baja, se realizó un proceso de enriquecimiento para permitir su multiplicación. Para ello, se utilizó un medio de cultivo específico, compuesto por 5 mL de DSPB y 5 mL de caldo TSB, previamente incubado con *E. coli*, que se añadió a 100 mL de la muestra de agua proveniente de las lagunas de oxidación. Posteriormente, la mezcla se incubó a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se transfirió a tubos Falcon y se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos. Este procedimiento se repitió para eliminar impurezas y aislar fagos en el sobrenadante.

El sobrenadante, que contenía los fagos, fue filtrado para separarlos del resto de la carga microbiana. Se utilizó un filtro con poros de 0.22 μm , que retuvo las bacterias debido a su tamaño, permitiendo que solo los fagos lo atravesaran. Posteriormente, la solución se distribuyó en tubos estériles, a los cuales se les añadieron 2 gotas de cloroformo, el cual actuó como agente desnaturizante sobre las proteínas y lípidos en las membranas celulares de las bacterias que pudieron haber atravesado el filtro. Los tubos permanecieron refrigerados hasta su aplicación como desinfectante.

Para evaluar su efectividad, se llevó a cabo una prueba de desafío microbiológico. Según (Rivas y Pérez, 2022), esta prueba "consiste en determinar la supervivencia de un microorganismo intencionadamente inoculado en el alimento tras ser sometido a las condiciones previstas de procesado, almacenamiento o distribución". Para ello, se preparó una mezcla en viales de 1.5 mL con 0.80 mL de caldo TSB, 0.10 mL de caldo TSB inoculado con *E. coli* y 0.10 mL de la solución concentrada con los fagos. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 desde 10^{-1} hasta 10^{-8} y se sembraron 3 placas en

agar TSA con las diluciones de 10^{-6} hasta 10^{-8} utilizando el método de vertido en placa, seguido de una segunda capa de agar TSA. Las placas fueron incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Después del tiempo de incubación, se observó el crecimiento de colonias de *E. coli* y se evidenció el proceso lítico causado por el efecto de los fagos. A partir de esto se realizó el conteo de placas, que mostró una concentración de 10^9 UFP. Para los fines de esta investigación, se utilizaron dos concentraciones diferentes en el proceso de desinfección: 10^6 UFP y 10^8 UFP, siendo cada una probada en dos tiempos de inmersión distintos: 2 y 10 minutos.

Fase II. Preparación del Inóculo

Activación de la Cepa

La cepa utilizada en este estudio fue *E. coli* ATCC 35218, un bacilo facultativo Gram Negativo no patógeno. Se mantuvo en refrigeración (4 °C) en tubos con agar soya tripticasa inclinado. Posteriormente, se transfirió a una placa con Agar Cuenta Estándar utilizando la técnica de estría en superficie para aislar las colonias del microorganismo. La placa se incubó a 37 °C durante 24 horas para verificar la obtención de un cultivo puro.

Preparación del Inóculo

Se seleccionaron 3 colonias aisladas de la cepa reactivada de *E. coli* ATCC 35218 y estas se sembraron en un tubo con 5 mL de caldo TSB para obtener una concentración conocida de 10^8 . Posteriormente se llevó a un período de incubación de 24 horas a 35 °C.

Fase III. Desinfección e Inoculación de la Lechuga

Previo a la inoculación con *E. coli*, se desinfectó la materia prima en tres etapas. En la primera, la lechuga se sometió a un lavado con agua potable para retirar la carga de materia orgánica superficial. Luego, se escurrieron las muestras para retirar el exceso de agua y se colocaron sobre papel toalla para secarlas por completo. Una vez preparadas, se tomaron porciones utilizando un molde de aluminio de 4 cm × 4 cm. Para evitar dañar en exceso las hojas, se emplearon cuchillas afiladas durante el corte. Las nuevas muestras consistieron en 30 gramos por tratamiento, sumando un total de 270 gramos por repetición.

En la segunda etapa, se aplicó un rocío de etanol al 70%, permitiendo que actuara durante un tiempo de 5 minutos. Según (Diomedi et al., 2017), el etanol destruye la membrana celular bacteriana al reducir su tensión superficial y desnaturalizar las proteínas, lo que interfiere con el metabolismo y provoca la lisis celular. A concentraciones del 70%, el etanol penetra de manera más eficaz en el protoplasma bacteriano y puede actuar en tan solo 15 segundos. En la última etapa, se eliminaron los residuos de etanol mediante un lavado con agua esterilizada (Mendoza V. y Cantor B., 2012). Se

seleccionaron 30 g de lechuga y se colocaron en una bolsa estéril, representando el control negativo, sin ser inoculados.

Después de la desinfección, cada lado de las hojas de la muestra fue rociado con 12 mL de caldo TSB inoculado con *E. coli* a una concentración estandarizada de 10^8 UFC. Posteriormente, las 240 g de lechuga inoculados se colocaron en una bolsa plástica estéril para homogenizar la muestra, asegurando así una distribución aleatoria al momento de aplicar los desinfectantes. La lechuga se dejó reposar a temperatura ambiente durante 4 horas para permitir que la bacteria se estableciera. Transcurrido este tiempo, la muestra se dividió en 8 bolsas estériles, con 30 gramos de lechuga en cada una, para su tratamiento posterior.

Fase IV. Preparación de Tratamientos

La Lechuga fue sometida a un total de 9 tratamientos: un control positivo sin desinfección, un control negativo sin inoculación, solución acuosa clorada (HTH® al 64%), ácido peracético, ácido ascórbico, fagos 10^6 UFP por 2 minutos, fagos 10^8 UFP por 2 minutos, fagos 10^6 UFP por 10 minutos y fagos 10^8 UFP por 10 minutos (Cuadro 1).

Cuadro 1

Descripción de los tratamientos

Variedad	Tratamiento	Ingrediente activo	Concentración	Tiempo de acción (minutos)
	1	N/A	Control +	N/A
	2	N/A	Control -	N/A
	3	Hipoclorito de calcio	100 ppm	2
	4	Ácido ascórbico	100 ppm	2
Romana	5	Ácido peracético	60 ppm	2
	6	Fagos	10^6 UFP	2
	7	Fagos	10^6 UFP	10
	8	Fagos	10^8 UFP	2
	9	Fagos	10^8 UFP	10

Nota. ppm: partes por millón; UFP: Unidades Formadoras de Placa; Control +: Lechuga inoculada sin tratamiento desinfectante posterior; Control -: Lechuga sin inóculo bacteriano.

Tiempos de Muestreo

Se evaluó la eficacia de los desinfectantes a lo largo del tiempo, realizando análisis microbiológicos en tres momentos: 0 horas, 24 horas y 7 días. Además, en cada tratamiento fueron

evaluado características físicas para cada momento respectivamente con el objetivo de monitorear el color y la textura como aspectos de calidad, manteniendo las muestras de lechuga en refrigeración.

Fase V. Inmersión de Hojas de Lechuga en los Tratamientos

El procedimiento se realizó con la asistencia de instrumentos desinfectados con etanol al 70%, con el objetivo de prevenir la contaminación por otros microorganismos. Se prepararon un total de 7 recipientes. En 6 de ellos se midieron 200 mL de agua potable: 1 recipiente se preparó con 0.1 gramos de hipoclorito de calcio (HTH® al 64%), 1 con 0.061 gramos de ácido ascórbico, 2 con 0.2 mL de fagos 10^6 UFP, y 2 con 20 mL de fagos 10^8 UFP. Además, en un séptimo recipiente, se midieron 500 mL de agua potable y se añadió 0.4 mL de ácido peracético (Cuadro 2).

Cuadro 2

Preparación de Tratamientos Desinfectantes

Tratamiento	Ingrediente activo	Soluto	Solvente
3	Hipoclorito de calcio	0.10 g	200 mL H ₂ O
4	Ácido ascórbico	0.061 g	200 mL H ₂ O
5	Ácido peracético	0.40 mL	500 mL H ₂ O
6	Fagos 10^6 UFP	0.20 mL	200 mL H ₂ O
7	Fagos 10^6 UFP	0.20 mL	200 mL H ₂ O
8	Fagos 10^8 UFP	20.0 mL	200 mL H ₂ O
9	Fagos 10^8 UFP	20.0 mL	200 mL H ₂ O

Nota: UFP: Unidades Formadoras de Placas; Tratamientos 1 y 2 son Controles positivo y negativo respectivamente y no fueron incluidos en el proceso de desinfección.

En cada recipiente se sumergieron 30 gramos de lechuga inoculada. El tiempo de exposición fue de 2 minutos para cada desinfectante, mientras que para los fagos se utilizó un tiempo de exposición de 2 y 10 minutos en ambas concentraciones. Posteriormente se escurrieron las muestras individualmente y se colocaron en bolsas estériles.

Para cada tratamiento, se pesaron 10 gramos de lechuga en bolsas distintas y a cada bolsa se le añadió 90 mL de Buffer Fosfato para hacer una dilución 1:10 y se homogenizó por 1 minuto en el Stomacher. Este procedimiento se realizó en cada momento en el tiempo.

Análisis Microbiológico

Para la cuantificación de *E. coli* se realizó diluciones seriadas de la muestra, desde 10^3 hasta 10^5 , para cada tratamiento. Las muestras fueron sembradas en el medio de cultivo Agar Cuenta Estándar utilizando la técnica de extendido en superficie. Posterior a la siembra las muestras fueron incubadas a 35 °C durante 24 horas. Tras el período de incubación, se realizó la cuantificación de colonias y se reportó en unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g).

Análisis Físicos

Se realizaron análisis de color y textura para evaluar el impacto de los tratamientos experimentales en comparación con los métodos tradicionales de la planta Postcosecha de Zamorano y el grupo de control, centrándose en los parámetros físicos de las hojas de lechuga. Se seleccionaron 2 hojas de lechuga para cada tratamiento. Una hoja se utilizó para el análisis de color y la otra para el análisis de textura, asegurando así la evaluación completa de los efectos del desinfectante aplicado.

Análisis de Color

El análisis de color se realizó con la aplicación "ColorAssistant" y el Foto Estudio PULUZ. Se midió el color de la hoja en la parte central de la nervadura.

Se capturó una fotografía de cada muestra a una distancia de 10 cm. Todas las imágenes se tomaron bajo condiciones idénticas para evitar variaciones en la luminosidad, la distancia y el ángulo de las tomas. Los valores registraron en formato RGB y luego se convirtieron a $L^*a^*b^*$, mediante la calculadora en línea ColorMine para su posterior análisis.

Análisis de Textura

En cuanto a textura, se midió la dureza de la vena de la hoja de lechuga en Newton utilizando el texturómetro Brookfield CT3 4500. Se empleó la sonda TA53 junto con la base TA-RT-KIT. Los análisis de dureza se realizaron con una carga de activación de 0.067 Newton y una velocidad de 2mm seg^{-1} .

Resultados y Discusión

Análisis Microbiológicos

A la hora 0, el ácido peracético mostró la mayor reducción de carga bacteriana, con un valor de 6.84 ± 0.51 UFC/g. El mecanismo de acción del ácido peracético se basa en la oxidación de los componentes estructurales y funcionales de los microorganismos. Una de sus principales ventajas es que mantiene su efecto biocida incluso en presencia de cierta contaminación con materia orgánica (Aguayo et al., 2017). Al igual que el ácido peracético, el tratamiento que logró mayor reducción de *E. coli* fue fagos 10^8 UFP con 10 minutos de exposición, presentaron una reducción de 6.98 ± 0.16 UFC/g, sin diferencias significativas con respecto al tratamiento con ácido peracético. De manera similar, los fagos a 10^6 UFP con 10 minutos de exposición tampoco mostraron diferencias significativas respecto a los tratamientos anteriores.

El hipoclorito de calcio no presentó diferencias significativas en comparación con los tratamientos mencionados, ni con el ácido ascórbico (control) y los fagos en ambas concentraciones con 2 minutos de exposición. Según (van Haute et al., 2013) "la eficacia del cloro como desinfectante para la descontaminación de la lechuga generalmente está limitada a reducciones de 1 a 2 logaritmos, incluso a concentraciones altas". Su eficiencia se debe a su capacidad para liberar ácido hipocloroso (HOCl) en solución acuosa (Bester, 2015), que ataca la membrana celular bacteriana, disminuyendo su permeabilidad y provocando la disrupción de otras funciones. Cuando las células se exponen al cloro, el ADN, ARN y proteínas se filtran fuera de ellas, restringiendo la síntesis de estos componentes y la captación de potasio, lo que finalmente conduce a la muerte celular (Bitton, 2010).

Al día 1, los fagos 10^8 UFP y 10^6 UFP con 10 minutos de exposición presentaron la mayor reducción de carga bacteriana, sin diferencias significativas respecto al ácido peracético. Tampoco se observaron diferencias significativas entre el ácido peracético y los fagos a 10^6 UFP con 10 minutos de exposición en comparación con el hipoclorito de calcio, que mostró menor efectividad en la reducción de la carga bacteriana. Esto concuerda con los resultados de (Petri et al., 2015), que indican que "el ácido peracético y el cloro tienen un poder bactericida similar contra *E. coli*". Por otro lado, los fagos a

10^8 UFP y 10^6 UFP con 2 minutos de exposición no presentaron diferencias significativas en relación con el ácido ascórbico.

Al día 7, los fagos a 10^8 UFP y 10^6 UFP con 10 minutos de exposición mantuvieron la mayor reducción de carga bacteriana, con valores de 6.39 ± 0.33 UFC/g y 6.50 ± 0.41 UFC/g respectivamente, mientras que el ácido peracético registró un recuento de 6.69 ± 0.58 UFC/g. Estos resultados indican que, a lo largo del tiempo, no se observaron diferencias significativas entre estos tratamientos ni con el hipoclorito de calcio, demostrando su eficacia.

En los recuentos iniciales, se observó una disminución de 1.06 log UFC/g en el tratamiento con ácido peracético en comparación con el ácido ascórbico (control). El tratamiento con fagos 10^8 UFP mostró una diferencia de 0.14 log UFC/g respecto al ácido peracético, pero esta diferencia cambió con el tiempo. Al día 1, los fagos a 10^8 UFP lograron una mayor reducción, con una diferencia de 0.18 log UFC/g entre ambos tratamientos, y esta tendencia continuó hasta el día 7, donde la diferencia alcanzó los 0.30 log UFC/g. La tendencia indica que, aunque la bacteria entró en estado de latencia debido a las bajas temperaturas de refrigeración, lo que ralentizó su actividad metabólica y los fagos también actuaron más lentamente, ya que dependen de la actividad bacteriana para replicarse. Aun así, al día 7, la disminución de la carga bacteriana causada por los fagos fue la más eficiente. En cambio, la reducción total del ácido peracético desde la hora 0 hasta el día 7 fue de 0.15 log UFC/g, lo que demuestra una menor efectividad a lo largo del tiempo.

El proceso de adquisición de una bacteria huésped por un fago se describe como adsorción, ya que da lugar a la adhesión del virión a la célula huésped (Dennehy y Abedon, 2021). El éxito de esta etapa depende de factores como movimiento del virión, su encuentro con la bacteria, la fijación a las superficies bacterianas, la cinética de la adsorción y la posterior translocación del genoma del fago al citoplasma bacteriano. Un factor clave es el tiempo de exposición de la matriz que contiene la bacteria, en este caso la lechuga, al desinfectante con los fagos. De acuerdo con (Segundo A. et al., 2010), el ciclo lítico de los fagos en *E. coli* dura aproximadamente 30 minutos y un tiempo de contacto de 10 minutos asegura una adecuada adsorción y penetración del fago en la bacteria.

Bajo este principio, los tratamientos con fagos 10^8 UFP y 10^6 UFP con una exposición de 10 minutos lograron los valores más bajos de carga microbiana a través del tiempo, superando al ácido peracético a partir del día 1. La ralentización observada en la reducción significativa de los fagos se debe a la mínima actividad microbiana a baja temperatura. (Gouvêa et al., 2016), las bacterias en refrigeración experimentan una desaceleración en su crecimiento, mientras que los bacteriófagos dependen de las funciones metabólicas de las bacterias hospedadoras para replicarse. A pesar de esta desaceleración, ambos tratamientos son comparables en eficacia a corto plazo bajo las condiciones experimentales evaluadas.

Por otro lado, los tratamientos con fagos a 10^8 UFP y 10^6 UFP con 2 minutos de exposición, probados para simular el tiempo de contacto de los desinfectantes químicos, no presentaron una reducción significativa en comparación con el ácido ascórbico (control), lo que indica que el tiempo de contacto es crucial para la efectividad de los fagos. Según (Mousavi et al., 2019), el ácido ascórbico tiene un efecto insignificante como antimicrobiano contra *E. coli*. Este tratamiento se utilizó para demostrar que la reducción de la carga microbiana se debía al arrastre de bacterias durante el lavado, y no a la acción del desinfectante. El control positivo evidenció la carga microbiana inicial después de la inoculación, proporcionando una base para comparar la eficacia de los tratamientos de desinfección.

A la hora 0, se registró una carga bacteriana de 8.5 log UFC/g, sin diferencias significativas respecto a los puntos de control de los días 1 y 7. Según (Jiménez García, 2016), esto se debe a que *E. coli*, como mesófilo, reduce su metabolismo a temperaturas bajas, impidiendo su reproducción en este periodo, aunque también puede haber muerte bacteriana natural. Sin embargo, esto no constituye una barrera o mecanismo de control efectivo contra el microorganismo. El control negativo se empleó para verificar la efectividad del proceso de esterilización de la lechuga previo a la inoculación y asegurar que no hubiera una carga microbiológica adicional que pudiera alterar los resultados de la investigación. Los resultados mostraron una carga microbiana total de < 10 UFC/g en los tres momentos evaluados (Cuadro 3).

Cuadro 3

Recuentos de E. coli en la lechuga a los días 0, 1 y 7 de almacenamiento en refrigeración NS.

Tratamiento	Tiempo de contacto (minutos)	Log UFC/g ± D.E. al día 0	Log UFC/g ± D.E. al día 1	Log UFC/g ± D.E. al día 7
Control positivo**	N/A	8.5 ± 0.16	8.20 ± 0.19	8.12 ± 0.23
Control negativo**	N/A	*	*	*
Ácido ascórbico (100ppm)	2	7.90 ± 0.46 ^b	7.69 ± 0.33 ^c	7.62 ± 0.32 ^b
Ácido peracético (60ppm)	2	6.84 ± 0.51 ^a	6.71 ± 0.57 ^{ab}	6.69 ± 0.58 ^a
Hipoclorito de calcio (100ppm)	2	7.44 ± 0.29 ^{ab}	7.26 ± 0.38 ^{bc}	7.05 ± 0.42 ^{ab}
Fagos 10 ⁶ UFP	2	7.85 ± 0.24 ^b	7.77 ± 0.29 ^c	7.55 ± 0.18 ^b
Fagos 10 ⁶ UFP	10	7.02 ± 0.21 ^a	6.67 ± 0.35 ^{ab}	6.50 ± 0.41 ^a
Fagos 10 ⁸ UFP	2	7.93 ± 0.33 ^b	7.85 ± 0.33 ^c	7.71 ± 0.37 ^b
Fagos 10 ⁸ UFP	10	6.98 ± 0.16 ^a	6.53 ± 0.36 ^a	6.39 ± 0.33 ^a
CV %		4.31	5.03	5.23

Nota. N/A: No aplica; UFC: Unidades Formadoras de colonia; D.E.: Desviación Estándar; C.V.: Coeficiente de Variación (%); ^{a-c} letras diferentes

en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (P < 0.05); NS: No presenta diferencias significativas con respecto al tiempo (P < 0.05); *: < 1 Log UFC; **: No fue tomado en cuenta para la separación de medias

Color

En el día 0, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Para el día 1, los tratamientos con ácido ascórbico, hipoclorito de calcio, y fagos (10⁶ y 10⁸ UFP) con 2 minutos de contacto no mostraron diferencias significativas entre sí, lo que indica que las lechugas con estos tratamientos tendieron hacia tonos más amarillos. Del mismo modo, los tratamientos con ácido peracético y fagos (10⁶ y 10⁸ UFP) con 10 minutos de exposición tampoco presentaron diferencias significativas entre ellos, siendo los que mejor conservaron el color verde. Al día 7, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. El ácido ascórbico es un antioxidante natural que se utiliza comúnmente en la industria alimentaria para prevenir el pardeamiento enzimático. Como señala (Toledo Toledo, 2009), “el ácido ascórbico actúa reduciendo los compuestos fenólicos oxidados (quinonas) regresándolos a su forma reducida, de ese modo previene el pardeamiento”.

Según los resultados del Cuadro 4, el ángulo de matiz de las lechugas tratadas con ácido ascórbico no mostró cambios significativos a lo largo del tiempo. En contraste, el ácido peracético sí presentó diferencias significativas. En la figura 1, se observa que al día 1 hubo un cambio de 9.46 grados, indicando una marcada tendencia hacia el color verde; sin embargo, al día 7, el color viró hacia tonos más amarillos, lo que sugiere una degradación del color durante el almacenamiento.

Cuadro 4*Valor del ángulo de matiz a través del tiempo*

Tratamiento	Tiempo de contacto	Ángulo de matiz ° ± D.E. al día 0	Ángulo de matiz ° ± D.E. al día 1	Ángulo de matiz ° ± D.E. al día 7
Ácido ascórbico (100ppm)	2	123.54 ± 1.74 ^{a x}	120.64 ± 1.41 ^{b x}	121.04 ± 1.36 ^{a x}
Ácido peracético (60ppm)	2	122.46 ± 0.63 ^{a y}	131.92 ± 0.80 ^{a x}	120.05 ± 0.41 ^{a z}
Hipoclorito de calcio (100ppm)	2	124.19 ± 0.64 ^{a x}	121.14 ± 2.45 ^{b x}	121.53 ± 4.85 ^{a x}
Fagos 10 ⁶ UFP	2	124.37 ± 1.63 ^{a x}	122.46 ± 1.65 ^{b x}	120.36 ± 2.80 ^{a x}
Fagos 10 ⁶ UFP	10	122.67 ± 1.44 ^{a y}	132.63 ± 0.71 ^{a x}	120.44 ± 0.94 ^{a z}
Fagos 10 ⁸ UFP	2	123.75 ± 1.12 ^{a x}	120.61 ± 1.14 ^{b y}	121.65 ± 1.10 ^{a xy}
Fagos 10 ⁸ UFP	10	124.24 ± 0.98 ^{a y}	132.02 ± 1.28 ^{a x}	121.59 ± 1.99 ^{a y}
CV %		1.17	1.86	1.96

Nota. N/A: No aplica; D.E.: Desviación Estándar; C.V.: Coeficiente de Variación (%); ^{a-b}letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (P < 0.05); ^{x-z}letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre momento en el tiempo (P < 0.05). Ángulo de matiz: valores cercanos a 0 ° son color rojo, valores cercanos a 90 ° son color amarillo, y valores cercanos a 180 ° son color verde.

El hipoclorito de calcio y los fagos 10⁶ UFP con 2 minutos de exposición no presentaron diferencias significativas a través del tiempo, lo que indica que las lechugas con estos tratamientos mantuvieron su color verde de manera constante durante su almacenamiento.

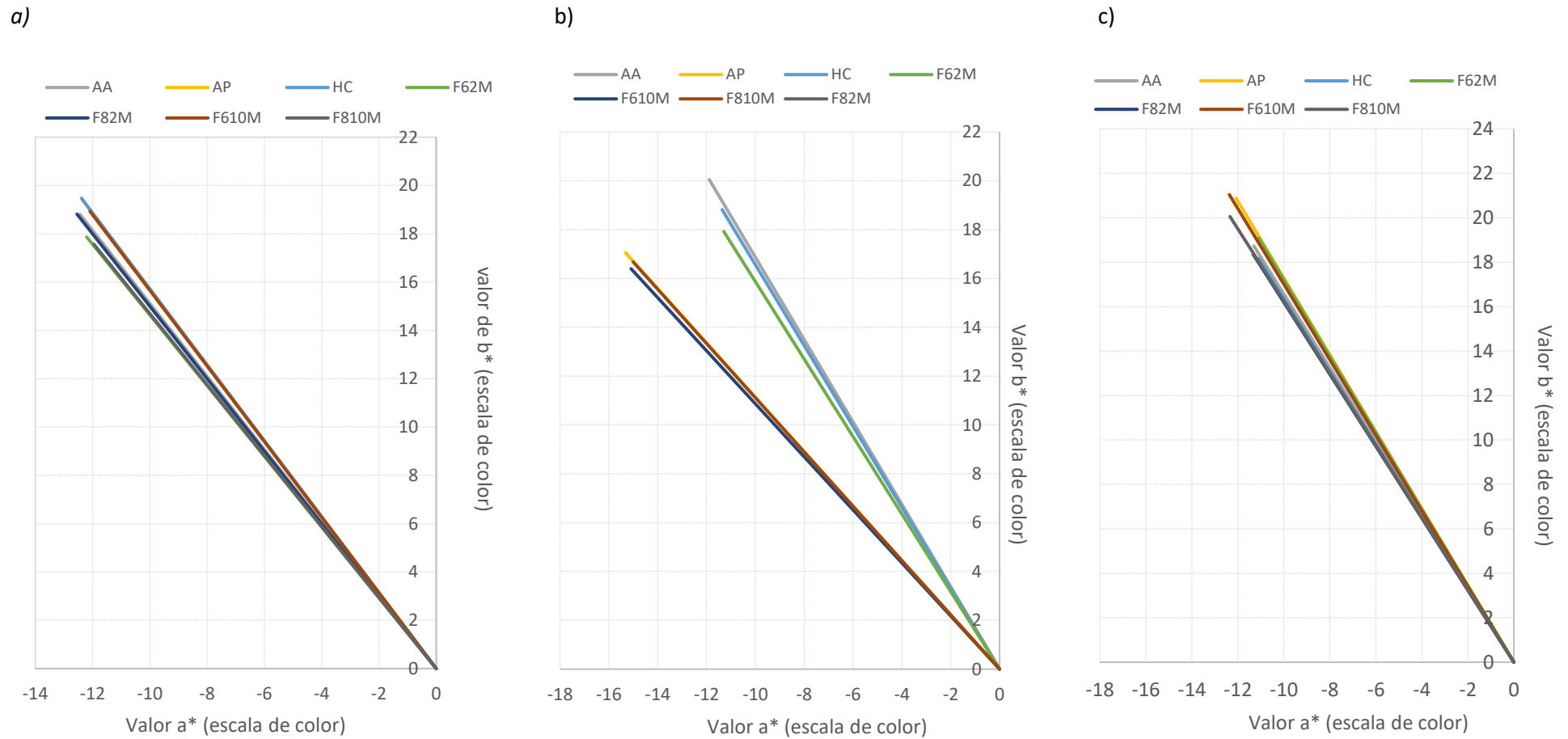
El tratamiento con fagos 10⁶ UFP con 10 minutos de exposición mostró una tendencia similar a la del ácido peracético, con diferencias significativas en los tres momentos evaluados. En el Cuadro 4, se observa que al día 1 el ángulo de matiz aumentó a 132.63 ± 0.71 grados, con una diferencia notable de 9.96 grados respecto al día 0 (Figura 1). No obstante, al día 7 el ángulo disminuyó a 120.44 ± 0.94 °, con una diferencia de 12.9 grados respecto al día 1, indicando una degradación del color hacia tonos más amarillos.

El tratamiento con fagos 10⁸ UFP y 2 minutos de exposición mostró diferencias significativas a través del tiempo. Al día 0, las hojas de lechuga presentaban tonos verdes según la escala CIELAB, pero al día 1 hubo una ligera degradación, mostrando cambios significativos. Al día 7, el cambio fue leve, sin diferencias significativas respecto a los días anteriores.

Por otro lado, El tratamiento con fagos 10⁸ UFP y 10 minutos de contacto no mostró diferencias significativas entre el día 0 y 7, aunque al día 1 hubo un aumento en el ángulo de matiz, pero al final del almacenamiento ya había cambiado hacia tonalidades amarillas (Figura 1).

Figura 1

Comparación de los Parámetros de Color (a^* y b^*) en Lechugas Tratadas con Diferentes Desinfectantes en: a) Hora 0; b) Día 1; c) Día 7



Nota. AA: Ácido ascórbico; AP: Ácido peracético; HC: Hipoclorito de calcio; F62M: Fagos en 10^6 UFP con 2 minutos de contacto; F82M: Fagos en 10^8 UFP con 2 minutos de contacto; F610M: Fagos en 10^6 UFP con 10 minutos de contacto; F810M: Fagos en 10^8 UFP con 10 minutos de contacto.

No se observaron diferencias significativas en el croma a lo largo del tiempo para ningún tratamiento, con excepción de los fagos 10⁸ UFP con 10 minutos de contacto (Cuadro 5). Esto indica que la mayoría de los tratamientos no alteraron el croma de las lechugas, lo que sugiere una buena estabilidad del color. En cambio, el tratamiento con fagos 10⁸ UFP y 10 minutos de exposición presentó diferencias significativas entre el día 0 y el día 7, evidenciando un aumento en el croma, de valores más bajos a más altos. Este comportamiento podría deberse a un efecto prolongado del tratamiento sobre la intensidad del color, lo que sugiere una mayor saturación en las hojas tratadas a lo largo del tiempo.

Cuadro 5

Valor de Croma a través del tiempo

Tratamiento	Tiempo de contacto	Croma ± D.E. al día 0	Croma ± D.E. al día 1	Croma ± D.E. al día 7
Control positivo**	N/A	23.38 ± 0.82	22.94 ± 1.13	23.53 ± 0.78
Control negativo**	N/A	22.14 ± 0.84	22.81 ± 0.08	22.74 ± 1.49
Ácido ascórbico (100ppm)	2	22.55 ± 1.18 ^x	23.31 ± 1.36 ^x	21.89 ± 2.11 ^x
Ácido peracético (60ppm)	2	23.08 ± 0.34 ^x	22.95 ± 0.74 ^x	24.12 ± 0.86 ^x
Hipoclorito de calcio (100ppm)	2	22.41 ± 1.31 ^x	22.00 ± 0.97 ^x	21.34 ± 1.01 ^x
Fagos 10 ⁶ UFP	2	21.64 ± 0.46 ^x	21.19 ± 4.81 ^x	22.08 ± 2.63 ^x
Fagos 10 ⁶ UFP	10	22.47 ± 2.49 ^x	22.29 ± 1.04 ^x	24.41 ± 0.86 ^x
Fagos 10 ⁸ UFP	2	22.62 ± 1.79 ^x	23.25 ± 1.37 ^x	21.58 ± 2.72 ^x
Fagos 10 ⁸ UFP	10	21.26 ± 0.41 ^y	22.44 ± 1.02 ^{xy}	23.55 ± 1.04 ^x
CV%		5.64	8.31	7.32

Nota. N/A: No aplica; D.E.: Desviación Estándar; C.V.: Coeficiente de Variación (%); x-y letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre momento en el tiempo (P < 0.05). **: No fue tomado en cuenta para la separación de medias; No hubo diferencias significativas entre tratamientos (P < 0.05).

Textura

La dureza de la lechuga a los días 0, 1 y 7 de almacenamiento en refrigeración se observa en el Cuadro 6. Al día 0 no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, lo que indica que, al inicio del experimento, todos los tratamientos mantuvieron la misma calidad de textura en las hojas de lechuga. Al día 1, tampoco hubo diferencias significativas en comparación con el ácido ascórbico (control), sugiriendo que, en las primeras 24 horas, los tratamientos no generaron cambios importantes en la dureza del producto. Sin embargo, los tratamientos que mostraron mayor dureza fueron los de hipoclorito de calcio, fagos 10⁶ con 10 minutos de contacto, y fagos 10⁸ con 2 y 10

minutos de contacto. Según (Santos Janampa y Tlentino Fabián, 2015), cuando el hipoclorito de calcio entra en contacto con el agua, se produce una reacción que genera moléculas de ion hipocloroso, las cuales actúan como desinfectantes, mientras que el calcio mejora la textura del producto.

Al día 7, si bien no se observaron diferencias significativas respecto al control con ácido ascórbico, los tratamientos con hipoclorito de calcio, fagos 10^6 y fagos 10^8 con 2 minutos de contacto mantuvieron una mayor dureza en comparación con otros tratamientos. El tratamiento con fagos 10^8 con 10 minutos de contacto fue particularmente efectivo, mostrando diferencias significativas en comparación con los tratamientos con ácido peracético y fagos 10^6 con 10 minutos de contacto, siendo el tratamiento que mejor conservó la dureza tras 7 días de almacenamiento. Este resultado sugiere que tanto la concentración como el tiempo de exposición de los fagos pueden jugar un papel clave en la conservación de la textura. La variabilidad observada entre los tratamientos podría estar relacionada con las características intrínsecas de las hojas de lechuga analizadas.

Según (Toivonen y Brummell, 2008) , la dureza está determinada por factores como la anatomía del tejido vegetal, incluyendo el tamaño y la forma de las células, el grosor y la resistencia de las paredes celulares, así como la adhesión entre las células. Es posible que pequeñas variaciones en la estructura interna de las hojas de lechuga hayan influido en los resultados observados, lo que también podría explicar las diferencias en la respuesta a los tratamientos. Además, la presencia de factores externos como las condiciones de almacenamiento y la humedad también podría haber contribuido a la variabilidad en los resultados. Este análisis sugiere que, aunque el hipoclorito de calcio y los fagos pueden ser efectivos en mantener la textura de la lechuga durante el almacenamiento, la efectividad de cada tratamiento depende de la combinación de factores como la concentración, el tiempo de contacto y las características propias del producto.

Cuadro 6

Dureza de la lechuga a los días 0, 1 y 7 de almacenamiento en refrigeración.

Tratamiento	Tiempo de contacto	Dureza (N) \pm D.E. al día 0	Dureza (N) \pm D.E. al día 1	Dureza (N) \pm D.E. al día 7
Ácido ascórbico (100ppm)	2	18.91 \pm 2.55 ^{a x}	20.93 \pm 6.95 ^{a x}	21.13 \pm 2.71 ^{ab x}
Ácido peracético (60ppm)	2	15.28 \pm 1.15 ^{a x}	15.59 \pm 1.44 ^{a x}	17.09 \pm 3.69 ^{b x}
Hipoclorito de calcio (100ppm)	2	20.66 \pm 2.53 ^{a x}	20.25 \pm 5.74 ^{a x}	19.82 \pm 6.09 ^{ab x}
Fagos 10 ⁶ UFP	2	20.29 \pm 3.92 ^{a x}	16.43 \pm 4.58 ^{a x}	18.24 \pm 1.88 ^{ab x}
Fagos 10 ⁶ UFP	10	19.62 \pm 2.99 ^{a x}	19.70 \pm 3.00 ^{a x}	17.42 \pm 1.85 ^{b y}
Fagos 10 ⁸ UFP	2	19.50 \pm 3.68 ^{a x}	21.87 \pm 2.31 ^{a x}	18.74 \pm 2.24 ^{ab x}
Fagos 10 ⁸ UFP	10	20.89 \pm 3.82 ^{a x}	23.19 \pm 5.18 ^{a x}	23.71 \pm 3.56 ^{a x}
CV%		15.01	22.04	15.59

Nota. N: Newtons; D.E.: Desviación Estándar; C.V.: Coeficiente de Variación (%); a-c letras diferentes en la misma columna indican

diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$); x-y letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre

momento en el tiempo ($P < 0.05$).

Conclusiones

Se logró aislar bacteriófagos líticos efectivos a partir de aguas residuales de la laguna de oxidación de la Universidad Zamorano. Estos fagos demostraron capacidad lítica contra *E. coli*, validando su potencial como agentes antimicrobianos en la desinfección de lechugas romanas.

Aplicar tratamientos con bacteriófagos durante 10 minutos, tanto a concentraciones de 10^6 UFP como de 10^8 UFP, permitió obtener una reducción significativa en la carga microbiana de *E. coli*, comparable a la efectividad de desinfectantes químicos como el hipoclorito de calcio (100 ppm) y el ácido peracético (60 ppm). Sin embargo, aplicar tratamientos con fagos durante 2 minutos no mostró una reducción significativa, lo que sugiere que el tiempo de exposición es crucial para su efectividad.

Aplicar fagos durante 10 minutos permitió preservar la calidad visual de la lechuga en términos de color (valores L^* , a^* , y b^*) y textura (dureza), de manera similar a los tratamientos con desinfectantes químicos. No se observaron diferencias significativas que comprometieran la calidad sensorial de la lechuga tratada con fagos, lo que sugiere que su uso no solo es efectivo en la reducción de la carga microbiana, sino también en la preservación de la calidad del producto.

Recomendaciones

Extender la investigación a otros productos frescos que también son susceptibles a la contaminación por *E. coli*, como hortalizas y frutas, para evaluar la versatilidad de los bacteriófagos en diferentes matrices alimentarias.

Seleccionar lechugas de tamaño, peso y madurez similares para minimizar la variabilidad entre muestras. Es recomendable trabajar con lotes de lechuga que hayan sido cultivados en condiciones controladas y uniformes, para asegurar que las diferencias en la calidad del producto no afecten los resultados del experimento.

Realizar cocteles de bacteriófagos combinando cepas líticas específicas para diferentes patógenos, con el objetivo de aumentar su espectro de contacto y mejorar la eficacia en el biocontrol en productos frescos.

Referencias

- Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M. Y., Dean, T., Senecal, A. y Sulakvelidze, A. (2008). Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(20), 6230–6238. <https://doi.org/10.1128/AEM.01465-08>
- Aguayo, E., Gomez, P. y Artés-Hernández, F., Artés, F. (2017). Tratamientos químicos desinfectantes de hortalizas de IV gama: ozono, agua electrolizada y ácido peracético. *Agrociencia Uruguay*, 21(1), 4–14. <http://www.scielo.edu.uy/pdf/agro/v21n1/2301-1548-agro-21-01-00007.pdf>
- Bester, C. (2015). *Investigating the efficacy of sodium hypochlorite, calcium hypochlorite and peracetic acid on environmental Escherichia coli strains: Investigating the efficacy of sodium hypochlorite, calcium hypochlorite and peracetic acid on environmental Escherichia coli strains* [Tesis, Stellenbosch : Stellenbosch University, USA]. scholar.sun.ac.za. <https://scholar.sun.ac.za/items/76e557be-25c9-4a0c-8a89-deeaf7a7bb0f>
- Bitton, G. (2010). *Wastewater Microbiology*. Wiley. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470901243> <https://doi.org/10.1002/9780470901243>
- Capozzi, V., Fiocco, D., Amodio, M. L., Gallone, A. y Spano, G. (2009). Bacterial stressors in minimally processed food. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(7), 3076–3105. <https://doi.org/10.3390/ijms10073076>
- Castro-Ibáñez, I., Gil, M. I. y Allende, A. (2017). Ready-to-eat vegetables: Current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain. *ScienceDirect*, 85, 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.073>
- Dennehy, J. J. y Abedon, S. T. (2021). Phage Infection and Lysis. *Springer*, 341–383. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41986-2_53
- Diomedi, A., Chacón, E., Delpiano, L., Hervé, B., Jemenao, M. I., Medel, M., Quintanilla, M., Riedel, G., Tinoco, J. y Cifuentes, M. (2017). Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología [Antiseptics and disinfectants: aiming at rational use. Recommendations of the Advisory Committee on Healthcare Associated Infections. Sociedad Chilena de Infectología]. *Revista chilena de infectología : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 34(2), 156–174. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000200010>
- Domínguez Navarrete, N. (2020). Bacteriófagos. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 20(1), 164–165. <https://doi.org/10.25176/RFMH.v20i1.2554>
- Gabriel Gaviria A, María González de S y Jhon Castaño O (2012). Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para E.coli DH5a a partir de aguas residuales. *Revista MVZ Córdoba*, 17(1), 2852–2860. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69323749007>
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S. y Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology : [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 47 Suppl 1(Suppl 1), 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Gouvêa, D. M., Mendonça, R. C. S., Lopez, M. E. S. y Batalha, L. S. (2016). Absorbent food pads containing bacteriophages for potential antimicrobial use in refrigerated food products. *LWT - Food Science and Technology*, 67, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.043>
- Jiménez García, A. (2016). *Supervivencia y parámetros cinéticos de Escherichia coli en zumos de frutas naturales* [Tesis, Universidad de Valladolid, España]. uvadoc.uva.es. <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/18307>

- Marketing Resource Center. (2021). *Lettuce*. <https://www.agmrc.org/commodities-products/vegetables/lettuce>
- Mendoza, I. C., Luna, E. O., Pozo, M. D., Vásquez, M. V., Montoya, D. C., Moran, G. C., Romero, L. G., Yépez, X., Salazar, R., Romero-Peña, M. y León, J. C. (2022). Conventional and non-conventional disinfection methods to prevent microbial contamination in minimally processed fruits and vegetables. *LWT*, 165, 113714. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113714>
- Mendoza V., M. y Cantor B., F. R. (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.): 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.)* [Tesis, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras]. bdigital.zamorano.edu. <https://bdigital.zamorano.edu/items/487dd43c-2e09-4536-a42c-761fab20119b>
- Mousavi, S., Bereswill, S. y Heimesaat, M. M. (2019). Immunomodulatory and Antimicrobial Effects of Vitamin C. *European Journal of Microbiology & Immunology*, 9(3), 73–79. <https://doi.org/10.1556/1886.2019.00016>
- Moye, Z. D., Woolston, J. y Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. *Viruses*, 10(4), 205. <https://doi.org/10.3390/v10040205>
- National Agricultural Statistics Service USDA. Vegetables 2019 Summary 02/13/2020. https://www.nass.usda.gov/Publications/Todays_Reports/reports/vegean20.pdf
- National Agricultural Statistics Service USDA. Vegetables 2019 Summary 02/13/2020. https://www.nass.usda.gov/Publications/Todays_Reports/reports/vegean20.pdf
- Petri, E., Rodríguez, M. y García, S. (2015). Evaluation of Combined Disinfection Methods for Reducing Escherichia coli O157:H7 Population on Fresh-Cut Vegetables. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(8), 8678–8690. <https://doi.org/10.3390/ijerph120808678>
- Rivas, A. y Pérez, E. (2022). *PerezRivas - El test de desafío challenge test como herramienta para evaluar la seguridad microbi...* <https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/184306/PerezRivas%20-%20El%20test%20de%20desafio%20challenge%20test%20como%20herramienta%20para%20evaluar%20la%20seguridad%20microbi...pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rodríguez Q, M., Zapata S, M. E., Solano M, M. A., Lozano B, D., Torrico, F. y Torrico R, M. C. (2015). Evaluación de la contaminación microbiológica de la lechuga (lactuca sativa) en la cadena alimentaria, provincia de Quillacollo, Cochabamba, Bolivia 2015. *Gac. méd. boliv*, 38(2), 31–36. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-785610>
- Santos Janampa, G. y Tlentino Fabián, R. K. (2015). *Efectos de la concentración de hipoclorito de calcio, tiempo de inmersión y empaque, en la conservación de la lechuga iceberg (Lactuca sativa L.) almacenada en refrigeración* [Universidad Nacional Hermilio Valdizán, Perú]. repositorio.unheval.edu.pe. <https://repositorio.unheval.edu.pe/handle/20.500.13080/1245>
- Segundo A., Nallelyt, Hernández B., Efrén, López V., Oliver, Torres A. y Oscar (2010). Redalyc. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana De Ciencias Farmacéuticas*. <https://www.redalyc.org/pdf/579/57916078003.pdf>
- Sieiro, C., Areal-Hermida, L., Pichardo-Gallardo, Á., Almuiña-González, R., Miguel, T. de, Sánchez, S., Sánchez-Pérez, Á. y Villa, T. G. (2020). A Hundred Years of Bacteriophages: Can Phages Replace Antibiotics in Agriculture and Aquaculture? *Antibiotics*, 9(8), 493. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080493>

- Toivonen, P. M. y Brummell, D. A. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.004>
- Toledo Toledo, G. L. (2009). *Efecto de antiparadeantes sobre cuatro tipos de lechuga (Lactuca sativa L.) sometidas a mínimo proceso* [Thesis, Universidad de Chile, Chile]. repositorio.uchile.cl. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/111136>
- van Haute, S., Sampers, I., Holvoet, K. y Uyttendaele, M. (2013). Physicochemical quality and chemical safety of chlorine as a reconditioning agent and wash water disinfectant for fresh-cut lettuce washing. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9), 2850–2861. <https://doi.org/10.1128/AEM.03283-12>
- Vikram, A., Tokman, J. I., Woolston, J. y Sulakvelidze, A. (2020). Phage Biocontrol Improves Food Safety by Significantly Reducing the Level and Prevalence of Escherichia coli O157:H7 in Various Foods. *Journal of Food Protection*, 83(4), 668–676. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-433>
- Wójcicki, M., Błażej, S., Gientka, I. y Brzezicka, K. (2019). The concept of using bacteriophages to improve the microbiological quality of minimally processed foods [pdf]. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 18(4), 373–383. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2019.0695>

Anexos

Anexo A

Valor de L a través del tiempo

Tratamiento	Tiempo de contacto	Valor L ± D.E. al día 0	Valor L ± D.E. al día 1	Valor L ± D.E. al día 7
Control positivo	N/A	21.50 ± 1.95 ^y	26.67 ± 3.15 ^x	25.88 ± 1.70 ^x
Control negativo	N/A	26.71 ± 3.12 ^x	24.70 ± 4.80 ^x	27.88 ± 0.43 ^x
Ácido ascórbico (100ppm)	2	21.20 ± 0.04 ^x	28.30 ± 6.41 ^x	21.25 ± 2.61 ^x
Ácido peracético (60ppm)	2	23.91 ± 1.72 ^y	24.16 ± 1.29 ^y	27.40 ± 1.00 ^x
Hipoclorito de calcio (100ppm)	2	20.25 ± 3.12 ^y	24.92 ± 3.29 ^x	24.29 ± 5.31 ^{xy}
Fagos 10 ⁶ UFP	2	20.18 ± 4.52 ^y	26.24 ± 3.87 ^x	25.79 ± 4.42 ^x
Fagos 10 ⁶ UFP	10	25.99 ± 1.99 ^y	22.94 ± 1.24 ^z	29.24 ± 1.75 ^x
Fagos 10 ⁸ UFP	2	20.32 ± 2.24 ^x	28.72 ± 4.04 ^x	25.00 ± 4.24 ^x
Fagos 10 ⁸ UFP	10	24.70 ± 0.55 ^y	21.77 ± 2.10 ^y	29.21 ± 0.49 ^x
CV%		10.98	15.38	11.97

Anexo B

Valor de a^* a través del tiempo

Tratamiento	Tiempo de contacto	Valor $a \pm$ D.E. al día 0	Valor $a \pm$ D.E. al día 1	Valor $a \pm$ D.E. al día 7
Control positivo	N/A	-11.08 ± 1.38^x	-11.28 ± 1.24^x	-11.59 ± 0.16^x
Control negativo	N/A	-10.53 ± 0.48^x	-13.29 ± 0.44^z	-11.40 ± 0.32^y
Ácido ascórbico (100ppm)	2	-11.23 ± 0.77^y	-11.01 ± 0.43^{xy}	-10.22 ± 0.33^x
Ácido peracético (60ppm)	2	-11.11 ± 0.37^x	-13.88 ± 0.80^y	-10.90 ± 0.52^x
Hipoclorito de calcio (100ppm)	2	-10.43 ± 1.29^x	-11.05 ± 0.85^x	-11.25 ± 1.49^x
Fagos 10^6 UFP	2	-10.82 ± 0.91^x	-11.19 ± 1.19^x	-10.58 ± 0.79^x
Fagos 10^6 UFP	10	-10.37 ± 1.37^x	-12.79 ± 0.61^y	-11.42 ± 0.30^{xy}
Fagos 10^8 UFP	2	-10.56 ± 0.29^x	-10.59 ± 0.40^x	-10.76 ± 1.72^x
Fagos 10^8 UFP	10	-10.14 ± 0.26^x	-12.73 ± 0.63^y	-12.11 ± 0.53^y
CV%		1.93	1.71	1.62

Nota. N/A: No aplica; D.E.: Desviación Estándar; C.V.: Coeficiente de Variación (%); x-z letras diferentes en la misma fila indican diferencias

significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

Anexo C

Valor de b* a través del tiempo

Tratamiento	Tiempo de contacto	Valor b ± D.E. al día 0	Valor b ± D.E. al día 1	Valor b ± D.E. al día 7
Control positivo	N/A	11.96 ± 0.94 ^y	13.83 ± 2.02 ^x	14.83 ± 0.68 ^x
Control negativo	N/A	12.94 ± 1.14 ^y	12.51 ± 0.92 ^y	14.89 ± 0.13 ^x
Ácido ascórbico (100ppm)	2	11.52 ± 0.30 ^y	14.91 ± 1.25 ^x	12.12 ± 1.06 ^y
Ácido peracético (60ppm)	2	13.58 ± 0.45 ^y	12.86 ± 0.67 ^y	14.89 ± 0.42 ^x
Hipoclorito de calcio (100ppm)	2	11.31 ± 1.66 ^y	13.92 ± 1.95 ^x	13.43 ± 2.03 ^{xy}
Fagos 10 ⁶ UFP	2	11.16 ± 2.46 ^y	14.45 ± 2.29 ^x	14.14 ± 1.98 ^x
Fagos 10 ⁶ UFP	10	12.42 ± 2.12 ^y	11.14 ± 1.14 ^y	14.99 ± 0.70 ^x
Fagos 10 ⁸ UFP	2	11.46 ± 1.51 ^x	14.65 ± 0.99 ^x	13.80 ± 1.79 ^x
Fagos 10 ⁸ UFP	10	11.85 ± 0.31 ^y	11.07 ± 0.90 ^y	15.79 ± 0.29 ^x
CV%		11.13	11.03	9.04

Nota. N/A: No aplica; D.E.: Desviación Estándar; C.V.: Coeficiente de Variación (%); x-y letras diferentes en la misma fila indican diferencias

significativas entre tratamientos (P < 0.05).