

# Evaluación de un producto a base de ácidos orgánicos frente a *E. coli* y *Salmonella spp.*, en la desinfección de lechuga fresca\*

Gómez Álvarez, L. M. \*\*, Jaimes Suárez, S. \*\*\*, Montes Álvarez J. \*\*\*\*

## Resumen

**Introducción.** Las frutas y hortalizas frescas constituyen un componente esencial de la dieta de muchas personas a nivel mundial y día a día su consumo viene en aumento, obedeciendo a varios factores como la tendencia hacia una alimentación más sana. Los ácidos orgánicos se presentan como una alternativa para sustituir al cloro en la desinfección de estos productos, por su buen desempeño antimicrobiano y su condición de producto GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguro). **Objetivo.** Determinar la reducción de *E. coli* y *Salmonella spp.* en lechuga Batavia (*Lactuca sativa*), utilizando un producto a base de ácidos orgánicos. **Materiales y Métodos.** Se inocularon muestras de lechuga con concentraciones conocidas de *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *E. coli* ATCC 8739 y ATCC 25922, estas fueron expuestas a soluciones del producto (ácido orgánico) a 1000, 1200 y 2000 ppm a 3 tiempos de exposición. Posteriormente fueron neutralizadas con una solución de caldo Lethen y analizadas mediante recuento en placa. Se tomaron muestras contaminadas de lechuga sin desinfectar como controles positivos. La eficacia de la desinfección se evaluó mediante el análisis de la reducción logarítmica de la población microbiana durante el tiempo de exposición al desinfectante en diferentes concentraciones del principio activo. **Resultados.** Se evidenciaron reducciones superiores al 99% en las muestras de lechuga inoculadas con *E. coli* y cerca del 90% en las muestras contaminadas con *Salmonella spp.* En las lechugas inoculadas con *E. coli*, la reducción de la población alcanzó los  $2.09 \pm 0.14$  Log UFC/g,

mientras que con *Salmonella spp.* la reducción fue de  $0.98 \pm 0.19$  Log UFC/g. El estudio reveló que el tratamiento con mayor actividad antimicrobiana frente a poblaciones altas (105 UFC/g) de los patógenos inoculados, se obtuvo con una concentración de 2000 ppm y un tiempo de contacto de 5 minutos. **Conclusión.** Los ensayos *in vitro* y de inoculación demostraron mayor sensibilidad de *E. coli* con respecto a *Salmonella spp.* frente al tratamiento de desinfección. El desinfectante a base de ácidos orgánicos constituye una alternativa efectiva y segura como tratamiento para reducir microorganismos patógenos en vegetales, disminuyendo el riesgo microbiológico asociado a este tipo de productos, que generalmente se consumen crudos.

**Palabras clave:** ácidos orgánicos, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, desinfección, lechuga.

## Evaluation of a product based on organic acids before *E. coli* and *Salmonella spp.*, in the disinfection of fresh lettuce

### Abstract

**Introduction.** Fresh fruits and vegetables are an essential component of many people's diet worldwide and their consumption is increasing, due to several factors such as the tendency towards healthier food consumption. Organic acids appear as an alternative to replace chloride in the disinfection of these products, given their good antimicrobial performance and their condition as GRAS (Generally Recognized as Safe). **Objective.** Determining the *E. coli*

\* Artículo producto de la investigación financiada por El Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria y TECNAS S. A., como trabajo de grado de Maestría en Gerencia de Programas Sanitarios en Inocuidad de Alimentos.

\*\* Microbióloga con énfasis en Alimentos, Asistente Técnico del Laboratorio Microbiológico en Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria – INTAL

\*\*\* Magíster en Gerencia de Programas Sanitarios en Inocuidad de Alimentos, asesor técnico División Limpieza, Desinfección e Inocuidad en TECNAS S.A.

\*\*\*\* Microbiólogo con énfasis en Alimentos, director de Proyectos en Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria – INTAL

Correspondencia: microbiología@fundacionintal.org

Artículo recibido: 25/05/2012; Artículo aprobado: 15/11/2012

and *Salmonella spp*'s reduction in Batavia lettuce (*Lactuca sativa*), by the use of a product based on organic acids. **Materials and methods.** Lettuce samples were inoculated with known concentrations of *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 and *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *E. coli* ATCC 8739 y ATCC 25922, which were put before solutions of the product (organic acid) at 1000, 1200 and 2000 ppm during three exposition periods. They were later neutralized with a Lethen broth solution and analyzed by means of on plate accounts. Contaminated samples of not disinfected lettuce were taken as positive controls. The effectiveness of the disinfection was evaluated by analyzing the logarithmic reduction of the microbial population during the time of exposition to the disinfectant, in different concentrations of the active principle. **Results.** Reductions above 99% were obtained for the lettuce samples inoculated with *E. coli* *Salmonella spp*. In the lettuces inoculated with *E. coli*, the reduction of the population reached  $2.09 \pm 0.14$  Log UFC/g, while the reduction of *Salmonella spp* was  $0.98 \pm 0.19$  Log UFC/g. The study revealed that the most effective treatment under antimicrobial terms before high populations (105 UFC/g) of the pathogens inoculated was that with a 2000 ppm concentration and a 5 minutes contact time. **Conclusion.** The *in vitro* and the inoculation tests demonstrated that *E. coli* is more sensitive to the disinfection treatment than *Salmonella spp*. The disinfectant based on organic acids is an effective and safe alternative to reduce pathogen microorganisms in vegetables, reducing the microbiological hazard associated to such products, which are usually eaten raw.

**Key words:** Organic acids, *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, disinfection, lettuce.

### Avaliação de um produto a base de ácidos orgânicos frente a e. coli e salmonela spp, na desinfecção de alface fresca

#### Resumo

**Introdução.** As frutas e hortaliças frescas constituem um componente essencial da dieta de muitas

pessoas a nível mundial e dia a dia seu consumo vem em aumento, obedecendo a vários fatores como a tendência para uma alimentação mais sã. Os ácidos orgânicos se apresentam como uma alternativa para substituir ao cloro na desinfecção destes produtos, por seu bom desempenho antimicrobiano e sua condição de produto GRAS (Geralmente Reconhecido Como Seguro). **Objetivo.** Determinar a redução de *E. coli* e *Salmonella spp* em alface Batavia (*Lactuca sativa*), utilizando um produto a base de ácidos orgânicos. **Materiais e Métodos.** Se inocularam mostras de alface com concentrações conhecidas de *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *E. coli* ATCC 8739 e ATCC 25922, estas foram enfrentadas em soluções do produto (ácido orgânico) a 1000, 1200 e 2000 ppm a 3 tempos de exposição. Posteriormente foram neutralizadas com uma solução de caldo Lethen e analisadas mediante recontagem em placa. Tomaram-se mostras contaminadas de alface sem desinfetar como controles positivos. A eficácia da desinfecção se avaliou mediante a análise da redução logarítmica da população microbiana durante o tempo de exposição ao desinfetante em diferentes concentrações do princípio ativo. **Resultados.** Se evidenciaram reduções superiores ao 99% nas mostras de alface inoculadas com *E. coli* e cerca do 90% nas mostras contaminadas com *Salmonella spp*. Nas alfaces inoculadas com *E. coli*, a redução da população atingiu os  $2.09 \pm 0.14$  Log UFC/g, enquanto com *Salmonella spp* a redução foi de  $0.98 \pm 0.19$  Log UFC/g. O estudo revelou que o tratamento com maior atividade antimicrobiana frente a populações altas (105 UFC/g) dos patogênicos inoculados, obteve-se com uma concentração de 2000 ppm e um tempo de contato de 5 minutos. **Conclusão.** Os ensaios *in vitro* e de inoculação demonstraram maior sensibilidade de *E. coli* com respeito a *Salmonella spp* frente ao tratamento de desinfecção. O desinfetante a base de ácidos orgânicos constitui uma alternativa efetiva e segura como tratamento para reduzir microorganismos patogênicos em vegetais, diminuindo o risco microbiológico sócio a este tipo de produtos, que geralmente se consomem crus.

**Palavras importantes:** ácidos orgânicos, *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, desinfecção, alface.

## Introduccion

El consumo de frutas y vegetales frescos ha mostrado un aumento en el mundo, y con este se ha incrementado el número de brotes de enfermedades asociadas a este tipo de pro-

ductos. Diversos microorganismos patógenos son frecuentemente vinculados con vegetales crudos, los cuales en su mayoría provienen del tracto intestinal de animales de sangre caliente, incluido el hombre. Se destacan *Salmonella spp*, *E. coli*, entre otros<sup>1,2</sup>.

La inocuidad alimentaria ligada al consumo de productos agrícolas frescos trae consigo una preocupación, dado que normalmente se consumen crudos, y no son sometidos a un tratamiento letal como la cocción que elimine los microorganismos presentes. En este sentido, se han dirigido esfuerzos tendentes a generar medidas que contribuyan a minimizar el riesgo de enfermedades asociadas a los productos ya mencionados. Las medidas más efectivas se enfocan a trabajar desde la prevención, empezando por el campo con las Buenas Prácticas Agrícolas, avanzando en los diferentes eslabones de la cadena, que involucran etapas de procesamiento y transformación industrial, transporte y distribución, hasta llegar al consumidor final; allí cobran importancia las Buenas Práctica de Manufactura<sup>3</sup>.

No obstante, la prevención no es suficiente; es necesario establecer mecanismos adicionales que corresponden a la descontaminación de los vegetales y para tal fin se dispone de métodos variados que incluyen la aplicación de productos químicos, la utilización de técnicas como la irradiación, la ozonización, tratamiento con luz UV-C<sup>4</sup>, y más recientemente con agua electrolizada<sup>5</sup>. En el tratamiento con agentes químicos, existen diversas alternativas, que varían de acuerdo con los principios activos y su mecanismo de acción en la eliminación de microorganismos.

A escala mundial, el cloro es el desinfectante más utilizado para la desinfección de frutas y vegetales crudos, así como para otros usos en la industria de los alimentos. Constituye una alternativa económica, de fácil alcance y medianamente efectiva. La actividad inhibitoria o letal del cloro está influenciada por ciertos parámetros, por lo que es clave brindar las condiciones adecuadas para su desempeño; uno de ellos es la temperatura y el más crítico el pH de la solución, el cual determina su eficacia en gran medida<sup>6</sup>.

En Colombia, así como en otros países, el uso del cloro no está regulado. Es muy utilizado para la desinfección de frutas y vegetales en restaurantes, servicios de alimentación, plantas de procesos de transformación e incluso en el hogar. Es inaceptable encontrar que en ocasiones, usuarios del cloro motivados más por su afán de lograr en sus productos resultados microbiológicamente admisibles por las

autoridades sanitarias, que por el concepto de inocuidad, sobredosifican el químico al punto de convertirlos en productos reprobables por parte del consumidor. Este hecho es más frecuentemente observado en vegetales en mezcla para ensaladas<sup>7</sup>.

Los ácidos orgánicos prometen ser una alternativa viable en el intento de reducir el amplio uso del cloro en la desinfección de frutas y vegetales crudos, dado el reconocimiento de su buen desempeño como antimicrobianos<sup>2</sup>. Adicionalmente, no implican un riesgo mayor en el manejo, como tampoco para el consumidor. Ante la preocupación que deriva del riesgo microbiológico en vegetales frescos, específicamente lechugas y ensaladas que la contienen, por su frecuente vinculación con patógenos como *Salmonella* spp y *E.coli*, este proyecto se enfocó en evaluar un producto a base de ácidos orgánicos (Citrosan®), como alternativa de desinfectante para frutas y vegetales frescos<sup>4</sup>. Diversos tipos de ácidos orgánicos están contenidos naturalmente en muchas frutas y vegetales; algunos de ellos son los ácidos láctico, acético, succínico, tartárico, benzoico y sórbico. Su actividad antimicrobiana está directamente ligada al pH por cuanto la mayoría de los microorganismos no resisten valores inferiores a 4.0<sup>2, 8</sup>. El producto evaluado contiene varios de estos ácidos orgánicos como son el ácido láctico, el cítrico y el sórbico, entre otros, que, en combinación con extractos de semillas de cítricos, produce un efecto sinérgico antimicrobiano<sup>9, 10</sup>.

El objetivo principal de este estudio fue determinar la reducción de *E.coli* y *Salmonella* spp sobre lechuga fresca utilizando un producto desinfectante a base de ácidos orgánicos (Citrosan®), evaluar diferentes concentraciones de uso y determinar el tiempo de contacto para la desinfección de lechuga fresca con este producto a base de ácidos orgánicos (Citrosan®).

## Materiales y métodos

El método de investigación aplicado en este estudio corresponde a un método experimental, sustentado en fuentes secundarias de información (la fuente de datos corresponde a una investigación mixta) y se desarrolló a través de

un análisis en el que se evaluó un desinfectante a base de ácidos orgánicos en lechuga fresca, atendiendo a un protocolo que incluye diferentes etapas: caracterización, pruebas in vitro e inoculación.

### **Cepas bacterianas**

Como inóculo se utilizó una combinación de suspensiones de dos cepas de *E. coli* (ATCC 8739 y ATCC 25922) y una combinación de suspensiones de dos cepas de *Salmonella spp* (*Salmonella enteritidis* ATCC 13076 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028).

### **Lechugas**

Se utilizaron hojas de lechuga Batavia (*Lactuca sativa*), adquiridas en un punto de abasto

local, provenientes de un mismo cultivo y recolectadas el día anterior.

### **Etapas I. Caracterización**

En esta etapa se realizaron tres repeticiones por triplicado en días diferentes (total de muestras 9). Se realizó determinación de *E. coli* e investigación de *Salmonella spp* en lechugas frescas. La determinación de *E. coli* y *Salmonella spp* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Holguín y colaboradores<sup>11</sup>.

### **Preparación de las lechugas**

Las lechugas a analizar se despojaron de sus dos o tres hojas externas y las hojas restantes se lavaron con agua potable durante 1 minuto. Las hojas lavadas se cortaron en trozos de 5x5 cm con bisturí estéril (figura 1).



**Figura 1. Corte de trozos de lechugas con plantilla estéril**

Se pesaron 11 gramos de trozos de hojas de lechuga, se llevaron a 99 mL de agua peptona tamponada (APT) 0.1% para determinación de *E. coli* por técnica de Número Más Probable, utilizando Caldo Lauril Sulfato más MUG. La detección de *E. coli* en esta técnica se confirmó mediante prueba de indol por adición de reactivo de Kovac's. Paralelamente se realizó el recuento en placa de *E. Coli* utilizando agar cromogénico para coliformes (Agar Chromocult, marca Merck).

Para el aislamiento de *Salmonella spp* se pesaron 25 gramos de trozos de hojas de lechuga,

se llevaron a 225 mL de agua peptona tamponada (APT) como medio de enriquecimiento no selectivo con incubación a 37 °C /24 horas. El enriquecimiento selectivo se realizó en caldo Selenito-Cistina y caldo Rappaport y se incubó a 37 °C /24. La etapa de crecimiento en medios selectivos se realizó sobre placas de agar SS (*Salmonella Shigella*) incubadas a 37 °C /24 horas.

La confirmación de *Salmonella spp* se realizó mediante tres agares inclinados: fermentación de azúcares en agar TSI, lisina utilizando el agar LIA y prueba de Citrato, todos marca Sharlau; incubados a 37 °C /24 horas.



## Etapa II. Prueba in vitro

### Preparación del inóculo

Las cepas de *E. coli* y *Salmonella* se cultivaron en 10 mL de caldo tripticasa de soya; se incubaron a 37 °C durante 24 horas; posteriormente se realizó transferencia con asa a tres intervalos sucesivos de 24 horas en el mismo caldo. Transcurrido el tiempo, las células de cada cepa se centrifugaron a 3500 rpm, 15 minutos, 20 °C (Centrifuga Hettich Referencia Rotofix 32 A), y el pellet resultante se resuspendió en 5 mL de buffer fosfato estéril pH 7.2.

Se combinaron volúmenes iguales de la suspensión de células de cada cepa de *E. coli* y de *Salmonella spp*, con el fin de alcanzar poblaciones aproximadamente iguales de cada una. Los inóculos que se obtuvieron de los dos patógenos, se mantuvieron a 22 ± 2°C y se aplicaron dentro de las dos horas posteriores a su preparación.

Se realizaron diluciones seriadas hasta 10<sup>-8</sup> en agua peptona estéril (APE) al 0.1% de las suspensiones de cada patógeno individualmente, así como de los patógenos en combinación (*E. coli* separado de *Salmonella spp*). Posteriormente, para confirmar las poblaciones de cada uno de los patógenos se realizó siembra por duplicado de 0.1 mL en profundidad utilizando agar tripticasa de soya y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

### Preparación de soluciones del desinfectante a base de mezcla de ácidos orgánicos (Citrosan®)

Se prepararon soluciones del desinfectante a base de ácidos orgánicos (Citrosan®) con agua destilada estéril (30 minutos antes de iniciar la prueba), a tres concentraciones diferentes: 1000, 1200 y 2000 ppm. Como control se utilizó buffer fosfato pH 7.2 y como neutralizante del desinfectante se utilizó Caldo Lethen Modificado (Caldo MLTB marca Difco).

### Prueba de evaluación del desempeño del desinfectante a base de ácidos orgánicos (Citrosan®)

Este procedimiento se realizó por triplicado. Se evaluaron cuatro tiempos de contacto del desinfectante: 0, 3, 5 y 7 minutos. A partir de

los inóculos obtenidos (10<sup>9</sup> UFC/mL) de los dos patógenos *E. coli* y *Salmonella spp* (por separado), se realizaron diluciones seriadas en agua peptona estéril 0.1% para obtener un inóculo de trabajo con una población de 10<sup>5</sup> UFC/mL. Para confirmar las poblaciones de cada uno de los patógenos se realizó siembra por duplicado de 0.1 mL en profundidad utilizando agar tripticasa de soya y se incubó por 24 horas a 37 °C.

Se tomaron tres tubos con 2 mL de cada concentración de ensayo (1000, 1200 y 2000 ppm) del desinfectante Citrosan® y un cuarto tubo que contenía 2 mL de buffer fosfato estéril que correspondió al control. A cada uno de estos se les adicionaron 0.2 mL del inóculo de trabajo de cada patógeno (combinación de *E. coli* y *Salmonella* por separado). Al cumplirse los cuatro tiempos de contacto, se transfirió 0.1 mL del contenido de cada uno de tubos a otros cuatro tubos conteniendo 10 mL de Caldo Lethen para neutralizar la acción del desinfectante. Estos últimos se incubaron por 24 horas a 37 °C y posteriormente se realizó la lectura por turbiedad. Para la confirmación de crecimiento a partir de los tubos incubados, se sembró por estría sobre placas de agar tripticasa de soya y se incubó por 24 horas a 37 °C.

## Etapa III. Prueba de inoculación en lechugas

Se realizaron 3 réplicas y 3 repeticiones en días diferentes. Se tomaron series de cada una de las repeticiones y se realizó detección de *Salmonella spp* y recuento de *E. coli*, con el fin de tener una caracterización de estos microorganismos.

### Preparación del inóculo

Los inóculos fueron preparados como se indicó en la etapa II, prueba *in vitro*.

### Procedimiento de inoculación

A partir de los inóculos obtenidos (10<sup>9</sup> UFC/mL) de *E. coli* y *Salmonella spp*, se realizaron diluciones seriadas en agua peptona estéril APE 0.1% para obtener un inóculo de trabajo con una población de 10<sup>5</sup> UFC/mL. Para confirmar las poblaciones de cada uno de los patógenos se sembró por duplicado de 0.1 mL en agar tripticasa de soya y se incubó por 24 horas a 37 °C.

Cada uno de los patógenos se inoculó directamente en la superficie de los trozos de hoja lechuga por el método de gota o in situ, utilizando una micropipeta. Se tomaron series de 10 trozos de hoja de lechuga (5 x 5 cm); la mitad de estos trozos (5 unidades) se inocularon en la cara externa, la otra mitad se inocularon en la cara interna. A cada trozo se le inoculó una cantidad de 50 µmL de la suspensión del patógeno. Como control positivo se aplicó el mismo procedimiento de inoculación a una serie de 10 trozos de hojas de lechuga que no tuvieron ningún tratamiento con desinfectante.

Para permitir la adhesión de los patógenos a la superficie de la hoja de lechuga, las hojas inoculadas se colocaron en burbujas plásticas semirrígidas termoformadas (tipo domo) y se dejaron secar en una cabina de flujo laminar a temperatura ambiente ( $20\text{ C} \pm 2^\circ$ ) durante 2 horas antes del tratamiento con el desinfectante. (figura 2).

#### **Tratamiento de las lechugas con desinfectante a base de una mezcla de ácidos orgánicos (Citrosan®)**

A partir del resultado de evaluación del desempeño del desinfectante realizado en la prueba in vitro (etapa II), se obtuvo que la concentración del desinfectante y el tiempo de contacto más efectivo en la inactivación de los dos patógenos estudiados se presentaron a 2000 ppm y 5 minutos, respectivamente. A continuación, 10 trozos de hojas lechuga inoculadas se sumergieron en un erlenmeyer con 1.5 litros de la solución del desinfectante. Posteriormente se llevó a agitación (agitador magnético Corning PC- 420D), a 150 rpm ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 7 minutos a temperatura ambiente (figura 3). Transcurrido este tiempo, los 10 trozos de hojas de lechuga tratadas en la solución desinfectante se retiraron del erlenmeyer, se llevaron a una bolsa de polietileno estéril donde se pesaron e inmediatamente se les adicionaron 200 mL de Caldo Lethen para neutralizar la acción del desinfectante. Se procedió a macerar durante 2 minutos a alta velocidad en un stomacher (MIX2, Marca AES).

Transcurrido el tiempo de secado, la serie de lechugas correspondientes al control positivo

se llevó a una bolsa de polietileno y se le adicionaron 200 mL de agua APE 0.1%; se maceraron durante 2 minutos.

Para determinar la población de *Salmonella spp* a partir del homogeneizado de lechuga obtenido, se sembró por cuadruplicado 0.25 mL en superficie de placas de agar SS (*Salmonella-Shigella*, marca Sharlau); las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  /48 horas. Adicionalmente, a partir del mismo homogeneizado se realizaron diluciones seriadas en agua peptona estéril al 0.1% hasta  $10^{-2}$  y para las series de lechuga control positivo hasta  $10^{-4}$ . Se sembró por duplicado 0.1 mL con profundidad utilizando agar SS (*Salmonella-Shigella*) y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  /48 horas. La confirmación de *Salmonella sp* se hizo en TSI, LIA y Citrato.

Para el recuento de *E. coli* se utilizó agar cromogénico para coliformes (Chromocult marca Merck) y las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  / 24 horas. Se confirmó sembrando en clado lauril con MUG (marca Sharlau) para evidenciar producción de gas, fluorescencia e indol mediante adición de reactivo de Kovac's (marca Merck).

#### **Análisis estadístico**

##### **Estimación de la reducción de la población de los patógenos**

La reducción microbiana de cada uno de los patógenos en la lechuga, se estimó obteniendo la diferencia entre el Log UFC/g del control positivo (lechugas inoculadas y no tratadas con desinfectante) y el Log UFC/g de las lechugas tratadas con el desinfectante Citrosan®.

En la etapa de caracterización, se estimó un valor intermedio de 5 UFC/g (0.7 Log UFC/g) para aquellos casos donde los recuentos obtenidos de *E. coli* se ubicaron por debajo del límite de detección ( $< 10$  UFC/g). Esto únicamente para efectos del tratamiento estadístico de los datos.

El tratamiento estadístico de los resultados de la etapa de inoculación se realizó aplicando un modelo lineal generalizado, a través de un análisis de varianza de los distintos factores (Software Statgraphics Centurion XV).



Figura 2. Secado de patógenos sobre lechugas inoculadas



Figura 3. Tratamiento con desinfectante de lechugas inoculadas

## Resultados y discusión

En la caracterización se evidenció ausencia de *Salmonella*/25 g para todas las muestras de lechuga analizadas, mientras que los niveles de *E. coli* estuvieron en  $1.02 \pm 0.46$  Log UFC/g.

La prueba in vitro mostró la inhibición de los dos patógenos *Salmonella spp* y *E. coli* a una concentración de 2000 ppm del desinfectante Citrosan® y 5 minutos de contacto. Por tanto, se pudo inferir que *E. coli* es más sensible al producto respecto a *Salmonella spp*. Estos resultados se muestran en las tablas 1 y 2.

La determinación de *Salmonella spp* antes de la inoculación con los patógenos arrojó ausencia en 25 g para todas las series de lechugas analizadas. En cuanto a *E. coli*, se encontraron poblaciones de  $1.04 \pm 0.29$  Log UFC/g.

Los inóculos de trabajo utilizados estuvieron en  $5.45 \pm 0.43$  Log UFC/ml para las cepas de *E. coli* y  $5.40 \pm 0.68$  Log UFC/mL para las cepas de *Salmonella spp*, partiendo de cultivos de  $9.41 \pm 0.63$  Log UFC/mL y  $9.32 \pm 0.70$  Log UFC/mL, respectivamente.

La tabla 3 muestra las reducciones de la población de *E. coli* y *Salmonella spp* inoculadas en

las lechugas, después del tratamiento con el desinfectante a base de ácidos orgánicos (Citrosan®), fueron de  $2.09 \pm 0.14$  Log UFC/g y  $0.98 \pm 0.19$  Log UFC/g, respectivamente.

Los resultados de reducción de *E. coli* en los recuentos de los controles positivos, respecto de las lechugas tratadas con el desinfectante a base de ácidos orgánicos (Citrosan®), mostraron diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%. Asimismo, se obtuvo diferencia significativa en la reducción de las poblaciones de *Salmonella spp* después del tratamiento con el desinfectante Citrosan®.

Los resultados de la prueba in vitro relevaron el mejor desempeño del desinfectante a base de ácidos orgánicos (Citrosan®) en la eliminación de *E. coli* y *Salmonella spp* a una concentración de 2000 ppm y 5 minutos de contacto, respecto a concentraciones inferiores (1000 y 1200 ppm). Este hecho se debe al nivel del inóculo utilizado ( $10^5$  UFC/g) con los dos patógenos, el cual corresponde a poblaciones altas, de acuerdo con estudios realizados por Koseki y colaboradores (2003), en los cuales diferencia altos inóculos ( $10^5$ - $10^6$  UFC/g) de bajos inóculos ( $10^3$ - $10^4$  UFC/g). Por su parte, Weissinger<sup>1</sup> distingue poblaciones de  $10^3$ - $10^4$  UFC/g como inóculos altos y de  $10^0$ - $10^1$  UFC/g como inóculos bajos.

En este estudio, la caracterización inicial mostró que las lechugas originalmente contenían

poblaciones de *E. coli* que estuvieron entre  $10^0$  y  $10^1$  UFC/g, en tanto que la detección de *Salmonella spp* fue negativa en todos los análisis.

La recuperación de los patógenos inoculados en los controles positivos indica que parte de la población inoculada permaneció en las hojas de lechuga. En este sentido, estudios previos afirman que las bacterias pueden adherirse a la superficie de la hoja de tal forma que es imposible para el desinfectante acceder a ellas. Koseki y colaboradores<sup>5</sup>, realizaron estudios en lechugas que revelan la influencia del método y sitio de inoculación en la eficacia de los desinfectantes, demostrando que se dan amplias diferencias en la recuperación de patógenos a partir de las hojas inoculadas directamente en la superficie interna respecto de la superficie externa. Los estomas generalmente se encuentran en la superficie interna de la hoja<sup>5</sup>; por lo tanto, la inoculación en este punto favorecerá que más bacterias se adhieran a ellos y estén menos expuestas a la acción del desinfectante.

Los resultados obtenidos en las pruebas de inoculación mostraron que la reducción de la población de *Escherichia coli* fue significativamente superior a la que se observó en *Salmonella spp*. Este resultado está relacionado con la respuesta obtenida en la prueba in vitro, donde *E. coli* mostró mayor sensibilidad al tratamiento con el desinfectante Citrosan®.

**Tabla 1. Resultados prueba in vitro *Salmonella spp***

Tubos positivos <i>Salmonella spp</i>			
Tiempo de contacto (minutos)	Concentración desinfectante (ppm)		
	1000	1200	2000
0	3	3	3
3	1	3	3
5	0	2	0
7	1	2	1



**Tabla 2. Resultados prueba in vitro *E. coli***

Tubos positivos <i>E. coli</i>			
Tiempo de contacto (minutos)	Concentración desinfectante (ppm)		
	1000	1200	2000
0	3	3	3
3	1	1	1
5	2	2	0
7	0	1	0

**Tabla 3. Efecto de la mezcla de ácidos orgánicos Citrosan® frente a *E. coli* y *Salmonella spp* en lechugas inoculadas**

Patógeno	Control positivo (Log UFC/g)	Tratamiento con Citrosan® (Log UFC/g)	Reducción Logarítmica Log UFC/g
<i>E. coli</i>	4.44±(0.17)*	2.36±(0.21)	2.09±(0.14)
<i>Salmonella spp</i>	2.33±(0.12)	1.35±(0.25)	0.98±(0.19)

\* Cada valor representa el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar

## Conclusiones

El tratamiento de lechuga fresca con el desinfectante a base de ácidos orgánicos Citrosan® redujo inóculos altos ( $10^5$  UFC/g) de los patógenos *E. coli* y *Salmonella spp* en  $2.09 \pm 0.14$  Log UFC/g y  $0.98 \pm 0.19$  Log UFC/g, respectivamente. Esta respuesta corresponde a reducciones superiores al 99% para *E. coli* y cercanas al 90% en *Salmonella spp*. En cuanto a las dosis de uso evaluadas del Citrosan®, se observó mayor efectividad del desinfectante frente a *E. coli* y *Salmonella spp* a una concentración de 2000 ppm. Según el estudio, se determinó que 5 minutos de contacto del desinfectante Citrosan® frente a las cepas de los patógenos *E. coli* y *Salmonella spp*, es el tiempo que produce la mejor acción antimicrobiana a las dosis de uso evaluadas.

Asimismo, los ensayos in vitro y de inoculación demostraron mayor sensibilidad del patógeno *E. coli* respecto a *Salmonella spp* frente al tratamiento de desinfección con Citrosan®. Por tanto, el desinfectante a base de ácidos orgánicos Citrosan® constituye una alternativa efectiva y segura como tratamiento para reducir microorganismos patógenos en vegetales que gene-

ralmente se consumen crudos. Sumado a esto, la prevención como mecanismo para reducir el riesgo microbiológico asociado al consumo de vegetales frescos aplicado desde el cultivo y hasta el consumidor final, está relacionado con mejores resultados en los tratamientos de desinfección.

## Referencias bibliográficas

- HARRIS, L. J.; *et al.* Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews and Food Science and Food Safety*. [En línea]. 2003. p. 78-141. [Consultado el 26 abril de 2011]. Url disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.15414337.2003.tb00031.x/abstract>
- BEUCHAT, L. R. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. *World Health Organization*. [En línea]. 1998. p. 1. [Consultado el 28 Abril de 2011]. Url disponible en [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/surfac\\_decon/en/](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/surfac_decon/en/)
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) - CENTER FOR FOOD SAFETY AND NU-

- TRITION - CFSAN. Production practices as risk factors in microbial food Safety of fresh and fresh-cut produce. Chapter II. [En línea]. 2001. [Consultado el 21 de Abril de 2011]. Url disponible en [http://ucgaps.ucdavis.edu/documents/Preharvest\\_Factors\\_and\\_Risk2041.pdf](http://ucgaps.ucdavis.edu/documents/Preharvest_Factors_and_Risk2041.pdf)
4. GIL, M. I.; *et al.* ¿Hay alternativas al cloro como higienizante para productos de IV Gama?. En: Revista Horticultura. Mayo 2009. [en línea]. [Consultada el 3 de abril de 2011]. Url disponible en <http://www.horticom.com/pd/article.php?sid=73131>
  5. Koseki, S; *et al.* Influence of inoculation method, spot inoculation site, and inoculation size on the efficacy of acidic electrolyzed water against pathogens on lettuce. En: Journal of Food Protection. 2003. Vol. 66, N°11, p. 2010-2016.
  6. PARISH, M. E.. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. En: Comprehensive Reviews and Food Science and Food Safety. [En línea]. 2003. p. 61-173. [Consultado el 26 de abril de 2011]. Url disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.15414337.2003.tb00033.x/abstract>.
  7. JAMES, J. Microbial Hazard identification in fresh fruit and vegetables. [En línea]. New Jersey: Wiley, 2006. 312 p. [Consultado el 18 de abril de 2011]. Url disponible en: [http://books.google.com/books?id=Mk1TdH6K79oC&pg=PA177&lpg=PA177&dq=lagrange+uses+chlorine&source=bl&ots=ygxtZqLsSf&sig=pfxhHrsIAckPTDNScbtkxzTnvl&hl=es&ei=s0myTZqgFcjY0QGZn7CqCQ&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=1&ved=0CBYQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com/books?id=Mk1TdH6K79oC&pg=PA177&lpg=PA177&dq=lagrange+uses+chlorine&source=bl&ots=ygxtZqLsSf&sig=pfxhHrsIAckPTDNScbtkxzTnvl&hl=es&ei=s0myTZqgFcjY0QGZn7CqCQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CBYQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false)
  8. JOINT INSTITUT OF FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION (JIFSAN). Mejorando la seguridad y calidad de frutas y hortalizas frías: Manual de formación para instructores. [En línea]. 2002. [Consultado el 21 de marzo de 2011]. Url disponible en: <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/bpa/normtec/Frutas/15.pdf>.
  9. AKBAS, M. Y. y OLMEZ, H. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. En: Letters in Applied Microbiology. 2007. Vol. 44, N°6, p. 573-678. [Consultado el 20 de abril de 2011]. Url disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/lam.2007.44.issue-6/issuetoc>
  10. RAFTARI, M.; *et al.* Effect of organic acids on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* contaminated meat. En: The Open Microbiology Journal. [En línea]. 2009. Vol. 3, p. 121-127. [Consultado el 22 de marzo de 2011]. Url disponible en: <http://www.benthamscience.com/open/tomicroj/articles/V003/121TOMICROJ.pdf>.
  11. HOLGUÍN HERNÁNDEZ, M. S. Manual de Técnicas de Análisis para control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano. Santa Fe de Bogotá, D. C.: INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos), 1998.
  12. WEISSINGER, W. R.; CHANTARAPANONT, W. & BEUCHAT, L. R. Survival and growth of *Salmonella* Baildon on shredded lettuce and diced tomatoes, and effectiveness of chlorinated water as a sanitizer. En: International Journal of Food Microbiology. [En línea]. 2000. Vol. 62, N°1-2, p. 123-31. [Consultado el 25 de abril de 2011]. Url disponible en: <http://www.thaiscience.info/Article%20for%20ThaiScience/Article/1/Ts1%20survivaland%20growth%20of%20salmonella%20baildon%20in%20shredded%20lettuce%20and%20dicedtomatoes%20and%20effectiveness%20of%20chlorinated%20water%20as%20a%20sanitizer.pdf>