

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**ESCUELA DE BIOANÁLISIS**

**CARRERA DE MICROBIOLOGÍA**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
MICROBIÓLOGO**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL AGUA DE PLATA  
SOBRE ENSALADAS LISTAS PARA EL CONSUMO EN CAFETERÍAS DE UNA  
INSTITUCIÓN DE EDUCACIÓN SUPERIOR**

**DAVID ALEJANDRO BONIFAZ PANAMÁ**

**DIRECTORA: Mtr. ELENA GRANDA**

**QUITO, 2015**

# PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **DAVID ALEJANDRO BONIFAZ PANAMÁ**, C.I. 1713447249, autor del trabajo de graduación intitulado “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL AGUA DE PLATA SOBRE ENSALADAS LISTAS PARA EL CONSUMO EN CAFETERÍAS DE UNA INSTITUCIÓN DE EDUCACIÓN SUPERIOR”, previa a la obtención del grado académico de **MICROBIÓLOGO** en la Escuela de Bioanálisis.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en forma digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 2015

David Alejandro Bonifaz Panamá

C.I. 1713447249

## **DEDICATORIA**

*El presente trabajo de investigación es dedicado a mis padres ya que gracias a su lucha diaria, sus enseñanzas, su comprensión he logrado vencer las adversidades que se me han presentado a lo largo de mi vida como estudiante, logrando cumplir mis metas y espero seguir adelante para llegar a ser un hombre y profesional de bien.*

David Alejandro Bonifaz Panamá

## **AGRADECIMIENTO**

Desearía comenzar agradeciendo a Dios por la salud que me ha dado, a mis padres y hermana por el amor, comprensión, consejos y apoyo que me han brindado para lograr avanzar a pesar de las complicaciones sufridas durante mi vida estudiantil; a la Mtr. Elena Granda por haberme tomado en cuenta para la realización del proyecto y por compartirme todo su gran conocimiento, a Vero Jara por sus grandes ideas y apoyo brindado, a la empresa Argentum por proporcionar la solución para la realización de los ensayos, a las personas encargadas de las cafeterías por la apertura y el tiempo para realizar la investigación, a la Escuela de Bioanálisis por facilitar las instalaciones y equipos utilizados y a todas las personas que se vieron involucradas, sin las cuales la realización de este trabajo no habría sido posible.

David Alejandro Bonifaz Panamá

## RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar la mejor concentración del agua de plata y el tiempo de contacto para inhibir el crecimiento bacteriano en ensaladas listas para el consumo de las cafeterías de una institución de educación superior.

Se realizó el muestreo de la totalidad de las ensaladas que son parte del menú de las cuatro cafeterías de la institución. Para su análisis se utilizaron placas Petrifilm para la detección de mesófilos aerobios, mohos y levaduras y *E. coli*/coliformes; se manejó la primera dilución de la muestra para la siembra y se enfrentó en volúmenes iguales con las concentraciones 4 ppm y 10 ppm del agua de plata; al primer minuto de contacto se realizó la primera siembra en las placas de los tres microorganismos indicados y luego de transcurridos 5 minutos nuevamente se realizó otra siembra. Las placas fueron incubadas de acuerdo a sus requerimientos y transcurrido el tiempo de incubación se realizó el recuento de las mismas.

Finalmente, se logró cumplir con los objetivos propuestos ya que desde el punto de vista microbiológico, el agua de plata disminuyó considerablemente la población bacteriana inicial de las ensaladas muestreadas hasta valores inferiores a m, lo que representa que son aceptables para el consumo humano según el Real Decreto 3484/2000 BOE 12/1/2001 para comidas preparadas sin tratamiento térmico y comidas preparadas con tratamiento térmico, que lleven ingredientes no sometidos a tratamiento térmico. La mayor concentración y el mayor tiempo de contacto fueron los factores eficaces para la disminución de la carga microbiana inicial a excepción de los mohos, donde se evidenció que por su diferente estructura a la de las bacterias no presentó una disminución considerable.

## ABSTRACT

The present study was conducted to determine the best concentration of silver water and the contact time to inhibit bacterial growth in ready-to-eat salads in the cafeterias of an institution of higher education.

There was realized the sampling of the totality of the salads that are part of the menu of four cafeterias of the institution. Petrifilm plates for the detection of aerobic mesophilic, molds and yeast and *e. coli*/coliform were used for analysis, was managed the first dilution of the sample for the sowing and clashed in equal volumes with concentrations 4 ppm and 10 ppm of silver water, the first minute of contact was made the first sowing on the plates of the three listed microorganisms and after 5 minutes another sowing was realized. The plates were incubated according to their requirements and after the incubation time counting them performed.

Finally, managed to comply with the objectives, since from the microbiological point of view, the silver water considerably decreased the initial bacterial population of the salads sampled up to values lower than m, representing that they are acceptable for human consumption according to the Royal Decree 3484/2000 BOE 12/1/2001 for meals prepared without heat treatment and heat treatment, meals containing ingredients not subjected to heat treatment. The highest concentration and contact time were the effective factors for the decrease of the initial microbial load with the exception of molds, where it was evident that by their different structure than bacteria did not present a significant decrease.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

	<b>Página</b>
<b>A. PÁGINAS PRELIMINARES</b>	
Página de título o portada	I
Declaración y Autorización	II
Dedicatoria	III
Agradecimiento	IV
Resumen	V
Abstract	VI
Índice general de contenidos	VII
Índice de gráficos	XII
Índice de imágenes	XII
Índice de tablas	XIII
Índice de anexos	XIV

## **B. TEXTO**

	<b>Página</b>
1. CAPÍTULO I	
1.1. Tema	1
1.2. Introducción	1
1.3. Justificación	2
1.4. Planteamiento del Problema	4
1.5. Objetivos	6
1.5.1. Objetivo general	6
1.5.2. Objetivos específicos	6
1.6. Hipótesis	6
2. CAPÍTULO II	
2.1. Marco teórico y conceptual	7
2.1.1. Antecedentes	7
2.1.2. Marco teórico	8
2.1.2.1. La plata	8
2.1.2.1.1. Compuestos y aleaciones de la plata	8
2.1.2.1.1.1. Plata coloidal	8
2.1.2.1.1.2. Plata iónica	8
2.1.2.1.1.3. Nanopartículas de plata	9

2.1.2.2. Mecanismos de acción de la plata	9
2.1.2.3. Buenas Prácticas de Manufactura	10
2.1.2.4. Ensaladas, verduras y hortalizas	10
2.1.2.5. Enfermedades bacterianas de origen alimentario	11
2.1.2.6. Tipos de microorganismos contaminantes	12
2.1.2.7. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)	12
2.1.2.8. Microorganismos indicadores en alimentos	13
2.1.2.8.1. Mesófilos aerobios	14
2.1.2.8.2. Coliformes totales	14
2.1.2.8.3. Mohos y levaduras	14
2.1.2.8.4. Coliformes fecales	15
2.1.2.8.5. Enterococos	15
2.1.2.8.6. <i>Clostridium perfringens</i>	15
3. CAPÍTULO III	
3.1. Materiales y metodología	16
3.1.1. Fase de recolección de datos y creación de formularios	16
3.1.2. Materiales de la fase de muestreo	17
3.1.3. Materiales de la fase de laboratorio	17
3.1.4. Equipo de laboratorio	18
3.2. Marco metodológico	18

3.2.1. Muestreo, recolección y transporte de las muestras	18
3.3. Controles	20
3.3.1. Control de calidad del agua de plata	20
3.3.2. Control de calidad del agua peptonada	20
3.4. Procesamiento de las muestras	21
3.4.1. Análisis de la carga microbiana	21
3.5. Análisis de la actividad antimicrobiana	21
3.5.1. Análisis de la concentración de agua de plata	21
3.5.2. Análisis de los tiempos de contacto	21
3.6. Manejo de desechos	21
3.7. Interpretación de resultados	22
3.8. Análisis de resultados	22
4. CAPÍTULO IV	
4.1. Resultados y discusión	23
4.1.1. Análisis estadístico descriptivo de la carga microbiana inicial de la matriz en estudio	23
4.1.1.1. Mesófilos aerobios	24
4.1.1.2. Coliformes totales	26
4.1.1.3. <i>Escherichia coli</i>	27
4.1.1.4. Levaduras	28

4.1.1.5. Mohos	30
4.1.2. Análisis estadístico del efecto del agua de plata en los diferentes microorganismos indicadores de contaminación	31
4.1.2.1. Mesófilos aerobios	31
4.1.2.2. Coliformes totales	32
4.1.2.3. <i>Escherichia coli</i>	34
4.1.2.4. Levaduras	35
4.1.2.5. Mohos	36
5. CAPÍTULO V	
5.1. Conclusiones	38
5.2. Recomendaciones	40
<b>C. MATERIALES DE REFERENCIA</b>	
BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXOS	47

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	<b>Página</b>
Gráfico 1. Dispersión de datos para MA	25
Gráfico 2: Dispersión de datos para CT	27
Gráfico 3: Dispersión de datos para EC	28
Gráfico 4: Dispersión de datos para L	29
Gráfico 5: Dispersión de datos para M	30
Gráfico 6: Gráfico de interacción entre factores para MA	32
Gráfico 7: Gráfico de interacción entre factores para CT	33
Gráfico 8: Gráfico de interacción entre factores para EC	34
Gráfico 9: Gráfico de interacción entre factores para L	35
Gráfico 10: Gráfico de interacción entre factores para M	37

## ÍNDICE DE IMÁGENES

	<b>Página</b>
Imagen 1: Cronograma de muestreo	16
Imagen 2: Materiales fase de muestreo	17
Imagen 3: Materiales fase de laboratorio	17
Imagen 4: EPIs	18
Imagen 5: Recolección ensalada	19
Imagen 6: Recipiente con ensalada	19

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1. Codificación e ingredientes de ensaladas	19
Tabla 2. Resultados obtenidos antes del tratamiento con agua de plata	23
Tabla 3 Resumen Estadístico para MA	24
Tabla 4. Resumen Estadístico para CT	26
Tabla 5. Resumen Estadístico para EC	27
Tabla 6. Resumen Estadístico para L	28
Tabla 7. Resumen Estadístico para M	30
Tabla 8. Análisis de Varianza para MA	31
Tabla 9. Análisis de Varianza para CT	32
Tabla 10. Análisis de Varianza para EC	34
Tabla 11. Análisis de Varianza para L	35
Tabla 12. Análisis de Varianza para M	36

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Página</b>
Anexo 1. Formato documento de autorización de muestreos proyecto PUCE 2014	48
Anexo 2. Peptona bacteriológica. HIMEDIA	49
Anexo 3. Preparación de agua peptonada al 0,1 %	51
Anexo 4. Guía interpretación <i>E. coli</i> /coliformes	52
Anexo 5. Guía interpretación mohos y levaduras	56
Anexo 6. Guía interpretación mesófilos aerobios	59
Anexo 7. Formulario control de temperaturas (refrigeradora - incubadora)	63
Anexo 8. Equipo preparación agua de plata	64
Anexo 9. Recomendaciones de uso placas petrifilm mesófilos aerobios	66
Anexo 10. Recomendaciones de uso placas petrifilm mohos y levaduras	68
Anexo 11. Recomendaciones de uso placas petrifilm <i>E. coli</i> /coliformes	70
Anexo 12. Métodos validados por la AOAC Internacional ( <i>Association of Analytical Communities</i> )	72
Anexo 13. Formulario manejo de desechos	73
Anexo 14. Matriz de datos obtenidos	74
Anexo 15. Procedimiento de análisis	77
Anexo 16. Imágenes recuento final placas petrifilm	78

# **CAPÍTULO I**

## **1.1. TEMA**

“Evaluación de la actividad bactericida del agua de plata sobre ensaladas listas para el consumo en cafeterías de una institución de educación superior”.

## **1.2. INTRODUCCIÓN**

El consumo de alimentos que son elaborados con medidas sanitarias ineficientes o que no requieren cocción representa desde el punto de vista microbiológico un riesgo para la población que diariamente consume alimentos fuera de su domicilio. En la actualidad las normas para la elaboración de alimentos y en general para la industria alimenticia son más exigentes y deben ser cumplidas a cabalidad para disminuir el riesgo de contaminación en cualquier etapa del proceso de elaboración y por ende salvaguardar la salud de la población.

La limpieza y desinfección insuficiente de las verduras y hortalizas utilizadas para la preparación de ensaladas es la causa de las principales enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), debido a que desde la cosecha hasta el uso de las mismas en comidas preparadas poseen un nivel de contaminación notorio por la presencia de microorganismos patógenos.

Según el Ministerio de Salud Pública del Ecuador en el año 2014 fueron notificados 8 090 casos de intoxicación alimentarias causadas por el consumo de agua y alimentos contaminados (MSP, 2014).

La utilización y la búsqueda de nuevos desinfectantes eficaces para la desinfección de las verduras y hortalizas representa uno de los principales procesos para la elaboración de ensaladas y cualquier tipo de alimento listo para el consumo humano.

### 1.3. JUSTIFICACIÓN

El presente estudio contribuirá con información sobre el efecto del agua de plata como desinfectante bactericida en los vegetales y hortalizas para preparación de ensaladas. El uso del agua de plata para la desinfección de ensaladas ayudará a reducir al mínimo las posibilidades de una infección causada por el consumo de las mismas. Esta acción preventiva es de vital importancia para lugares como las cafeterías de una institución de educación superior en donde se expenden alimentos diariamente y a los cuales acuden estudiantes, personal administrativo y profesores. Por lo tanto, la desinfección de las verduras y hortalizas que son utilizadas para la elaboración de las ensaladas es vital para garantizar la salud de las personas que visitan los lugares mencionados.

Desde el punto de vista socio económico, la importancia de una buena desinfección de vegetales y hortalizas radica en prevenir intoxicaciones alimentarias por consumo de ensaladas. En el caso de que este tipo de acontecimientos sucedan, la clientela sería una de las principales afectadas al presentarse problemas de salud, específicamente enfermedades relacionadas al consumo de alimentos con alta carga microbiana. Además la cafetería tendría pérdidas económicas debido a la disminución de los clientes, reputación o aún más grave provocaría el cierre del local. Dependiendo de los resultados obtenidos en la presente investigación el uso del agua de plata constituiría una alternativa positiva como desinfectante gracias a su efecto bactericida sobre una amplia gama de microorganismos entre las que se encuentran especies patógenas.

En el Ecuador, no se ha evaluado la actividad bactericida de la plata. No existe información acerca de la concentración y tiempo de contacto para el uso del agua de plata como desinfectante en ensaladas listas para el consumo, información que es necesaria para conocer si el agua de plata tiene poder bactericida en un corto o largo período de tiempo desde el contacto con el alimento y si ese poder depende o no de la concentración de la misma. En el presente estudio se trabajará con las ensaladas debido a que son una de las principales rutas de transmisión de enfermedades.

Las concentraciones utilizadas fueron tomadas a partir del proyecto realizado en la PUCE en el 2013 titulado “*Determinación de la concentración mínima inhibitoria del agua de*

*plata frente a microorganismos patógenos y sus posibles beneficios como desinfectante natural*", código J13128, siendo las menores concentraciones que mostraron un mayor efecto inhibitorio en los microorganismos utilizados.

Los datos obtenidos en el presente estudio serán una línea base para futuras investigaciones; como por ejemplo su aplicación en otros tipos de alimentos o matrices para la eliminación total o parcial de microorganismos indicadores de contaminación.

#### 1.4. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

En Ecuador, se han reportado hasta finales del 2014, 8.090 casos de intoxicaciones alimentarias agudas a causa del consumo de aguas y alimentos contaminados (MSP, 2014). Las verduras y hortalizas constituyen una parte importante de la dieta diaria de las personas debido principalmente a su alto contenido nutritivo. Sin embargo, las ensaladas y cualquier alimento en general que no cumplan con las normas microbiológicas estandarizadas para su consumo representan un riesgo para la población que las consume (Vásquez, De Cos, & López, 2005). Desde la cosecha hasta el uso de las mismas en comidas preparadas, las verduras y hortalizas poseen un nivel de contaminación notorio. La contaminación puede deberse a diferentes factores pre-cosecha y post-cosecha. Entre los factores pre-cosecha se consideran a la exposición a aguas de riego contaminadas, la tierra y los equipos de cultivo. Por otro lado, entre los factores posteriores a la cosecha que pueden aumentar la carga microbiana en verduras y hortalizas están la contaminación durante su transporte y el mal manejo del manipulador que las lava y trata de una manera inadecuada. Por ese motivo, el consumo de alimentos que no tienen un proceso de cocción previo como el caso de las ensaladas y que no cumplan con las normas microbiológicas estandarizadas para su consumo representan un mayor riesgo para la población que tiene como dieta principal este tipo de alimentos (FAO, 2003). Varios estudios reportan que los vegetales que constituyen parte de una ensalada como lechuga, tomate, apio, zanahoria, repollo, cebolla y huevo duro presentan los principales microorganismos patógenos asociados con casos y brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) (Nario, Gómez, Zotta, Lavayén, & Piquin, 2010). Entre los agentes patógenos encontrados en diferentes elementos que constituyen una ensalada se han identificado la presencia de *Salmonella* spp., (Nario et al., 2010; León, 2007), *Staphylococcus aureus* (Nario et al., 2010), y *Escherichia coli* (Pellicer et al., 2002; Castro et al., 2006; Nario et al., 2010). También se puede encontrar otros microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* (Castro et al., 2006; León, 2007), *Clostridium botulinum* (Castro et al., 2006), *Vibrio cholerae* (Castro et al., 2006; León, 2007), *Aeromonas* spp, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Cryptosporidium* spp, *Cyclospora cayetanensis*, *E. coli* O157:H7, Enterovirus, *Giardia lamblia*, Virus de Hepatitis A, Virus Norwalk, *Shigella* spp, y *Yersinia enterocolitica* (León, 2007).

Debido a la falta de un proceso de lavado y desinfección adecuado durante la elaboración de ensaladas vegetales, éstas podrían convertirse en potenciales fuentes de infecciones o brotes de enfermedades. En el mercado se comercializan presentaciones cloradas para la desinfección de vegetales siendo el hipoclorito el más utilizado y económico. Sin embargo, se ha verificado que el hipoclorito puede reaccionar con la materia orgánica generando compuestos clorados y trihalometanos sospechosos de ser cancerígenos (FAO, 2003). Por esta razón, una alternativa para la desinfección de vegetales es el uso del agua de plata. Los beneficios de la plata radican en su efecto bactericida y su propiedad oligodinámica (Coutiño & Pérez, 2007). En particular, los iones de plata y sus compuestos actúan como excelentes agentes bactericidas resultando ser altamente tóxicos para los microorganismos entre los que se incluyen a varias especies de bacterias (Prabhu & Poulouse, 2012). La toxicidad contra los microorganismos dependerá de la concentración y de la dosis de la plata (Coutiño, Pérez, García, & Herbert, 2010). Por ejemplo, a concentraciones bajas como 8 ug, las nanopartículas de plata tienen un efecto completamente citotóxico frente a *Escherichia coli* (Singh, Singh, Prasad, & Gambhir, 2008). La eficacia de las nanopartículas y compuestos a partir de la plata no solo se ha comprobado en *E. coli* sino también se ha reportado su acción en *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhus*, *Staphylococcus aureus* (Sarsar, Selwal, & Selwal, 2014; Prabhu & Poulouse, 2012). Por otro lado, diferentes estudios han demostrado que la plata o sus derivados no atacan a células del ser humano (Berger, Spadaro, Chapin, & Becker, 1976). Por lo que se sugiere que el uso o consumo de plata y sus derivados no representan un peligro tóxico para el ser humano; esto se debe a la baja capacidad citotóxica debido a su poca absorción y deposición en tejidos (Coutiño et al., 2010).

Aunque existen estudios relacionados con el efecto bactericida de la plata a nivel mundial, en el Ecuador no existen investigaciones acerca del agua de plata como agente bactericida.

Por lo anteriormente mencionado la presente investigación pretende responder a la siguiente pregunta:

- ¿A qué concentración y tiempo de contacto el agua de plata presenta mayor capacidad inhibitoria en ensaladas listas para el consumo de cafeterías de una institución de educación superior?

## **1.5. OBJETIVOS**

### **1.5.1. OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la concentración del agua de plata y el tiempo de contacto para reducir la carga microbiana en ensaladas listas para el consumo de las cafeterías de una institución de educación superior.

### **1.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer la carga microbiana de indicadores de contaminación presente en las ensaladas muestreadas sin la adición del agua de plata mediante el uso de placas Petrifilm.
- Determinar la actividad bactericida del agua de plata en dos concentraciones y tiempos de contacto determinados sobre microorganismos indicadores de contaminación en ensaladas listas para el consumo de las cafeterías de una institución de educación superior.

## **1.6. HIPÓTESIS**

El presente trabajo probará la siguiente hipótesis de investigación: el agua de plata a diferentes concentraciones y tiempos de contacto presenta una actividad bactericida en microorganismos indicadores de contaminación de ensaladas listas para el consumo de las cafeterías de una institución de educación superior.

## CAPÍTULO II

### 2.1. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

#### 2.1.1. ANTECEDENTES

La plata, sus iones y compuestos han sido probados por muchos años y continúan siendo parte importante de investigaciones basadas en su poder bactericida (Monge, 2009).

Varios estudios han investigado la actividad antimicrobiana de la plata contra un amplio espectro de microorganismos; como por ejemplo, bacterias Gram positivas y negativas (Souza, Mehta, & Leavitt, 2006; Singh et al., 2008; Negi, Saravanan, Agarwal, Haider, & Goel, 2013) causantes de intoxicación alimentaria (Petrus et al., 2011). Souza et al. (2006) sugieren que la solución de agua de plata es un antibiótico efectivo contra muchas cepas de *Staphylococcus aureus* Meticilino - resistentes (MRSA por sus siglas en inglés) y cepas resistentes a múltiples drogas (MDR por sus siglas en inglés) como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estudios más recientes evalúan el efecto bactericida de la plata utilizando nanopartículas en donde se reporta que 12,5 µg/mL como concentración mínima inhibitoria (CMI) y 25 µg/mL como concentración mínima bactericida (CMB) son suficientes contra *Listeria monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus* (Monge, 2009). En otra investigación las nanopartículas de óxido de plata mostraron efecto bactericida en *E. coli*, en donde el tiempo requerido para inhibir completamente al microorganismo frente a una baja concentración de nanopartículas fue 24 horas (Negi et al., 2013). Las nanopartículas y compuestos a partir de la plata han mostrado ser eficaces frente a 16 especies de bacterias (Prabhu & Poulouse, 2012) que incluyen a *E. coli*, *B. subtilis*, *V. cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhus* y *S. aureus*. Una de las más importantes características es que inhibe a los microorganismos independientemente de si presentan o no resistencia antibiótica natural o adquirida (Sarsar et al., 2014). En el Ecuador no existen aún estudios del poder bactericida del agua de plata por lo que el presente estudio sería el primero en determinar la actividad bactericida del agua de plata sobre una matriz: las ensaladas listas para el consumo.

## **2.1.2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1.2.1. LA PLATA**

La plata es uno de los metales de transición no esenciales más explotados. El metal ha sido utilizado en joyería, metalurgia y medicina. Además durante mucho tiempo este metal ha sido ampliamente estudiado y usado con el objetivo de reducir la contaminación bacteriana y prevenir infecciones (Pal, Kyung, & Myong, 2007). El uso medicinal de la plata en la medicina tradicional de la China e India data de hace 1000 años A.C., en donde ha sido utilizado como antiséptico y para la desinfección de heridas (Arya, Komal, Kaur, & Goyal, 2011).

#### **2.1.2.1.1. COMPUESTOS Y ALEACIONES DE LA PLATA**

Este metal presenta varios tipos de compuestos entre los que se encuentran la plata metálica, sales de plata, óxidos de plata, picrato de plata, plata coloidal, plata iónica y nanopartículas de plata, siendo las tres últimas las más estudiadas como una alternativa para desinfectantes bactericidas. (Prabhu & Poulouse, 2012; Coutiño & Pérez, 2007; Pancorbo, 2009).

##### **2.1.2.1.1.1. Plata coloidal**

La plata coloidal es un sistema de dispersión con características intermedias a las soluciones y suspensiones (Coutiño et al., 2010). A la plata coloidal se la obtiene mediante procesos químicos o eléctricos que están constituidas por pequeñas partículas de plata metálica cargadas eléctricamente y se encuentran suspendidas en determinados medios líquidos de dispersión (Pancorbo, 2009). Esta suspensión de partículas superfina obtenidas a partir de un proceso electro-coloidal ha demostrado tener un poder natural antibiótico y frente a infecciones ha sido de gran utilidad como preventivo (Singh et al., 2008).

##### **2.1.2.1.1.2. Plata iónica**

La plata iónica es uno de los derivados de la plata. La plata iónica es obtenida a partir de la dilución de formas químicas de la plata como el nitrato de plata y está constituida por iones que se encuentran cargados positivamente en un medio acuoso (Pancorbo, 2009).

### **2.1.2.1.1.3. Nanopartículas de plata**

Las nanopartículas de plata son producidas por técnicas de condensación y co-condensación a partir de la evaporación del metal dentro de una atmósfera inerte y su posterior enfriamiento para la nucleación y obtención de las mismas; estas partículas poseen un tamaño entre el rango de 10-100 nm (Lara, Garza, Ixtapan, & Singh, 2011; Singh et al., 2008).

### **2.1.2.2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA PLATA**

La plata actúa en componentes celulares como las proteínas, enzimas, ADN, ARN, entre otros (Monge, 2009). En los microorganismos, los mecanismos de la plata son la interferencia en la cadena transportadora de electrones, formación de complejos con grupos sulfhidrilos los cuales impiden el proceso de deshidrogenación y la actuación sobre los ácidos nucleicos. En las bacterias, una de las principales capacidades del agua de plata es su efecto oligodinámico, efecto bactericida a muy bajas concentraciones. El crecimiento de las bacterias es inhibido por las partículas de plata que se depositan en las vacuolas y pared celular como gránulos, esto causa la inhibición de la división celular, daño en el desarrollo de las células y el contenido celular de las bacterias (Prabhu & Poulouse, 2012), por otro lado los iones de plata afectan drásticamente a la estructura de la membrana bacteriana ocasionando daños en sus funciones tales como la permeabilidad y respiración (Cho, Park, & Osaka, 2005; Morones et al., 2005).

Los diferentes tipos de plata han sido probados por su actividad bactericida contra diferentes microorganismos. La plata nano coloidal ha demostrado tener un buen efecto bacteriostático sobre los principales microorganismos causantes de intoxicación alimentaria y como antimicrobiano es una ventaja por su bajo costo de producción (Petrus et al., 2011). Las partículas de óxido de plata, usadas para preparar otros compuestos de plata, también han demostrado poseer un inmenso potencial y toxicidad contra bacterias Gram positivas y negativas requiriendo bajas concentraciones del compuesto para inhibir el desarrollo microbiano (Negi et al., 2013). Debido a que es un metal tóxico no selectivo es extremadamente letal frente a una amplia cantidad de microorganismos a bajas concentraciones, además su efecto bactericida y liberación lenta y constante (efecto

oligodinámico), han logrado que sea utilizado como preservante o desinfectante (Coutiño & Pérez, 2007; Arya et al., 2011; Lemire, Harrison, & Turner, 2013). En conclusión, por su fuerte toxicidad el agua de plata es eficaz contra un amplio grupo de microorganismos (Singh et al., 2008), en particular por ejercer fuertes efectos inhibitorios y bactericidas, así como por poseer un amplio espectro de actividades antimicrobianas (Kim, Hyeong-Seon, Deok-Seon, Soo-Jae, & Dong-Seok, 2011).

### **2.1.2.3. BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA**

Las BPM son una serie de herramientas y procedimientos importantes y obligatorios para las industrias, que permiten la obtención de productos de alta calidad e higiénicamente procesados para el consumo humano. En el Ecuador fueron constituidas como regulación de carácter obligatorio el 4 de Noviembre de 2002 en el decreto ejecutivo No. 3253 publicado en el registro oficial No. 696. Las empresas que implementan estas herramientas buscan reducir el riesgo físico, químico y biológico que se pueda presentar en cualquier etapa del proceso de producción de alimentos. Además, al implementar las BPM las industrias o empresas posicionan de mejor manera a su producto al ser considerado de alta calidad, garantiza al consumidor la inocuidad del alimento que está consumiendo y ayudan al diseño y funcionamiento del establecimiento (Medina, 2013).

### **2.1.2.4. ENSALADAS, VERDURAS Y HORTALIZAS**

Las verduras según el Decreto 2484/1967 del código alimentario español son un grupo de hortalizas, donde la parte comestible la constituyen sus órganos verdes como las hojas mientras que las hortalizas son plantas herbáceas listas para ser consumidas crudas o cocinadas (Gobierno de España, 2012). Las verduras y hortalizas son ricas en sales minerales y vitaminas como principal fuente de nutrición que actúan en el metabolismo intestinal del humano interviniendo en el desarrollo de la flora bacteriana intestinal (Pascual & Calderón, 1999). Las verduras y hortalizas poseen una variedad de microorganismos como flora bacteriana normal, la mayoría se encuentran principalmente en la superficie. Sin embargo, las verduras y hortalizas están expuestas a factores que pueden fácilmente contaminarlas con flora bacteriana como coliformes fecales que pueden ser causantes de diversas enfermedades gastrointestinales. Entre los factores que pueden contaminarlas están

el agua de riego, tierra, materia fecal, el aire y las personas que las cosechan en el caso de que sean portadoras asintomáticas de microorganismos patógenos. Luego de su cosecha los productos están nuevamente expuestos a otros factores como: utensilios, recipientes, máquinas y en general a la falta de higiene durante la preparación de productos como las ensaladas. Por ello, es necesario implementar las BPM dentro del proceso de elaboración de ensaladas para reducir considerablemente repercusiones en la salud del consumidor (Herrera & Torres, 2008).

#### **2.1.2.5. ENFERMEDADES BACTERIANAS DE ORIGEN ALIMENTARIO**

Este tipo de enfermedades son consideradas por la FAO (Food and Agricultural Organization) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) como una de las principales causas de la disminución de la productividad económica de los países y de mayor distribución en el mundo con respecto a otro tipo de enfermedades (Rodríguez, Rodríguez, Gamboa, & Arias, 2010).

Son ocasionadas por la presencia de bacterias patógenas que van a producir toxinas en los alimentos que no han pasado por un proceso de elaboración adecuado o en el caso de ensaladas de vegetales que no pasan por la etapa de cocción y dentro del organismo de la persona que las consuma representan una potencial fuente de infección. Se puede presentar dos tipos de enfermedades:

- Las infecciones alimentarias van a ser producidas por aquellas bacterias vivas que han logrado multiplicarse en una cantidad considerable en el alimento que han contaminado liberando sus toxinas y ocasionando daños en el tracto intestinal de la persona que las consuma.
- Las intoxicaciones alimentarias serán producidas por bacterias en este caso que no están vivas pero cuyas toxinas van a ser absorbidas en el tracto intestinal causando dicha enfermedad. (Pascual, 2005).

### **2.1.2.6. TIPOS DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES**

Dependiendo del tipo de microorganismo que se encuentre presente en cualquier clase de alimento se pueden presentar dos tipos de contaminantes como microorganismos patógenos y no patógenos:

Los microorganismos no patógenos son alteradores de la calidad de los alimentos entre los que se encuentran los mohos y levaduras los cuales producen daños visibles en el producto final, no causan intoxicaciones, pero incapacitan los alimentos para su consumo o disminuyen su vida comercial. Entre los principales cambios que se producen en los alimentos a causa de los microorganismos están el sabor, olor y textura, como resultado el producto final pierde su valor comercial y propiedades alimenticias llegando a ser una fuente de contaminación ya sea por excesiva carga o la presencia de sus toxinas (*Molecular Diagnostics Center, 2013*).

Los microorganismos patógenos entre los que se encuentran *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* no causan daños visibles en la calidad del alimento pero poseen la capacidad de producir toxinas preformadas que son termotolerantes y sobreviven aún después de la eliminación del microorganismo que la produjo (Gil, 2010).

Entre los microorganismos más frecuentemente aislados de verduras y hortalizas están: *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Bacillus*, *Salmonella*, *E. coli* y otras *Enterobacteriaceae* (Pascual & Calderón, *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*, 1999).

### **2.1.2.7. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETAs)**

Las enfermedades transmitidas por alimentos son producidas por alimentos o bebidas contaminadas con sustancias químicas o agentes patógenos como bacterias, virus y parásitos que pueden afectar a la salud individual o colectiva de las personas. Hasta la actualidad se conocen más de 250 enfermedades transmitidas por alimentos las cuales son ocasionadas principalmente por microorganismos y sus síntomas principales son la diarrea y el vómito. Estas enfermedades son producidas generalmente por la introducción de toxinas de microorganismos patógenos al tracto gastrointestinal lo que ocasiona la

generación de los síntomas gastrointestinales y enfermedades. Entre los principales microorganismos causantes de ETAs se encuentran *Campylobacter*, *Salmonella* y *Escherichia coli*.

Las ETAs se han convertido en un grave problema de salud pública debido a las nuevas formas de transmisión de microorganismos hacia los alimentos, la falta de buenas prácticas de higiene y manufactura, la resistencia bacteriana a los diferentes antimicrobianos y el control de la materia prima y producto terminado por parte de las industrias y establecimientos. Es necesario controlar cada etapa del proceso de producción de los alimentos para garantizar la inocuidad de los mismos y asegurar la salud del consumidor (Gonzalez & Rojas, 2005; CDC, 2009; OMS, 2015).

#### **2.1.2.8. MICROORGANISMOS INDICADORES EN ALIMENTOS**

Los microorganismos indicadores de alimentos son aquellos que poseen características similares a los patógenos pero que son rápida y fácilmente identificables, además de que su detección es económica. Luego de demostrar que los microorganismos indicadores están presentes se puede inferir que puede existir la presencia de microorganismos patógenos (Bello, 2000; Arcos, Ávila, Estupiñan, & Gómez, 2005). Así también, para conocer la calidad sanitaria de los alimentos y el tiempo de vida útil de un alimento se realiza un análisis microbiológico, basado en la presencia de microorganismos indicadores de contaminación. Los grupos indicadores revelan el tipo de bacteria que ha contaminado el alimento y cuál es el número aproximado de dicha bacteria (Bravo, 2004).

La presencia de microorganismos indicadores en alimentos denota una falta de higiene en alguna etapa del proceso de elaboración o una incorrecta manipulación del producto. Entre los principales grupos para alimentos sin ningún tipo de tratamiento térmico tenemos mesófilos aerobios, coliformes totales y mohos y levaduras (Fuentes, Campas, & Meza, 2005). Otros microorganismos indicadores de contaminación fecal en el alimento son los Coliformes fecales, Enterococos, *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* (Gómez, 2002).

#### **2.1.2.8.1. Mesófilos aerobios**

Los mesófilos aerobios son todas aquellas bacterias que crecen en cualquier tipo de ambiente a altas o bajas temperaturas en un rango de 25 – 40 °C y tienen la capacidad de desarrollarse en agar nutritivo. La presencia de este tipo de microorganismos indica contaminación en la materia prima, proceso inadecuado, falta de higiene, almacenamiento inadecuado y representa condiciones favorables para el desarrollo de patógenos. Este grupo de microorganismos es muy general y su detección tiene varias limitaciones al no poder relacionar altos contajes con microorganismos patógenos o sus toxinas, tampoco el origen de la contaminación y no diferencia el tipo de bacteria que se encuentra presente en el alimento (Pascual & Calderón, Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas, 1999).

#### **2.1.2.8.2. Coliformes totales**

Los coliformes totales son bacterias Gram negativas, aerobias o anaerobias facultativas fermentadoras de lactosa, que producen ácido y gas en 24-48 horas luego de su incubación. La presencia de coliformes totales sugiere principalmente una falta de higiene o recontaminación del alimento. Al realizar el análisis de este tipo de microorganismos se podría determinar la presencia de patógenos como *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* sp. (Larrea, Rojas, Álvarez, Rojas, & Heydrich, 2013).

#### **2.1.2.8.3. Mohos y levaduras**

Los mohos y levaduras son organismos eucarióticos, formadores de esporas, no fotosintetizadores, con reproducción sexual y asexual que abundan en lugares oscuros y húmedos. La presencia de este tipo de microorganismos indica que existió contaminación ambiental y el riesgo de toxicidad puede aumentar ya que existen varios tipos de hongos que pueden sintetizar metabolitos tóxicos y generar daño acumulativo (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2001).

#### **2.1.2.8.4. Coliformes fecales**

Los coliformes fecales son considerados coliformes termorresistentes ya que crecen a una alta temperatura 44 - 44,5°C y son productores de indol (Hernández, 2002). Este grupo constituye el mejor indicador de contaminación por materia fecal, donde la especie que predomina es *Escherichia coli* que es uno de los principales indicadores de contaminación fecal, sea humana o animal. Otros microorganismos dentro del grupo coliformes fecales son *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. y *Enterobacter* spp. La presencia de todos ellos en alimentos o agua está relacionada con contaminación por materia orgánica (Rodríguez, 2011).

#### **2.1.2.8.5. Enterococos**

Los enterococos son estreptococos de origen fecal y abundan en el tracto digestivo de humanos y animales de sangre caliente. Se encuentran en el suelo y en ambientes acuáticos contaminados ya que son altamente resistentes (Arcos et al., 2005; Rodríguez, 2011).

#### **2.1.2.8.6. *Clostridium perfringens***

*Clostridium perfringens*, una bacteria de origen fecal y no patógena para animales, se caracteriza por ser bacilos Gram positivos, anaerobios, formadores de esporas y está presente en la microflora intestinal de los animales de sangre caliente. Debido a que se caracteriza por la formación de esporas son resistentes a condiciones ambientales desfavorables para su crecimiento por lo que se encuentran en aguas y suelos contaminados (Arcos et al., 2005).

## CAPITULO III

### 3.1. MATERIALES Y METODOLOGÍA

El presente estudio fue de tipo descriptivo transversal y formó parte del proyecto, código K13101. Financiado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) realizado en el año 2014.

Para el presente estudio no existieron limitaciones, ya que se obtuvo el compromiso firmado de los responsables que administran las cuatro cafeterías que participaron en esta investigación (Ver Anexo 1: Formato documento de autorización de muestreos proyecto PUCE 2014), la cual contó con un presupuesto establecido para la adquisición del material necesario para el cumplimiento de los objetivos planteados.

#### 3.1.1 Fase de recolección de datos y creación de formularios:

Se realizó una visita programada con los responsables de cada cafetería para realizar un cronograma de muestreos (Ver Imagen 1) y obtener información acerca de los tipos de ensaladas que expendían en cada una, siendo importante el cumplimiento de los criterios de inclusión planteados para realizar la recolección y muestreo:

Criterio de inclusión - Ensaladas: se seleccionó las ensaladas que cumplieran con los requisitos previamente planteados como fueron, aquellas que tienen ingredientes sin tratamiento térmico y/o con algún ingrediente sometido a tratamiento térmico.

**Imagen 1: Cronograma de muestreo**

Ensaladas			
PAP: 1	ENSALADAS	RESPONSABLE	Fecha de muestreo y siembra
	E(10)	R1	23/09/2014
PAP: 2	ENSALADAS	RESPONSABLE	Fecha de muestreo y siembra
	E(7)	R2	11/11/2014
PAP: 3	ENSALADAS	RESPONSABLE	Fecha de muestreo y siembra
	E(2)	R3	11/11/2014
PAP: 4	ENSALADAS	RESPONSABLE	Fecha de muestreo y siembra
	E(2)	R4	11/11/2014

Elaborado: por D. Bonifaz

### 3.1.2. Materiales de la fase de muestreo

Para la fase de muestreo se utilizó fundas ziploc para trasladar las ensaladas que no poseían contenedores propios al laboratorio. Para su recolección fueron utilizadas las pinzas que los encargados manejaban para servir las a los consumidores, las mismas que fueron previamente desinfectadas con alcohol al 70% (Ver Imagen 2).

**Imagen 2: Materiales fase de muestreo**



Tomadas por V. Jara

### 3.1.3. Materiales de la fase de laboratorio

En esta fase fueron utilizados envases para toma de orina estériles, cronómetros, micro pipeta de 1000 uL calibrada, cronómetro, pipetas serológicas de 5 ml y 10 ml estériles, puntas desechables, tubos de 15 ml, agua peptonada 0,1% (Ver Anexo 2 y Anexo 3). Además para la siembra se utilizaron placas petrifilm para *E. coli*/Coliformes (Ver Anexo 4), Mohos y Levaduras (Ver Anexo 5) y Mesófilos Aerobios (Ver Anexo 6) (Ver Imagen 3).

**Imagen 3: Materiales fase de laboratorio**



Tomadas por D. Bonifaz

### **3.1.4. Equipos de laboratorio**

Los equipos de laboratorio utilizados fueron: incubadora Memmert (CB PUCE: 02162337), refrigeradora Ecasa (CB PUCE: 02250573), autoclave, mechero (CB PUCE: 021228239), balanza analítica calibrada y licuadora.

## **3.2. MARCO METODOLÓGICO**

Siguiendo el orden establecido para la realización de los ensayos microbiológicos, se detalla a continuación cada uno de los pasos realizados:

### **3.2.1. Muestreo, recolección y transporte de las muestras**

Las muestras de ensaladas listas para el consumo, fueron recolectadas de las 4 cafeterías de forma intencional, es decir se muestrearon las ensaladas que cumplieron con el criterio establecido.

Las cafeterías fueron codificadas como PAP 1, PAP 2, PAP 3, PAP 4, el número de muestras de cada cafetería fue de 10, 7, 2 y 2 respectivamente, las cuales se encuentran detalladas en la Tabla 1: codificación e ingredientes de ensaladas.

Para el muestreo se tomaron las respectivas protecciones para evitar la contaminación cruzada, en cuanto a los utensilios de recolección fueron desinfectados con alcohol al 70%, en este caso las pinzas propias del lugar las que se encontraban en un recipiente recolector junto a la ensalada, este proceso se realizó previamente para cada toma de muestra. En cuanto al operador utilizó equipos de protección individual (EPIs) (Ver Imagen 4).

**Imagen 4: EPIs**



Tomado por V. Jara

Para el análisis se recolectó alrededor de 20 a 30 g de ensalada, directamente del contenedor donde son servidas (Ver Imagen 5). Las muestras fueron recogidas en fundas ziploc para su inmediato análisis en el laboratorio. Por otro lado, otras ensaladas venían servidas en su propio contenedor; en ese caso, se llevó la ensalada en el mismo recipiente (Ver Imagen 6). Las muestras fueron transportadas inmediatamente en canastillas a temperatura ambiente para su análisis en el laboratorio 107 del edificio de Microbiología de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE).

**Imagen 5: Recolección ensalada**



**Imagen 6: Recipiente con ensalada**



Tomadas por D. Bonifaz

**Tabla 1. : Codificación e ingredientes de ensaladas** (Elaborado por D. Bonifaz)

Cafetería	Codificación	Ensalada-Ingredientes
<b>PAP 1</b>	E1	Lechuga
	E2	Coliflor, Brócoli
	E3	Apio, Piña, Choclo, Perejil
	E4	Cebolla, Zanahoria, Brócoli, Coliflor, Perejil
	E5	Aguacate, Pimiento rojo, Perejil, Cebolla blanca
	E6	Lechuga, Tomate riñón, Pimiento rojo, Perejil
	E7	Papa, Perejil, Arveja, Zanahoria, Mayonesa
	E8	Vainitas, Zanahoria, Perejil
	E9	Cebolla perla, Lechuga, Pimiento rojo, Pimiento verde, Tomate riñón
	E10	Chochos, Rábano, Perejil
<b>PAP 2</b>	E1	GARNIER: Pollo asado, apio, zanahoria, lechuga, aguacate, tomate riñón, cebolla paiteña, champiñones, maíz dulce, pepinillo
	E2	CAPRESE: Pan de ajo, queso mozzarella, lechuga, tomate riñón, albahaca, aceite de oliva
	E3	PACÍFICO: Atún, pasta, lechuga, tomate riñón, cebolla.
	E4	GARIBALDI: Pasta al pesto, pollo salteado, lechuga, tomate riñón
	E5	No hay datos
	E6	MEXICANA: rayitos de carne y pollo, fréjol, guacamoles, tortillas de maíz, tomate, cebolla, lechuga, pimienta verde.
	E7	VEGETARIANA: lechuga, apio, tomate, cebolla, champiñones, pepinillo, zanahoria, maíz dulce.
	E8	MARRAKECH: Tomate cherry, apio, queso mozzarella, queso holandés, limón, albahaca, espinaca.
<b>PAP 3</b>	E1	Chochos, pepinillo, tomate riñón.
	E2	Jamón, salami, lechuga, rábano, tomate riñón, pepinillo.
<b>PAP 4</b>	E1	Fideo, brócoli, zanahoria, arveja, pollo, apio.
	E2	Chochos, pepinillo, tomate riñón, brócoli.

### **3.3. CONTROLES**

Se llevó registro del control de la temperatura de la refrigeradora y de la incubadora (Ver Anexo 7) para evitar resultados erróneos. Además se realizó controles microbiológicos del agua de plata y del agua peptonada por lote de muestras de cada cafetería.

#### **3.3.1. Control de calidad del agua de plata**

Las diferentes concentraciones de agua de plata fueron provistas por la empresa Argentum la cual posee el equipo para su preparación (Ver Anexo 8). Para el control del agua de plata se sembró 1 mL de las concentraciones 4 ppm y 10 ppm en cada una de las placas Petrifilm para los diferentes tipos indicadores de contaminación mesófilos aerobios, mohos y levaduras y *E. coli*/coliformes.

La siembra se realizó según las recomendaciones de uso descritas por el fabricante para mesófilos aerobios (3M Petrifilm, 2004) (Ver Anexo 9), mohos y levaduras (3M Petrifilm, 2004) (Ver Anexo 10) y *E. coli*/coliformes (3M Petrifilm, 2006) (Ver Anexo 11). Las placas fueron incubadas de acuerdo a los requerimientos de temperatura y tiempos de incubación de cada microorganismo. Para mesófilos aerobios se recomienda un tiempo de incubación de 48 horas (+/- 3h) a una temperatura de 35 °C (+/- 1°C), para *E. coli*/Coliformes un tiempo de 24 horas (+/- 2h) a 35 °C (+/- 1°C) y mohos y levaduras por un tiempo de 3 a 5 días a 25 °C (+/- 1°C) basados en los métodos oficiales 990.12, 991.14 y 997.02 respectivamente, validados por la AOAC (*Association of Analytical Communities*) (3M Petrifilm, 2014) (Ver Anexo 12).

#### **3.3.2. Control de calidad del agua peptonada**

Para realizar el control de calidad del agua peptonada se procedió a sembrar 1 mL en la placa Petrifilm para cada indicador de contaminación; mesófilos aerobios, mohos y levaduras y *E. coli*/Coliformes. Cada placa fue incubada en base al procedimiento mencionado anteriormente en el punto 3.1.3.1 para el control de calidad del agua de plata.

### **3.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

#### **3.4.1. Análisis de la carga microbiana**

Las muestras recolectadas fueron trituradas en una licuadora por un corto tiempo y a una velocidad moderada para evitar injuria bacteriana, una vez triturada se pesó 10 g y se realizó una dilución en agua peptonada 0,1 %. De la dilución inicial se tomó 1ml y se sembró en las placas Petrifilm para mesófilos aerobios, mohos y levaduras y coliformes totales según las recomendaciones de uso descritas por el fabricante. Las placas fueron incubadas de acuerdo a los requerimientos de temperatura y tiempos de incubación de cada microorganismo en base al procedimiento mencionado anteriormente en el punto 3.1.3.1.

### **3.5. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

#### **3.5.1. Análisis de la concentración de agua de plata**

Para el análisis de la concentración se utilizó dos diferentes concentraciones de agua de plata 4 ppm y 10 ppm, para lo cual, se tomó 5 mL de la dilución de la muestra y se agregó 5 mL del agua de plata a una concentración de 4 ppm. El mismo procedimiento se realizó con la concentración de 10 ppm de agua de plata. Posteriormente, se sembró en las placas Petrifilm para el análisis de los microorganismos indicadores de contaminación en base al procedimiento mencionado anteriormente en el punto 3.1.3.1.

#### **3.5.2. Análisis de los tiempos de contacto**

Para el análisis de los tiempos de contacto; primero, se analizó la muestra con el agua de plata de 4 ppm. Desde el momento de contacto entre las soluciones se tomó el tiempo mediante el uso de un cronómetro. Al primer minuto se realizó la primera siembra y transcurridos cinco minutos se realizó la segunda siembra. El mismo procedimiento se realizó utilizando la concentración de 10 ppm.

### **3.6. MANEJO DE DESECHOS**

Todo el material que fue utilizado se desechó en fundas rojas y una persona contratada para este trabajo fue la encargada de su manejo semanalmente. Antes de desechar la funda se

llenó un formulario con la firma de mi persona y la responsable de la actividad, además de otros datos que se encuentran en el formulario de manejo de desechos (Ver Anexo 13).

### **3.7. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

Una vez finalizado el período de incubación se procedió a leer los resultados, para lo cual se cuantificó el número de microorganismos (carga microbiana) según las características de los mismos de acuerdo a las guías de cada grupo adjuntas en los materiales de la fase de laboratorio (3M Petrifilm, 2004). Para el resultado se reportó las unidades formadoras de colonias (UFCs) cuantificadas tanto en la muestra pura como para las muestras con la aplicación del agua de plata los cuales fueron reportados en una matriz de datos obtenidos (Ver Anexo 14). Ejemplos de las placas se pueden observar en el Anexo 16: Imágenes recuento final placas Petrifilm. Además el procedimiento de análisis completo se puede ver en el Anexo 15: Procedimiento de Análisis.

### **3.8. ANÁLISIS DE RESULTADOS**

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de la carga microbiana inicial de cada indicador de contaminación en el total de las ensaladas muestreadas independientemente de la cafetería que haya sido muestreada.

Para el análisis de la actividad antimicrobiana de los factores o efectos concentración y tiempo de contacto se realizó un diseño de experimentos multifactorial, de esta manera se conoció si cada uno de los factores nombrados o la combinación de ellos son estadísticamente significativos mediante el modelo estadístico lineal (1). Para ello se creó una tabla ANOVA (Análisis de Varianza) que nos ayudó a determinar la significancia estadística de los efectos o factores.

$$y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

Con el propósito de establecer la diferencia estadísticamente significativa se aplicó un nivel de confianza del 95% (0,05), es decir los efectos con valores menores a 0,05 son estadísticamente significativos.

## CAPITULO IV

### 4.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del estudio fueron analizados de manera global, es decir, se analizó la carga inicial y el efecto del agua de plata sobre cada uno de los microorganismos indicadores de contaminación en la totalidad de las ensaladas, independientemente de la cafetería en la que se haya tomado la muestra, de esta manera se conocerá si hubo o no disminución de la carga microbiana inicial en la matriz en estudio.

#### 4.1.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DESCRIPTIVO DE LA CARGA MICROBIANA INICIAL DE LA MATRIZ EN ESTUDIO

**Tabla 2. Resultados obtenidos antes del tratamiento con agua de plata**

Ensaladas				
MA (UFC)	CT (UFC)	EC (UFC)	L (UFC)	M (Propágulos)
90000	58	0	7	0
142	0	0	510	12
90000	320	0	41	0
14	0	0	600	0
940	3400	1	660	0
90000	90000	0	780	6
900	42	1	127	0
920	75	0	240	5
1020	460	0	480	9
1520	102	0	420	10
560	93	3	930	0
600	116	2	134	10
90000	147	26	11000	4
90000	103	0	90000	4
90000	90000	0	90000	3
90000	5800	0	130	8
90000	35	0	90000	15
90000	15	0	116	2
90000	330	0	99	11
90000	6600	0	3900	13
90000	68	0	35	0

MA: Mesófilos Aerobios  
 CT: Coliformes Totales  
 EC: *Escherichia coli*  
 L: Levaduras  
 M: Mohos  
 UFC: unidades formadoras de colonias

Elaborado por D. Bonifaz

En la tabla 2 se pueden observar los resultados obtenidos después de realizar el ensayo de análisis de la carga microbiana inicial de cada uno de los microorganismos indicadores de alimentos en las 21 ensaladas muestreadas de las cuatro cafeterías.

En las columnas de mesófilos aerobios, levaduras y coliformes totales se puede observar que la carga microbiana inicial es alta y la mayoría de muestras fueron denominadas como MNPC (muy numeroso para contar) siendo representadas por la cifra 90 000, la cual representa la cantidad más alta entre las cuatro cafeterías y fue determinada para poder realizar la estadística.

En las columnas de *E. coli* y mohos la carga microbiana es baja, lo que indica que existe una desinfección y un apropiado almacenamiento de los ingredientes que forman parte de las ensaladas muestreadas.

A continuación se realizó un análisis estadístico descriptivo individual de la carga inicial de cada uno de los microorganismos indicadores:

#### 4.1.1.1. Mesófilos Aerobios

**Tabla 3. Resumen Estadístico para MA**

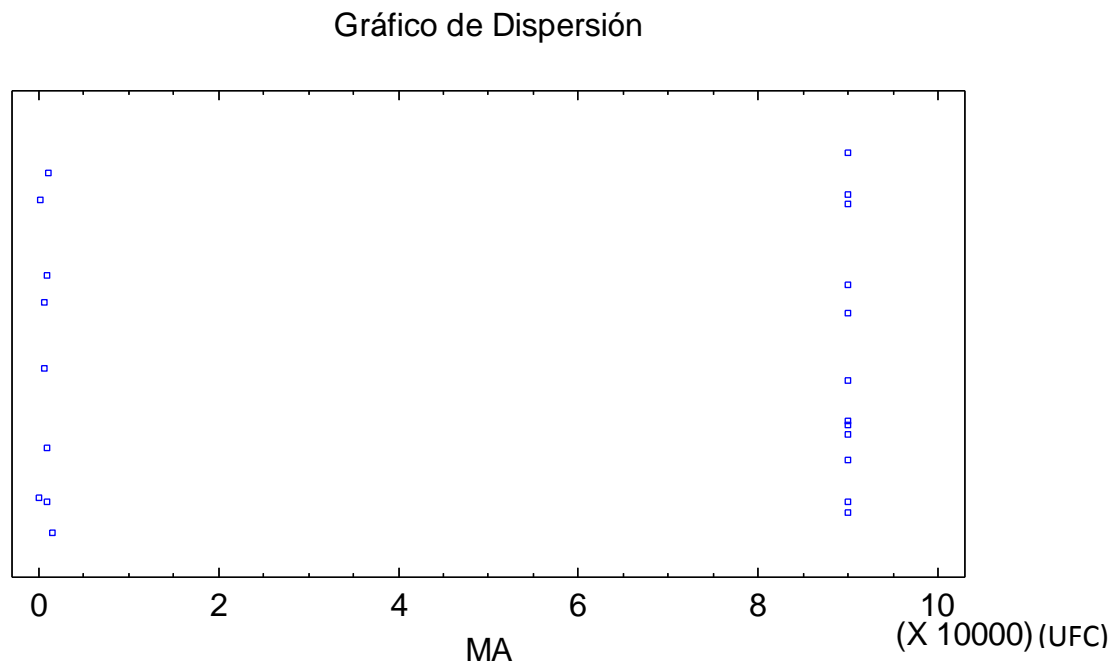
Recuentos	21 ensaladas
Promedio	51744
Mediana	90000.0
Varianza	2.04906E9
Desviación Estándar	45266.5
Mínimo	14.0
Máximo	90000.0
Rango	89986.0

Para mesófilos aerobios se tienen 21 datos con los cuales se obtiene un promedio de 51744 UFC/g y notamos una varianza de 2,04E9. Al realizar el recuento de este tipo de microorganismo indicador se obtuvo cifras con un intervalo entre 14 – 90 000, cabe recalcar que la cifra 90 000 se debe a que para la estadística se tomó a la cantidad más alta para representar a las placas donde no se podía realizar el recuento por la elevada carga microbiana y fueron denominadas MNPC (muy numeroso para contar), independientemente de la cafetería muestreada.

Según el Real Decreto 3484/2000 BOE 12/1/2001 (Moragas & De Pablo, 2015) para comidas preparadas sin tratamiento térmico y comidas preparadas con tratamiento térmico, que lleven ingredientes no sometidos a tratamiento térmico, el rango de mesófilos aerobios recomendable para este tipo de alimentos es de  $m= 10^5$  y  $M= 10^6$  siendo el límite de 0 - m la clase aceptable, los límites entre m y M mediamente aceptable y valores mayores a M rechazable, los resultados obtenidos para las ensaladas en este tipo de microorganismo indicador es aceptable por lo que se encuentra entre 0 y m siendo el valor  $5 \times 10^4$  UFC/g, lo que indica que el tratamiento de desinfección de las verduras y hortalizas es correcto pero se debería intensificar el tratamiento para reducir la carga microbiana ya que la mayoría de las ensaladas fueron MNPC.

En el siguiente gráfico de dispersión podemos observar la distribución y el intervalo de los datos obtenidos en el ensayo:

**Gráfico 1: Dispersión de datos para MA**



#### 4.1.1.2. Coliformes Totales

**Tabla 4. Resumen Estadístico para CT**

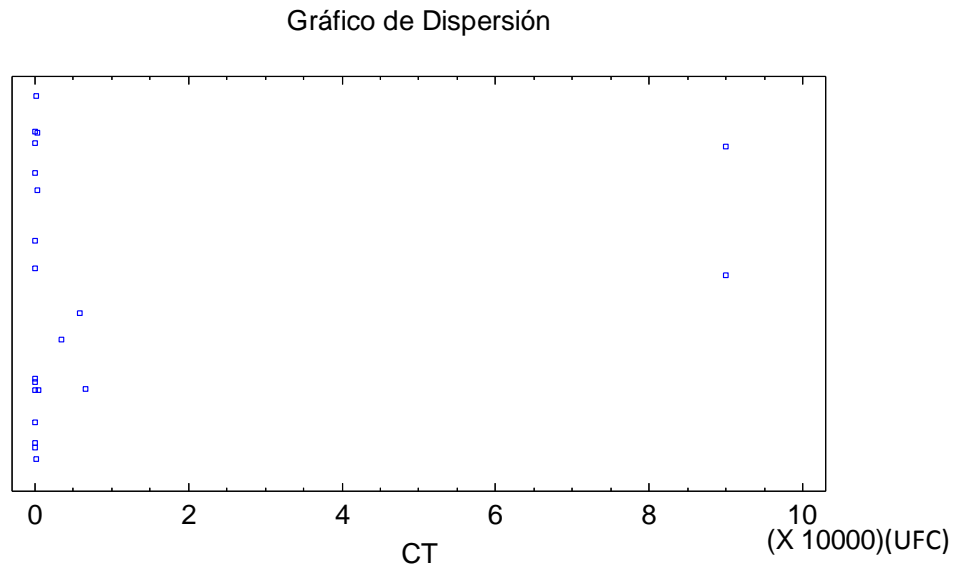
Recuentos	21 ensaladas
Promedio	9417.33
Mediana	103.0
Varianza	7.21343E8
Desviación Estándar	26857.8
Mínimo	0.0
Máximo	90000.0
Rango	90000.0

Para coliformes totales se tiene 21 datos con los cuales se obtiene un promedio de 9417,33 UFC/g y notamos una varianza de 7,21E8. Al realizar el recuento de este tipo de microorganismo indicador se obtuvo cifras con un intervalo entre 0 – 90 000, cabe recalcar que la cifra 90 000 se debe a que para la estadística se tomó a la cantidad más alta entre las cuatro cafeterías, para representar a las placas donde no se podía realizar el recuento por la elevada carga microbiana y fueron denominadas MNPC (muy numeroso para contar), independientemente de la cafetería muestreada.

Según el Real Decreto 3484/2000 BOE 12/1/2001 (Moragas & De Pablo, 2015) para comidas preparadas sin tratamiento térmico y comidas preparadas con tratamiento térmico, que lleven ingredientes no sometidos a tratamiento térmico, el rango para coliformes totales que es recomendable para este tipo de alimentos es de  $m= 10^3$  y  $M= 10^4$  siendo el límite de 0 a  $m$  la clase aceptable, los límites entre  $m$  y  $M$  medianamente aceptable y valores mayores a  $M$  rechazable. Los resultados obtenidos para las ensaladas en este tipo de microorganismo indicador es medianamente aceptable por lo que se encuentra entre  $m$  y  $M$  siendo el valor  $9 \times 10^3$  UFC/g, lo que indica que se requiere un mayor tratamiento de desinfección en las mismas para reducir este valor y que sea considerado como aceptable.

En el siguiente gráfico de dispersión podemos observar la distribución y el intervalo de los datos obtenidos en el ensayo:

## Gráfico 2: Dispersión de datos para CT



### 4.1.1.3. *Escherichia coli*

Tabla 5. Resumen Estadístico para EC

Recuentos	21 ensaladas
Promedio	1.57143
Mediana	0.0
Varianza	31.9571
Desviación Estándar	5.65306
Mínimo	0.0
Máximo	26.0
Rango	26.0

Para *Escherichia coli* se tiene 21 datos con los cuales se obtiene un promedio de 1,57 UFC/g y notamos una varianza de 31,9571. Al realizar el recuento de este tipo de microorganismo indicador se obtuvo cifras con un intervalo entre 0 – 26.

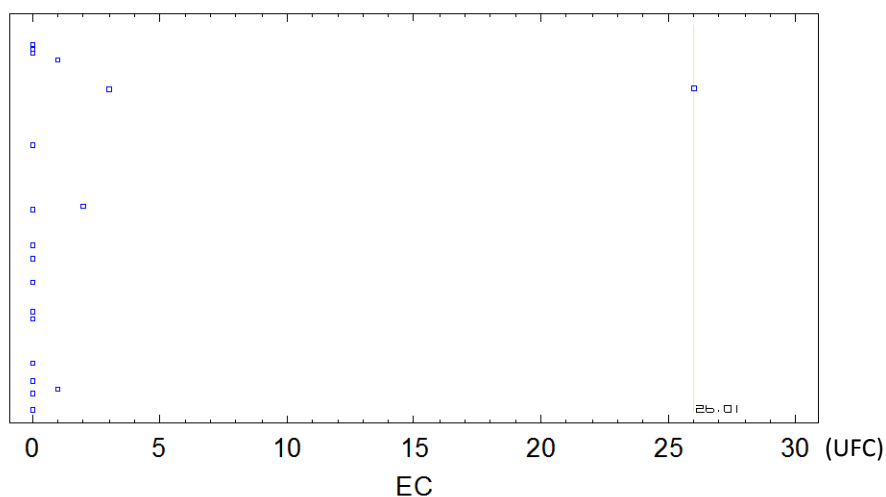
Según el Real Decreto 3484/2000 BOE 12/1/2001 (Moragas & De Pablo, 2015) para comidas preparadas sin tratamiento térmico y comidas preparadas con tratamiento térmico, que lleven ingredientes no sometidos a tratamiento térmico, el rango para *Escherichia coli* que es recomendable para este tipo de alimentos es de  $m= 10$  y  $M= 10^2$  siendo el límite de 0 a  $m$  la clase aceptable, los límites entre  $m$  y  $M$  mediamente aceptable y valores mayores a

M rechazable. Los resultados obtenidos para las ensaladas en este tipo de microorganismo indicador es aceptable por lo que se encuentra entre 0 y m siendo el valor 1,57 UFC/g, lo que indica que el tratamiento de desinfección de las verduras y hortalizas es correcto.

Cabe resaltar que una de las ensaladas poseía una carga de *E. coli* por encima de m por lo que se debe tener mayor atención en el control de calidad de los ingredientes que son parte de la misma.

En el siguiente gráfico de dispersión podemos observar la distribución y el intervalo de los datos obtenidos en el ensayo:

**Gráfico 3: Dispersión de datos para EC**



#### 4.1.1.4. Levaduras

**Tabla 6. Resumen Estadístico para L**

Recuentos	21 ensaladas
Promedio	13819.5
Mediana	480.0
Varianza	1.02144E9
Desviación Estándar	31959.9
Mínimo	7.0
Máximo	90000.0
Rango	89993.0

Para levaduras se tiene 21 datos con los cuales se obtiene un promedio de 13820 UFC/g y notamos una varianza de 1,02E9. Al realizar el recuento de este tipo de microorganismo



#### 4.1.1.5. Mohos

**Tabla 7. Resumen Estadístico para M**

Recuentos	21 ensaladas
Promedio	5.33333
Mediana	4.0
Varianza	25.6333
Desviación Estándar	5.06294
Mínimo	0.0
Máximo	15.0
Rango	15.0

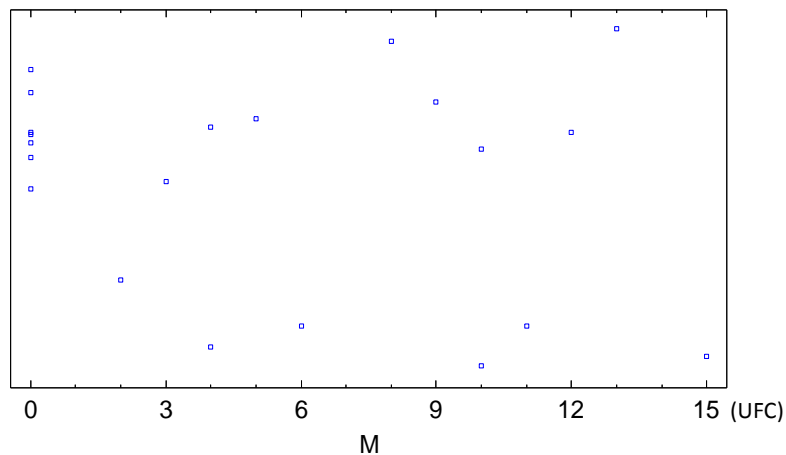
Para Mohos se tiene 21 datos con los cuales se obtiene un promedio de 5 propágulos/g y notamos una varianza de 25,63. Al realizar el recuento de este tipo de microorganismo indicador se obtuvo cifras con un intervalo entre 0 – 15.

Según Rosario Pascual “Microbiología Alimentaria” (1992) (Moragas & De Pablo, 2015) para verduras y hortalizas, el rango para mohos que es recomendable para este tipo de alimentos es de  $m= 10$  y  $M= 10^4$  siendo el límite de 0 a  $m$  la clase aceptable, los límites entre  $m$  y  $M$  mediamente aceptable y valores mayores a  $M$  rechazable, los resultados obtenidos para las ensaladas en este tipo de microorganismo indicador es aceptable por lo que se encuentra entre 0 y  $m$  siendo el valor 5 propágulos/g lo que indica que el tratamiento de desinfección de las verduras y hortalizas es correcto.

En el siguiente gráfico de dispersión podemos observar la distribución y el intervalo de los datos obtenidos en el ensayo:

**Gráfico 5: Dispersión de datos para M**

Gráfico de Dispersión



#### 4.1.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EFECTO DEL AGUA DE PLATA EN LOS DIFERENTES MICROORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINACIÓN

Para el análisis estadístico del efecto de los factores concentración del agua de plata, tiempo de contacto y la interacción entre ambos se basó en el resultado obtenido en el valor-p de la tabla de ANOVA con la que se logró conocer si el resultado obtenido fue o no significativo.

Estadísticamente en todos los microorganismos indicadores de contaminación los efectos individuales como combinados no fueron significativos, sin embargo desde el punto de vista de nuestro interés el microbiológico se pudo determinar cual concentración y tiempo de contacto logró disminuir al mínimo la carga microbiana, es decir tuvo mayor efecto bactericida frente a cada microorganismo.

##### 4.1.2.1. Mesófilos Aerobios

**Tabla 8. Análisis de Varianza para MA**

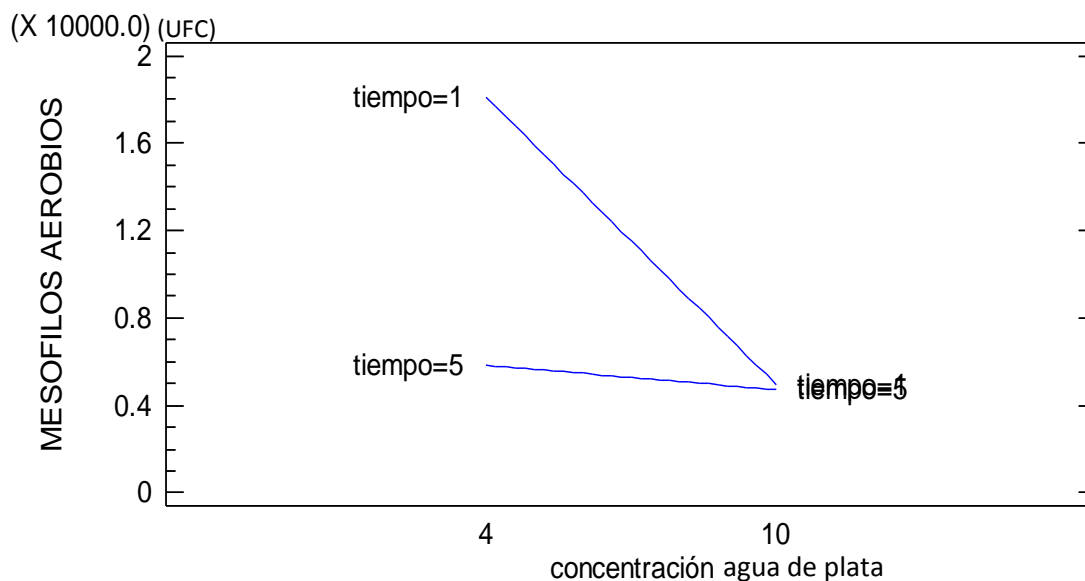
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:concentración	1.06364E9	1	1.06364E9	1.76	0.1885
B:tiempo	8.19888E8	1	8.19888E8	1.36	0.2477
AB	7.57128E8	1	7.57128E8	1.25	0.2665
Error total	4.83751E10	80	6.04689E8		
Total (corr.)	5.10157E10	83			

Gl: grados de libertad

En este caso ningún efecto fue significativo debido a que los valores-p de A, B y AB obtenidos son superiores a 0,05 según el nivel de confianza del 95%.

A continuación se realizó un gráfico de interacción de los factores en el que se puede observar el efecto que tuvo cada concentración según el tiempo de contacto frente a la carga microbiana de mesófilos aerobios presente en la matriz:

**Gráfico 6: Gráfico de interacción entre factores para MA**



(Tiempo 1 y 5 superpuestos)

La mejor combinación de factores para reducir la carga microbiana de mesófilos aerobios es utilizando una concentración de 10 ppm y un tiempo de contacto de 5 minutos.

La razón para utilizar la máxima concentración y tiempo de contacto se debe a que dentro de este grupo de microorganismos se encuentran bacterias, mohos y levaduras por lo que existe una alta carga microbiana impidiendo que los iones de plata afecten la estructura de las células y por ende reducir la cantidad de microorganismos. A pesar de ello la carga microbiana inicial fue reducida al mínimo cumpliendo de esta manera el objetivo planteado.

#### 4.1.2.2. Coliformes Totales

**Tabla 9. Análisis de Varianza para CT**

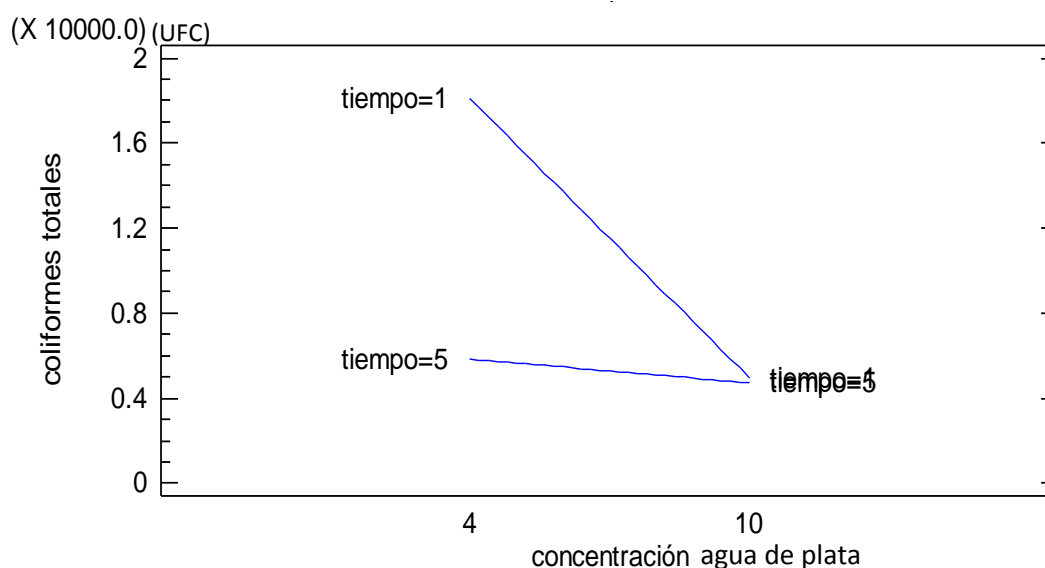
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:concentración	1.06364E9	1	1.06364E9	1.76	0.1885
B:tiempo	8.19888E8	1	8.19888E8	1.36	0.2477
AB	7.57128E8	1	7.57128E8	1.25	0.2665
Error total	4.83751E10	80	6.04689E8		
Total (corr.)	5.10157E10	83			

Gl: grados de libertad

Luego de realizar el análisis de varianza ningún efecto fue significativo debido a que los valores-p de A, B y AB obtenidos son superiores a 0,05 según el nivel de confianza del 95%.

A continuación se realizó un gráfico de interacción de los factores en el que podemos observar el efecto que tuvo cada concentración según el tiempo de contacto frente a la carga microbiana de coliformes totales presente en la matriz:

**Gráfico 7: Gráfico de interacción entre factores para CT**



(Tiempo 1 y 5 superpuestos)

La mejor combinación de factores para reducir la elevada carga microbiana de coliformes totales presente en las ensaladas muestreadas se logró utilizando una concentración de 10 ppm y un tiempo de contacto de 5 minutos. Siendo este un grupo de microorganismos más pequeño que el de mesófilos aerobios se observó una disminución considerable de la carga microbiana inicial, esto debido a que este grupo indicador abarca a microorganismos Gram negativos y los iones de plata que presentan cargas positivas van a formar enlaces ocasionando un debilitamiento de la membrana, permitiendo el ingreso de estos iones a la célula y nuevamente formando enlaces con las proteínas y enzimas interrumpiendo el correcto funcionamiento de la misma. Por lo tanto, el efecto microbicida del agua de plata es considerable y utilizando una mayor concentración o tiempo de contacto se lograría una disminución mayor o total.

#### 4.1.2.3. *Escherichia coli*

**Tabla 10. Análisis de Varianza para EC**

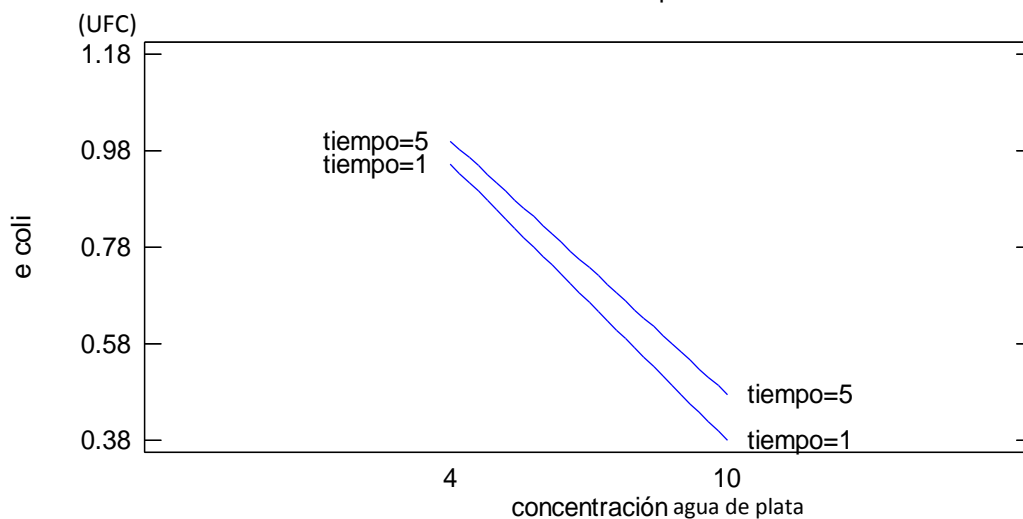
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:concentración	1.32031	1	1.32031	2.57	0.1113
B:tiempo	0.195313	1	0.195313	0.38	0.5385
AB	0.0703125	1	0.0703125	0.14	0.7119
Error total	63.6563	124	0.513357		
Total (corr.)	65.2422	127			

Gl: grados de libertad

El análisis de varianza nos indica que ningún efecto fue significativo debido a que los valores-p de A, B y AB obtenidos son superiores a 0,05 según el nivel de confianza del 95%.

A continuación se realizó un gráfico de interacción de los factores en el que podemos observar el efecto que tuvo cada concentración según el tiempo de contacto frente a la carga microbiana de *Escherichia coli* presente en la matriz:

**Gráfico 8: Gráfico de interacción entre factores para EC**



La mejor combinación de factores para reducir la carga microbiana de *E. coli* se logró utilizando una concentración de 10 ppm y un tiempo de contacto de 1 minuto. Debido a que este es un género específico indicador de contaminación y la carga microbiana es mínima, es necesario utilizar la mayor concentración y el menor tiempo de contacto para reducir

considerablemente la población presente en las ensaladas que luego de realizar el ensayo mostraron recuentos de *E. coli*. El efecto de los iones de plata es el mismo producido con los coliformes totales siendo *E. coli* uno de los microorganismos perteneciente a este grupo indicador.

#### 4.1.2.4. Levaduras

**Tabla 11. Análisis de Varianza para L**

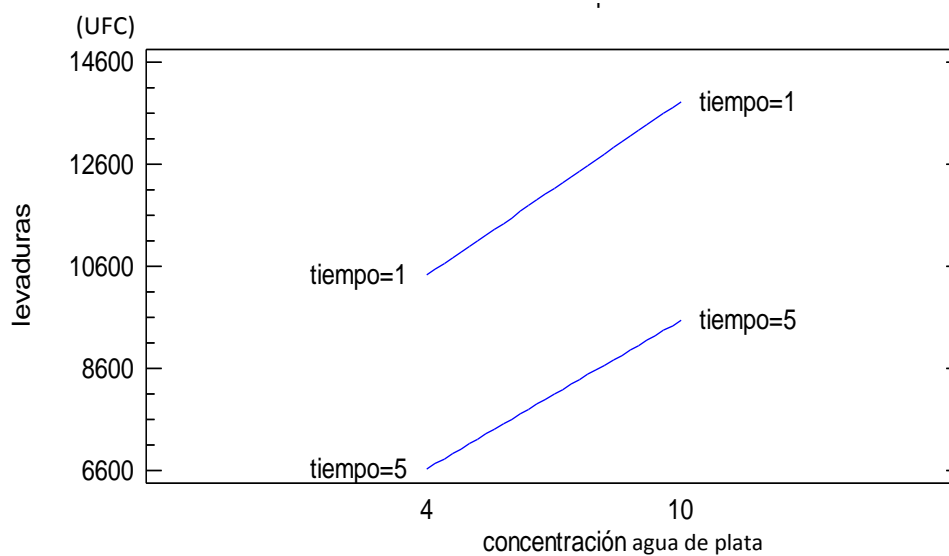
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:concentración	2.07844E8	1	2.07844E8	0.31	0.5784
B:tiempo	3.40068E8	1	3.40068E8	0.51	0.4775
AB	1.34065E6	1	1.34065E6	0.00	0.9644
Error total	5.34123E10	80	6.67654E8		
Total (corr.)	5.39616E10	83			

Gl: grados de libertad

El análisis de varianza nos indica que ningún efecto fue significativo debido a que los valores-p de A, B y AB obtenidos son superiores a 0,05 según el nivel de confianza del 95%.

A continuación se realizó un gráfico de interacción de los factores en el que podemos observar el efecto que tuvo cada concentración según el tiempo de contacto frente a la carga microbiana de levaduras presente en la matriz:

**Gráfico 9: Gráfico de interacción entre factores para L**



La mejor combinación de factores para reducir la carga microbiana de levaduras presente en las ensaladas muestreadas se logró utilizando una concentración de 4 ppm y un tiempo de contacto de 5 minutos. En este caso la carga de levaduras presentes en cuatro de las muestras específicamente fue muy elevada, por ello la concentración y el tiempo de contacto no fueron suficientes para reducir al mínimo dicha cantidad, en cambio se pudo observar que la carga incrementa a medida que pasa el tiempo inhibiendo el poder microbicida del agua de plata. Estudios indican que según la edad y tipo de levaduras su pared celular suele ser más gruesa. La pared celular está constituida principalmente de glicoproteínas y polisacáridos muy similares a las bacterias Gram positivas, actúa como una barrera que limita la entrada de moléculas del entorno externo, por otro lado esta estructura permite al microorganismo adaptarse a cualquier condición de estrés ambiental manteniendo de esta manera su integridad (Morales, 2007). Estas características según (Siddhartha et al., 2007) son el mayor mecanismo de defensa de las bacterias Gram positivas, levaduras y mohos las cuales presentan mayor resistencia a la acción microbicida comparadas con las bacterias Gram negativas las cuales después de realizar el estudio fueron más propensas frente a las partículas de plata.

#### 4.1.2.5. Mohos

**Tabla 12. Análisis de Varianza para M**

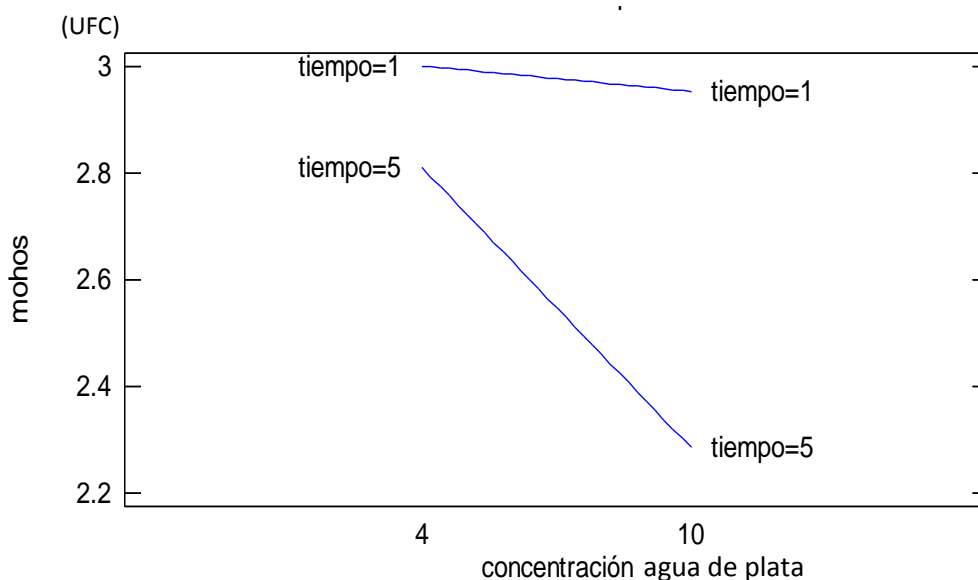
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:concentración	1.71429	1	1.71429	0.17	0.6815
B:tiempo	3.85714	1	3.85714	0.38	0.5385
AB	1.19048	1	1.19048	0.12	0.7323
Error total	808.476	80	10.106		
Total (corr.)	815.238	83			

Gl: grados de libertad

El análisis de varianza nos indica que ningún efecto fue significativo debido a que los valores-p de A, B y AB obtenidos son superiores a 0,05 según el nivel de confianza del 95%.

A continuación se realizó un gráfico de interacción de los factores en el que podemos observar el efecto que tuvo cada concentración según el tiempo de contacto frente a la carga microbiana de mohos presente en la matriz:

**Gráfico 10: Gráfico de interacción entre factores para M**



Debido a la baja carga de mohos presente en las ensaladas muestreadas la mejor combinación de factores para inhibir su desarrollo se logra utilizando una concentración de 10 ppm y un tiempo de contacto de 5 minutos, siendo las más altas debido a la estructura de estos microorganismos los cuales poseen una pared celular más gruesa diferente a la de las bacterias, impidiendo de esta manera que los iones de plata ingresen y afecten su mecanismo de desarrollo y permeabilidad, sin embargo la carga inicial presente en las muestras fue reducida luego del contacto con el agua de plata, comprobando que actúa frente a un amplio espectro de microorganismos.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

- Al finalizar el estudio se puede concluir que el agua de plata al entrar en contacto con la matriz ensalada tiene efecto bactericida frente a los microorganismos que se encuentran en ella por lo que la carga microbiana se reduce a valores inferiores a  $m$  siendo aceptables para el consumo humano según el Real Decreto 3484/2000 BOE 12/1/2001, para comidas preparadas sin tratamiento térmico y comidas preparadas con tratamiento térmico, que lleven ingredientes no sometidos a tratamiento térmico.
- En el caso de los mesófilos aerobios cuya presencia en la matriz estudiada fue considerable al entrar en contacto con el agua de plata la carga microbiana se reduce a valores inferiores a  $m = 10^5$  siendo aceptables para el consumo humano según el Real Decreto 3484/2000 BOE 12/1/2001, donde la mayor concentración (10 ppm) y el mayor tiempo de contacto (5 minutos) fueron los factores más eficaces para ese objetivo.
- En cuanto a los coliformes totales una de las principales características de este grupo de microorganismos es que son Gram negativos por lo que su estructura es más propensa a la acción del agua de plata, la presencia de lipopolisacáridos les confiere cargas negativas y permiten que la carga positiva de los iones de plata formen una atracción electrostática debilitando su membrana externa, interrumpiendo su desarrollo y por ende disminuyó la carga microbiana presente en las ensaladas hasta valores inferiores a  $m = 10^3$  siendo aceptables para el consumo humano según el Real Decreto 3484/2000 BOE 12/1/2001, esta reducción se logró utilizando la mayor concentración (10 ppm) y el mayor tiempo de contacto (5 minutos).
- Para *Escherichia coli* en los casos que se evidenció su presencia se utilizó la mayor concentración (10 ppm) y el menor tiempo de contacto (1 minuto) logrando minimizar su carga hasta valores inferiores a  $m = 10$  siendo aceptables para el consumo humano según el Real Decreto 3484/2000 BOE 12/1/2001, igualmente siendo una bacteria Gram negativa su estructura la hace más propensa a la acción bactericida del agua de plata.

- En el caso de los mohos y levaduras debido a que presentan una composición estructural diferente a las bacterias impiden el ingreso de los iones de plata y por ende inhiben su mecanismo de acción, sin embargo a pesar de poseer una estructura más fuerte se observó disminución de la carga inicial hasta valores entre  $m= 10$  y  $M= 10^4$  siendo medianamente aceptables para el consumo humano según Rosario Pascual “Microbiología Alimentaria” (1992) y se logró utilizando la mayor concentración (10 ppm) y el mayor tiempo de contacto (5 minutos).

## **RECOMENDACIONES**

- Es sumamente necesario que los administradores de cada cafetería tomen conciencia de la necesidad de aplicar mayor énfasis en lo referente a la limpieza y desinfección de las verduras y hortalizas que no van a pasar por el proceso de cocción y van a ser parte de una ensalada lista para el consumo.
- Además de la limpieza y desinfección de las verduras y hortalizas se debe poner atención de la higiene de los manipuladores que son encargados de la elaboración de las ensaladas.
- Otro aspecto importante que se debe tomar en cuenta es la limpieza y desinfección de los utensilios que van a ser utilizados en el momento de la preparación de las ensaladas y la superficie en la que se realice el trabajo, de esta manera se evitará cualquier forma de contaminación cruzada.
- Es necesario realizar un análisis de los desinfectantes que están siendo utilizados para las verduras, hortalizas, superficies y utensilios con el objetivo de determinar su eficiencia y eficacia frente a los microorganismos indicadores de contaminación.
- Se debe tener en cuenta que los materiales utilizados para la actividad de preparación de las ensaladas deben ser únicamente para este trabajo y no deben emplearse para otras actividades.
- Identificar correctamente los utensilios que son utilizados para la preparación de ensaladas crudas sería de gran ayuda para evitar cualquier forma de contaminación.
- Es importante la constante capacitación del personal en temas principalmente como las BPMs, higiene, limpieza y desinfección de todo lo que involucre manipulación y elaboración de alimentos, los cuales van a ser destinados para el consumo de las personas, las cuales buscan siempre un alimento seguro y de calidad.

## BIBLIOGRAFÍA

- 3M Petrifilm. (2004). Levaduras y Mohos. Francia.
- 3M Petrifilm. (2004). Placas para el recuento de aerobios AC. México.
- 3M Petrifilm. (2006). Placas Petrifilm para el recuento de *E. coli*/coliformes. México.
- 3M Petrifilm. (2014). 3M™ Petrifilm™ Plate Certificates, Recognitions and Validations. USA.
- Arcos, M., Ávila, S., Estupiñan, S., & Gómez, A. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Nova-Publicación Científica*, 3(4), 69-79.
- Arya, V., Komal, R., Kaur, M., & Goyal, A. (2011). Silver Nanoparticles as a potent antimicrobial agent: A review. *Pharmacologyonline*, 3, 118-124. doi: 10.5897/AJB2013.13147. Acceso: 13-01-2015.
- Bello, J. (2000). *Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos*. Madrid: Díaz de Santos S.A.
- Bravo, F. (2004). *El manejo higiénico de los alimentos*. México D.F: LIMUSA S.A.
- Castro, J., Rojas, M., Noguera, Y., Santos, E., Zúñiga, A., & Gómez, C. (2006). *Calidad sanitaria de ensaladas de verduras crudas, listas para su consumo*. Recuperado de [http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI\\_MicroAlim/Javier\\_Castro/15.pdf](http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI_MicroAlim/Javier_Castro/15.pdf). Acceso: 03-12-2014.
- CDC. (2009). *Infecciones transmitidas por alimentos*. Recuperado de CDC: [http://www.cdc.gov/nczved/es/enfermedades/infecciones\\_alimentos/#que](http://www.cdc.gov/nczved/es/enfermedades/infecciones_alimentos/#que). Acceso: 17-02-2015.
- Cho, K., Park, J., & Osaka, T. (2005). The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta*, 51(5), 956-960. doi:10.1016/j.electacta.2005.04.071. Acceso: 19-02-2015.
- Coutiño, E., & Pérez, R. (2007). Los compuestos de plata y la salud. *Altepepaktli*, 3(5), 29-38. Recuperado de <http://132.248.9.34/hevila/Altepepaktli/2007/vol3/no5/5.pdf>. Acceso: 13-11-2014
- Coutiño, E., Pérez, R., García, R., & Herbert, L. (2010). Plata coloidal y salud. *UniverSalud*, 56-68. Recuperado de <http://www.uv.mx/msp/files/2012/12/UNIVERSALUD12.pdf>. Acceso: 17-11-2014

- FAO. (2003). *Capítulo 4. Aspectos higiénicos y sanitarios*. Recuperado de Depósito de documentos de la FAO: <http://www.fao.org/docrep/006/y4893s/y4893s07.htm>. Acceso: 15-01-2015
- Fuentes, A., Campas, O., & Meza, M. (2005). Calidad sanitaria de alimentos disponibles al público de ciudad Obregón, Sonora, México. *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición*, 6(3), 1. Recuperado de [http://www.respyn.uanl.mx/vi/3/articulos/calidad\\_sanitaria.htm](http://www.respyn.uanl.mx/vi/3/articulos/calidad_sanitaria.htm). Acceso: 17-12-2014
- Gil, Á. (2010). *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Gobierno de España. (2012). *Código Alimentario Español*. Recuperado de Boletín Oficial del Estado: <http://www.boe.es/buscar/pdf/1967/BOE-A-1967-16485-consolidado.pdf>. Acceso: 28-01-2015
- Gómez, D. (2002). *Auxiliares sanitarios para las oposiciones a la comunidad autónoma de las Islas Baleares*. Sevilla: MAD S.L.
- Gonzalez, T., & Rojas, R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México*, 47(5), 388-390. Recuperado de <http://www.scielosp.org/pdf/spm/v47n5/28385.pdf>. Acceso: 23-02-2015
- Herrera, J., & Torres, G. (2008). *Determinación de la inocuidad microbiológica de dos marcas de ensaladas empacadas listas para consumo, comercializadas en los supermercados del área metropolitana de San Salvador* (Tesis de Pregrado). Universidad de El Salvador, El Salvador. Recuperado de <http://ri.ues.edu.sv/2990/1/16100398.pdf>. Acceso: 05-11-2014
- HIMEDIA.. (2015). Peptona Bacteriológica. Recuperado de <http://himedialabs.com/TD/RM001.pdf>. Acceso: 16-02-2015
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2001). *Manual de procedimientos para el control microbiológico de alimentos*. Asunción: Bib. Orton IICA / CATIE. Recuperado de <http://books.google.com.ec/books?id=HcsOAQAIAAJ&pg=PR1&dq=Manual+de+procedimientos+para+el+control+microbiol%C3%B3gico+de+alimentos&hl=es&sa=X&ei=Mz1iVMCVEImdgwSFwYDIAQ&ved=0CB0Q6AEwAA#v=onepage&q=Manual%20de%20procedimientos%20para%20el%20control%20microbiol%C3%B3gico%20de%20alimentos&f=false>. Acceso: 26-11-2014
- Kim, S. H., Hyeong-Seon, L., Deok-Seon, R., Soo-Jae, C., & Dong-Seok, L. (2011). Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against *Staphylococcus aureus* and

- Escherichia coli. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 77-85.  
Recuperado de  
[http://gim.kormb.or.kr/storage/journal/KJMB/39\\_1/8743/articlefile/article.pdf](http://gim.kormb.or.kr/storage/journal/KJMB/39_1/8743/articlefile/article.pdf).  
Acceso: 17-11-2014.
- Lara, H., Garza, E., Ixtapan, L., & Singh, D. (2011). Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(30), 1-8. doi:10.1186/1477-3155-9-30. Acceso: 27-11-2014
- Larrea, J., Rojas, M., Álvarez, B., Rojas, N., & Heydrich, M. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 44(3), 24-34. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181229302004.pdf>. Acceso: 22-11-2014.
- Lemire, J., Harrison, J., & Turner, R. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 371-384. doi:10.1038/nrmicro3028. Acceso: 16-12-2014
- León, J. (2007). *El consumo de hortalizas crudas (Lechuga "Lactuca sativa" y tomate "Lycopersicon esculentum" y su incidencia en la generación de ETAs en el mercado central de la ciudad de Ambato* (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. Recuperado de <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/handle/123456789/3420/PAL133.pdf?sequence=3>. Acceso: 23-10-2014.
- Medina, F. (2013). *Las Buenas Prácticas de Manufactura*. Recuperado de Crifood: [http://www.alimentosecuador.com/descargas/bt523dcb09ba209\\_BPM\\_Crifood.pdf](http://www.alimentosecuador.com/descargas/bt523dcb09ba209_BPM_Crifood.pdf). Acceso: 22-01-2015.
- Monge, M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 105(1), 33-41. Recuperado de <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2931286>. Acceso: 28-11-2014.
- Morales, René. (2007). *Las paredes celulares de levadura de Saccharomyces cerevisiae: un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde* (Tesis de Doctorado). Universidad Autónoma de Barcelona, España. Recuperado de <http://www.tesisexarxa.net/bitstream/handle/10803/5689/rml1de1.pdf?sequence=1>. Acceso: 21-04-2015.
- Moragas, M. & De Pablo, B. (2015). *Recopilación Normas microbiológicas de los alimentos y asimilados*. Recuperado de [http://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/sanidad\\_alimentaria/es\\_1247/adjun](http://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/sanidad_alimentaria/es_1247/adjun)

- tos/Normas%20microbiol%C3%B3gicas%20de%20los%20alimentos%20(Enero%202014).pdf. Acceso: 05-05-2015.
- Morones, J., Elechiguerra, J., Alejandra, C., Holt, K., Kouri, J., Tapia, J., & Yamacan, M. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, *16*(10), 2346-2353. doi:10.1088/0957-4484/16/10/059. Acceso: 18-02-2015.
- MSP. (2014). Gaceta epidemiológica semanal. Ecuador. Recuperado de [http://instituciones.msp.gob.ec/images/Documentos/Ministerio/EPIDEMIOLOGIA/gaceta2014/Gaceta%20N%2041%20SE%2042\\_opt\(1\).pdf](http://instituciones.msp.gob.ec/images/Documentos/Ministerio/EPIDEMIOLOGIA/gaceta2014/Gaceta%20N%2041%20SE%2042_opt(1).pdf). Acceso: 02-02-2015.
- Nario, F., Gómez, D., Zotta, M., Lavayén, S., & Piquin, A. (2010). *Análisis microbiológico de ensaladas listas para el consumo*. Recuperado de INE: [http://www.ine.gov.ar/publi\\_pdfs/Poster%20Ensalada.pdf](http://www.ine.gov.ar/publi_pdfs/Poster%20Ensalada.pdf). Acceso: 10-11-2014.
- Negi, H., Saravanan, P., Agarwal, T., Haider, M., & Goel, R. (2013). In vitro assessment of Ag2O nanoparticles toxicity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *59*(1), 83-88. Recuperado de [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/59/1/59\\_83/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/59/1/59_83/_pdf). Acceso: 19-12-2014.
- OMS. (2015). *Enfermedades de transmisión alimentaria*. Recuperado de Organización Mundial de la Salud: [http://www.who.int/topics/foodborne\\_diseases/es/](http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/). Acceso: 11-02-2015.
- Pal, S., Kyung, Y., & Myong, J. (2007). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(6), 1712-1720. doi:10.1128/AEM.02218-06. Acceso: 19-02-2015.
- Pancorbo, F. (2009). *Desinfección del agua mediante procedimientos electrofísicos cobre/plata*. Recuperado de <http://dspace.universia.net/bitstream/2024/233/1/DESINFECCION+DEL+AGUA+MEDIANTE+COBRE-PLATA.pdf>. Acceso: 04-12-2014.
- Pascual, M. (2005). *Enfermedades de origen alimentario: su prevención*. Madrid: Díaz de Santos S.A.
- Pascual, M., & Calderón, V. (1999). *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. Madrid: Díaz de Santos.
- Pellicer, K., Copes, J., Malvestiti, L., Echeverría, G., Nosseto, E., & Stanchi, N. (2002). Ready to eat salads an analysis of health and safety conditions. *Analecta Veterinaria*, *22*(1), 4-6. Recuperado de [http://www.researchgate.net/publication/242296926\\_READY\\_TO\\_EAT\\_SALADS](http://www.researchgate.net/publication/242296926_READY_TO_EAT_SALADS)

AN ANALYSIS OF HEALTH AND SAFETY CONDITIONS. Acceso: 09-12-2014.

- Petrus, E., Tinakumari, S., Chai, L., Ubong, A., Tunung, R., Elexson, N., . . . Son, R. (2011). A study on the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of Nano Colloidal Silver on food-borne pathogens. *International Food Research Journal*, 18, 55-66. Recuperado de [http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20\(01\)%202011/\(6\)%20IFRJ-2010%20Petrus\[1\].pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20(01)%202011/(6)%20IFRJ-2010%20Petrus[1].pdf). Acceso: 14-01-2015.
- Prabhu, S., & Poulouse, E. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 1-10. doi:10.1186/2228-5326-2-32. Acceso: 30-10-2014.
- Rodríguez, E., Rodríguez, C., Gamboa, M., & Arias, M. (2010). Evaluación microbiológica de alimentos listos para consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 60(2), 179-183. Recuperado de <http://www.alanrevista.org/ediciones/2010-2/pdf/art11.pdf>. Acceso: 04-03-2015.
- Rodriguez, C. (2011). Indicadores rápidos. *NotiFood*, 1-6. Recuperado de NotiFood 3M: [http://solutions.3m.com.co/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?lmd=1332535689000&locale=es\\_CO&assetType=MMM\\_Image&assetId=1319223902368&blobAttribute=ImageFile](http://solutions.3m.com.co/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?lmd=1332535689000&locale=es_CO&assetType=MMM_Image&assetId=1319223902368&blobAttribute=ImageFile). Acceso: 14-10-2014.
- Sarsar, V., Selwal, K., & Selwal, M. (2014). Nanosilver: Potent antimicrobial agent and its biosynthesis. *African Journal of Biotechnology*, 13 (4), 546-554. doi: 10.5897/AJB2013.13147. Acceso: 11-12-2014.
- Siddhartha, S., Tanmay, B., Arnab, R., Gajendra, S., Ramachandrarao, P., & Debabrata, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 18, 1-9. doi:10.1088/0957-4484/18/22/225103. Acceso: 24-04-2015
- Singh, M., Singh, S., Prasad, S., & Gambhir, I. (2008). Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 3(3), 115-122. Recuperado de [http://www.researchgate.net/publication/256463087\\_NANOTECHNOLOGY\\_IN\\_MEDICINE\\_AND\\_ANTIBACTERIAL\\_EFFECT\\_OF\\_SILVER\\_NANOPARTICLES](http://www.researchgate.net/publication/256463087_NANOTECHNOLOGY_IN_MEDICINE_AND_ANTIBACTERIAL_EFFECT_OF_SILVER_NANOPARTICLES). Acceso: 28-12-2014.
- Souza, A., Mehta, D., & Leavitt, R. (2006). Bactericidal activity of combinations of silver-water dispersion with 19 antibiotics against seven microbial strains. *Current Science*, 91(7), 926-929. Recuperado de

<http://www.ihsite.com/user/silver%20water%20dispersion%5D.pdf>. Acceso: 29-01-2015.

Vásquez, C., De Cos, A., & López, C. (2005). *Alimentación y nutrición: manual teórico-práctico*. Madrid: Díaz de Santos.

# ANEXOS

**ANEXO 1**  
**FORMATO DOCUMENTO DE AUTORIZACIÓN DE MUESTREOS PROYECTO**  
**PUCE 2014**

Nombre del Gerente a cargo: .....

Local 1: Cafeterías PUCE Edificio Administrativo.....

Local 2: Cafeterías PUCE Centro Cultural.....

Local 3: Cafeterías PUCE Auditorio.....

Se solicita la autorización para realizar muestreos en estos locales como parte del Proyecto “*Aplicaciones del Agua de Plata como agente bactericida en matrices varias como alimentos preparados listos para el consumo sin tratamiento térmico (ensaladas), superficies y utensilios que tienen contacto con alimentos, solución de enjuague para los manipuladores investigación realizada en Cafeterías de un Centro de Educación Superior*”, fechas probables de los muestreos desde marzo hasta agosto de acuerdo al cronograma planteado en el proyecto.

Los muestreos a realizarse comprenden:

- Muestras de ensaladas que utilicen ingredientes que no han sido tratados con procesos de cocción
- Muestras de hisopados de superficies y utensilios que tengan relación con preparación de alimentos
- Muestras de enjuagues de manos de manipuladores

En el desarrollo del proyecto se mantendrá la confidencialidad de los resultados obtenidos, además las muestras utilizadas tendrán una codificación que será manejada únicamente por el personal que está en la investigación y el Gerente a cargo de los locales.

Sin más que añadir, me suscribo de usted;

Atentamente;

Mgtr. Elena Granda M.  
**Director Proyecto**

.....  
**Gerente Locales Cafeterías PUCE**

## ANEXO 2

### PEPTONA BACTERIOLÓGICA. HIMEDIA



## Technical Data

### Peptone, Bacteriological

RM001

It contains high tryptophan content used as culture media ingredient in variety of media. It can also be used for commercial production of enzymes, vaccines, antibiotics, steroids and other products.

#### Principle And Interpretation

Peptone, Bacteriological is prepared by enzymatic digestion of selected fresh meat. Being highly nutritious it supports good growth of wide variety of microorganisms and can be used for identification of bacteria by performing various biochemical tests. As peptones confer nutritional benefit, especially at low dilution rates, for the recombinant cell lines it have been recently used as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells .

#### Quality Control

##### Appearance

Light yellow to brownish yellow homogenous free flowing powder ,having Characteristic odour but not putrescent.

##### Solubility

Freely soluble in distilled/purified water, insoluble in alcohol.

##### Clarity

2% w/v aqueous solution remains clear and neutral without any haziness after autoclaving at 15 lbs pressure (121°C) for 15 minutes.

##### Reaction

Reaction of 2% w/v aqueous solution at 25°C.

##### pH

6.10- 7.10

##### Microbial Load:

##### Total aerobic microbial count (cfu/gm)

By plate method when incubated at 30-35°C for not less than 3 days.

Bacterial Count :  $\leq$  2000 CFU/gram

##### Total Yeast and mould count (cfu/gm)

By plate method when incubated at 20-25°C for not less than 5 days.

Yeast & mould Count :  $\leq$  100 CFU/gram

##### Test for Pathogens

1. E.coli-Negative in 10 gms of sample  
2. Salmonella species-Negative in 10 gms of sample  
3. Pseudomonas aeruginosa-Negative in 10 gms of sample  
4. Staphylococcus aureus- Negative in 10 gms of sample  
5. C.albicans- Negative in 10 gms of sample  
6. Clostridia- Negative in 10 gms of sample

##### Degree of digestion

As per method specified in USP 32,NF26. a. Absence of undigested protein b. Presence of proteoses c. Presence of tryptophan

##### Nitrite test

As per method specified in USP 32,NF26 Negative:No development of pink or red colour.

##### Microbial Content

As per method specified in USP 32,NF26  $\leq$ Total of 50 microorganisms or clumps in 10 consecutive fields.

##### Bacteriological Testing

Bacteriological tests are carried out as per USP 32,NF26 where respective medium is prepared by using peptone under test.

##### Test for fermentable carbohydrate

Medium :2% peptone w/phenol red broth w/durhams tube.After inoculation with test culture and incubation for 24 hours at 35-37°C

*Escherichia coli* ATCC 25922

Acid production ,(Positive test)

*Streptococcus liquefaciens*

No acid production,(Negative test)

Please refer disclaimer Overleaf.

**Production of acetyl methyl carbinol**

Medium :0.1% peptone and 0.5% of dextrose in water.After inoculation with test culture and incubation for 24 hours at 35-37°C.

*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 Formation of pink colour (Positive test).

*Escherichia coli* ATCC 25922 No formation of pink colour (Negative test).

**Production of H<sub>2</sub>S**

Medium :1% peptone in water.After inoculation with test culture and incubation for 24 hours at 35-37°C .

*Salmonella Typhi* ATCC 6539 The lead acetate test paper shows brownish blackening (lead sulphide)

**Production of Indole**

Medium : 0.1% peptone in water.After inoculation with test culture and incubation for 24 hours at 35-37°C.

*Escherichia coli* ATCC 25922 Appearance of distinct pink to red colour ring (Positive test).

*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 No formation of pink to red coloured ring (Negative test).

**Cultural response**

Cultural response observed after incubation at 35-37°C for 24 hours by using 2% peptone,0.5% sodium chloride and 1.5% agar in water,pH 7.2-7.4

**Cultural Response**

Organism	Growth
<b>Cultural response</b>	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Luxuriant
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Luxuriant
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	luxuriant
<i>Salmonella Typhi</i> ATCC 6539	Luxuriant
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	luxuriant
<i>Streptomyces albus</i> ATCC 3004	luxuriant
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	luxuriant w/ beta haemolysis (With addition of sterile 5% sheep blood to above medium, after an incubation at 35-37°C for 48 hours.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 19424	luxuriant w/ beta haemolysis (With addition of sterile 10% sheep blood to above medium heated to 80-90°C until blood has turned to chocolate brown and incubated in 10% CO <sub>2</sub> atmosphere at 35-37°C for 48 hours).

**Chemical Analysis**

Total Nitrogen	>= 13.50%
Amino Nitrogen	>= 3.00%
Sodium chloride	<= 5.0%
Loss on drying	<= 5.0%
Residue on ignition	<= 15%

**Storage and Shelf Life**

Store below 30°C. Use before expiry date on the label.

### **ANEXO 3**

#### **PREPARACIÓN DE AGUA PEPTONADA AL 0,1 %**

1. Pesar 0,1 gramos del medio y aforar a 100 ml de solvente
2. En una probeta medir los 100 ml necesarios de agua purificada Tipo II (solvente).
3. Mezclar los dos componentes y llevar al calor solamente hasta que se disuelva totalmente.
4. Trasvasar a frascos schott de vidrio con 90 ml de agua peptonada.
5. Mantener las tapas de los frascos a medio cerrar.
6. Llevar a esterilizar en autoclave a 121°C, 15 psi y 15'.
7. Sacar el material con cuidado cuando las condiciones del equipo sean las permitidas.
8. Rotular el material de trabajo con fecha de preparación.
9. Llevar a refrigeración el material de trabajo hasta que se ocupe en el muestreo.

## ANEXO 4

### GUÍA INTERPRETACIÓN *E. Coli*/Coliformes

**3M**

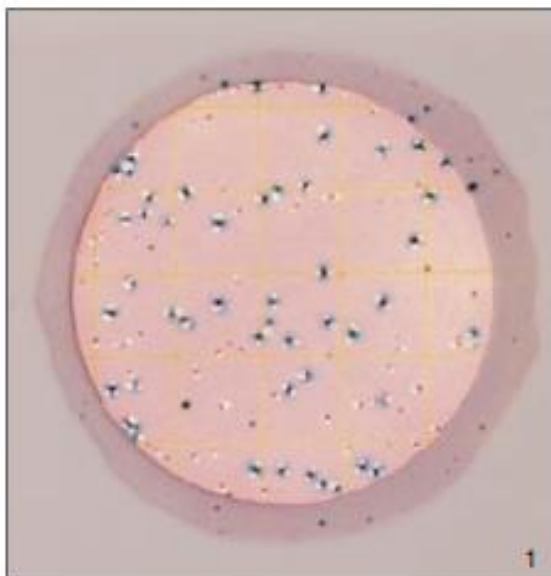
Guía de interpretación

## Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes

Esta guía lo familiarizará con los resultados de las Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes. Para mayor información, contacte al representante autorizado de productos de 3M Microbiología más cercano.

Las Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes (Placa Petrifilm EC) contienen nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias. La mayoría de las *E. coli* (cerca del 97%) produce beta-glucuronidasa, la que a su vez produce una precipitación azul asociada con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por *E. coli* y coliformes fermentadores de lactosa. Cerca del 95% de las *E. coli* producen gas, representado por colonias entre azules y rojo-azules asociadas con el gas atrapado en la Placa Petrifilm EC (dentro del diámetro aproximado de una colonia).

La AOAC Internacional y el Manual de Análisis Bacteriológico de la FDA de los Estados Unidos definen los coliformes como colonias de bastoncillos gram-negativos que producen ácido y gas de la lactosa durante la fermentación metabólica de la lactosa. Las colonias coliformes que crecen en la Placa Petrifilm EC, producen un ácido que causa el oscurecimiento del gel por el indicador de pH. El gas atrapado alrededor de las colonias rojas de coliformes confirma su presencia.

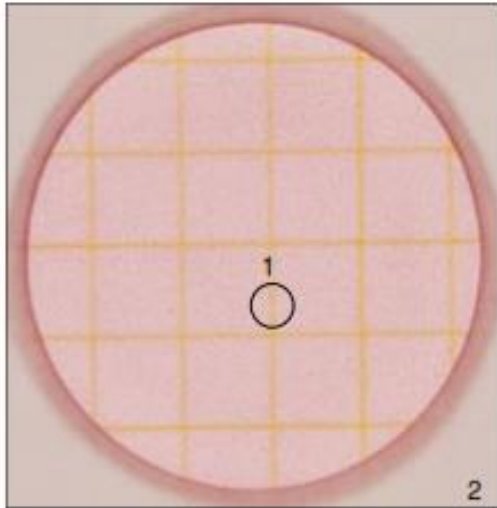


La identificación de la *E. coli* puede variar de país a país (ver en "Recomendaciones de uso" tiempos de incubación y temperaturas).

Método validado por la AOAC Internacional  
*E. coli* = 49 (colonias azules con gas)

**Total coliformes = 87** (colonias rojas y azules con gas)

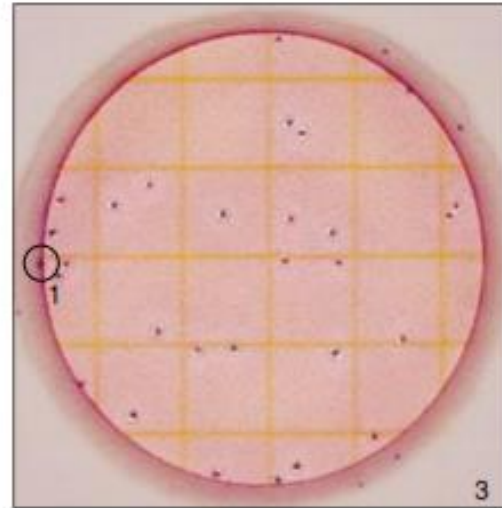
(NO use esta placa sola para la detección de *E. coli* O157. Como la mayoría de otros medios para enumeración de *E. coli* coliformes, esta placa no señalará específicamente si está presente algún O157).



**No crecimiento = 0**

Observe el cambio de color del gel de las figuras 2 a 8. Mientras el recuento de *E. coli* o coliformes aumenta, el color del gel se vuelve rojo oscuro o púrpura azulado.

Las burbujas del fondo son características del gel y no son el resultado del crecimiento de *E. coli* o coliformes. Ver el círculo 1.



**Recuento de *E. coli* = 13**

**Total de recuento de coliformes = 28**

El rango de recuento de la población en las Placas Petrifilm EC es de 15 a 150.

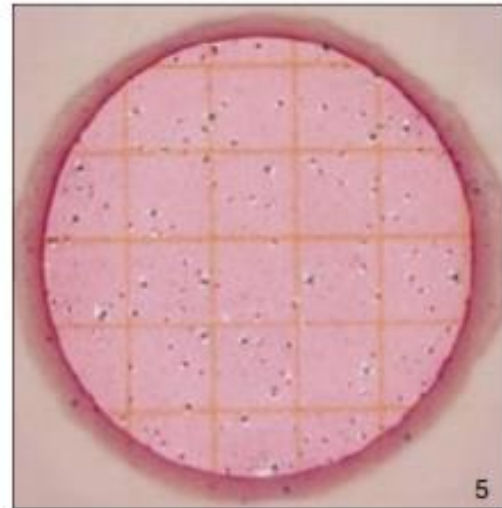
No cuente las colonias que aparecen sobre la barrera de espuma, ya que han sido removidas de la influencia del medio selectivo. Ver el círculo 1.



**Recuento de *E. coli* = 3**

Cualquier azul en una colonia (de azul a rojo-azul) indica la presencia de *E. coli*. La luz de frente mejorará la detección del precipitado azul formado por una colonia.

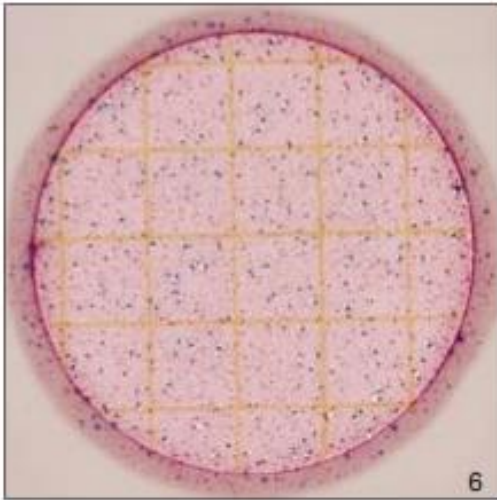
El círculo 1 muestra una colonia rojo-azul cuyo conteo se hizo con luz de atrás. El círculo 2 muestra la misma colonia con luz de frente. El azul precipitado es más evidente en el círculo 2.



**Recuento de *E. coli* = 17**

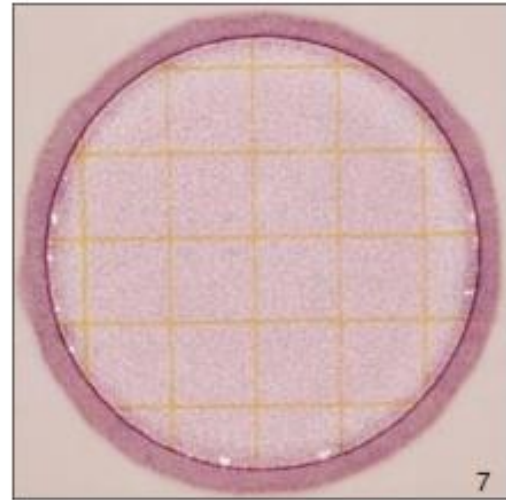
**Recuento total estimado de coliformes = 150**

El área circular de crecimiento es de aproximadamente 20 cm<sup>2</sup>. El recuento estimado se puede hacer en las placas que contienen más de 150 colonias, al contar el número de colonias en uno o más de los cuadrados representativos y al determinar el promedio por cuadrado. Multiplique el número promedio por 20 y determine el conteo estimado por placa.



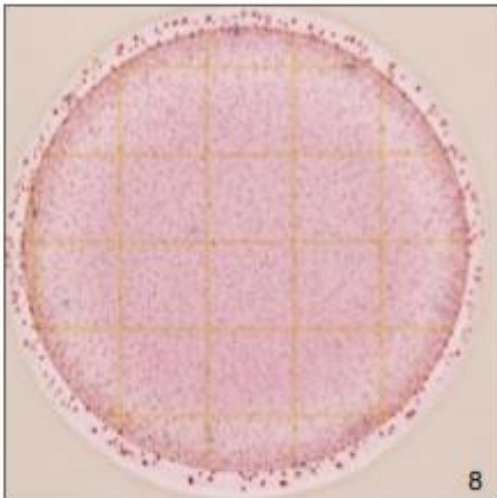
**Recuento actual aprox.  $\sim 10^8$**

Las Placas Petrifilm EC con colonias que son MNPC, tienen una o más de las siguientes características: Muchas colonias pequeñas, muchas burbujas de gas y el oscurecimiento del gel de un color rojo a un azul púrpura.



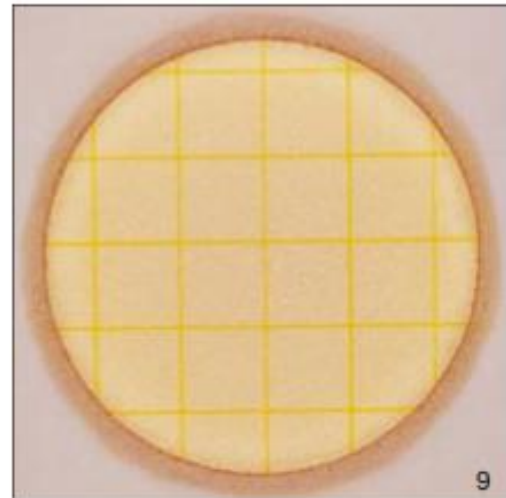
**Recuento actual aprox.  $\sim 10^8$**

Una alta concentración de *E. coli* puede causar que el área de crecimiento se haga azul púrpura.



**Recuento presuntivo de *E. coli* - 8**

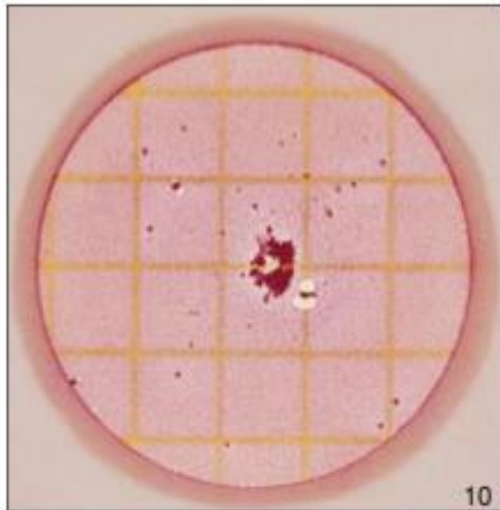
**Recuento total estimado de coliformes aprox.  $\sim 10^8$**   
 Cuando existen cifras altas de coliformes ( $10^8$ ), algunos tipos de *E. coli* presuntiva pueden producir menos gas y las colonias azules pueden ser menos definitivas. Cuente todas las colonias azules sin gas y/o zonas azules como *E. coli*. Si es necesaria la confirmación, aisle las colonias azules con gas para su posterior identificación.



**Recuento actual aprox. de  $\sim 10^8$**

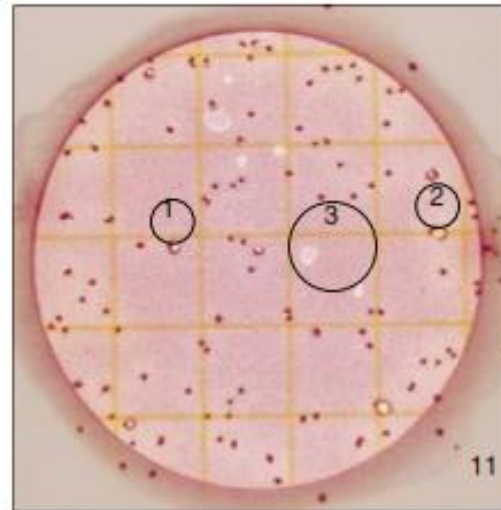
Cuando un número alto de organismos no-coliformes, como las *Pseudomonas*, estén presentes en las Placas Petrifilm EC, el gel puede volverse amarillo.

# Burbujas



**Recuento total de coliformes = 3**

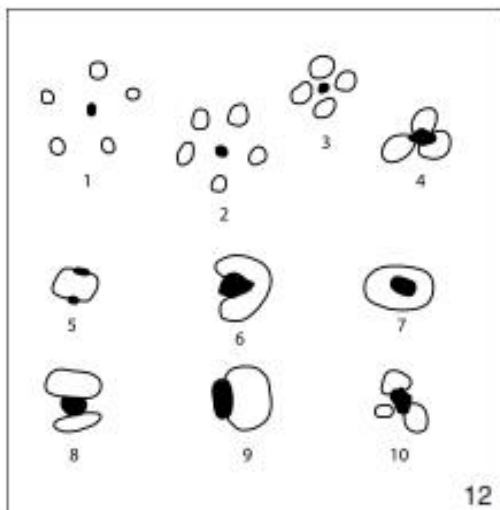
Las partículas de alimento tienen forma irregular y no tienen burbujas de gas.



**Recuento total de coliformes = 78**

Los patrones de burbujas pueden variar. El gas puede romper la colonia y así, esta última 'delinea' a la burbuja. Vea los círculos 1 y 2.

Las burbujas pueden aparecer como resultado de una inoculación impropia o de aire atrapado dentro de la muestra. Tienen forma irregular y no se asocian con una colonia. Vea el círculo 3.



Los ejemplos 1 a 10 muestran varios patrones de burbujas asociados con colonias que producen gas. Todas deben ser enumeradas.

3M Petrifilm. (2006). Placas Petrifilm para el recuento de *E. coli*/coliformes. México. Recuperado de [http://solutions.productos3m.es/wps/portal/3M/es\\_ES/FoodSafetyEU/FoodSafety/ProductApplications/IndicatorsPetrifilm/PetrifilmPlates/](http://solutions.productos3m.es/wps/portal/3M/es_ES/FoodSafetyEU/FoodSafety/ProductApplications/IndicatorsPetrifilm/PetrifilmPlates/)

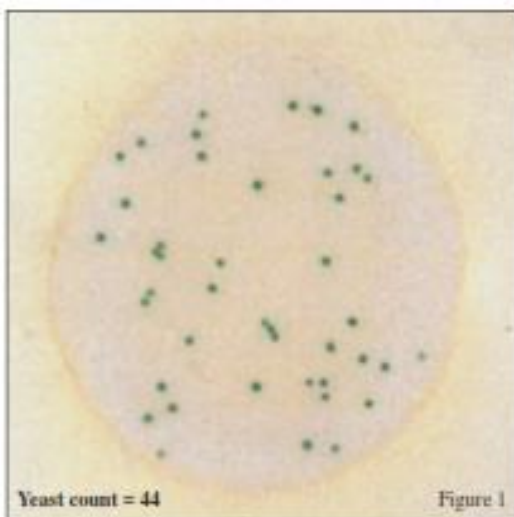
## ANEXO 5

### GUÍA INTERPRETACIÓN MOHOS Y LEVADURAS

**3M**

**Petrifilm™**  
Levaduras y Mohos

Guía de  
Interpretación



Hacer un recuento con placas Petrifilm Levaduras y Mohos es fácil. Contienen un indicador colorante para levaduras y mohos para proporcionar contraste y facilitar el recuento.

Para diferenciar las colonias de levaduras y mohos en las placas Petrifilm Levaduras y Mohos, buscar una o más de las siguientes características típicas:

#### LEVADURAS

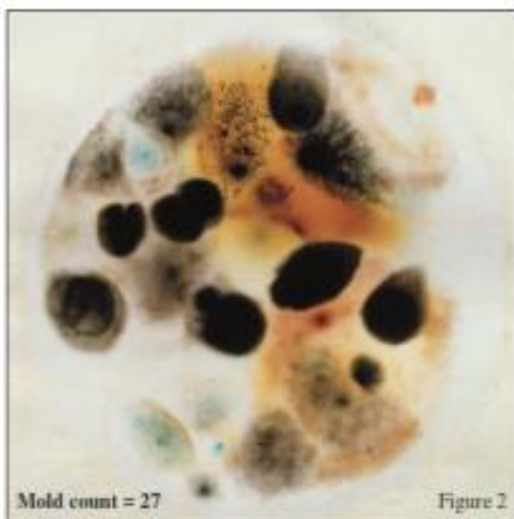
- Colonias pequeñas
- Las colonias tienen bordes definidos
- De color rosa-tostado a azul-verdoso
- Las colonias pueden aparecer alzadas ("3D")
- Generalmente no tienen un foco (centro negro) en el centro de la colonia

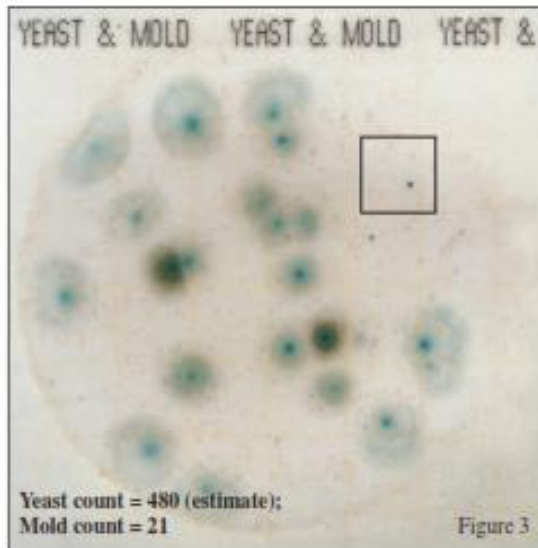
#### MOHOS

- Colonias grandes
- Las colonias tienen bordes difusos
- Color variable (los mohos pueden producir sus propios pigmentos)
- Las colonias son planas
- Generalmente con un foco en el centro de la colonia

Las colonias en la figura 1 son ejemplos de levaduras características: colonias pequeñas, de color azul-verdoso, con bordes definidos y sin foco (**Recuento de levaduras = 44**).

Las colonias de la figura 2 son ejemplos de mohos característicos: grandes, colonias de color variable, con bordes difusos y un foco en el centro (**Recuento de mohos = 27**).





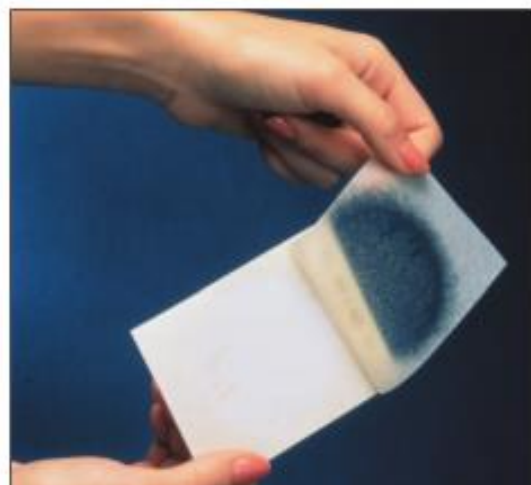
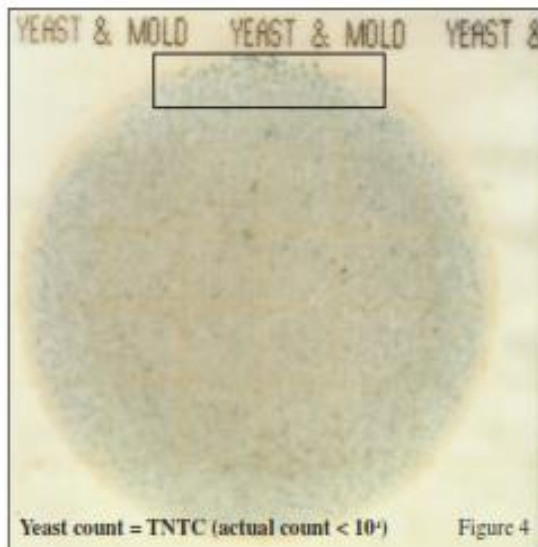
## Levaduras

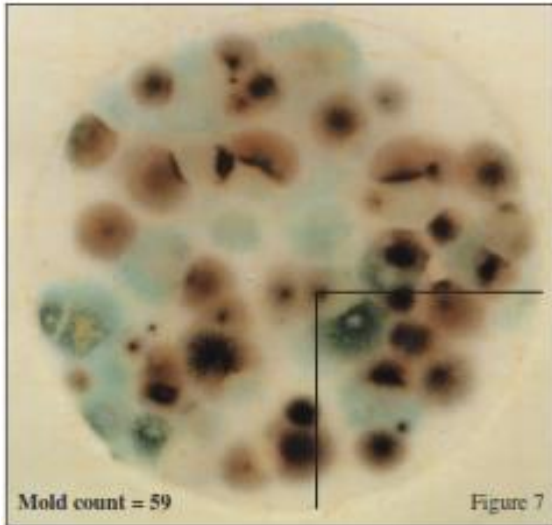
La placa Petrifilm Levaduras y Mohos de la figura 3 contiene un número fácilmente contable de mohos, (colonias grandes, verdes, con bordes difusos y un foco central) y un gran número de colonias de levaduras. Las colonias de levaduras son pequeñas, de color tostado, con bordes definidos y sin foco. Cuando el número de colonias es más de ISO, se debe hacer una estimación: determinar el número medio de colonias en un cuadrado (1 cm<sup>2</sup>) y multiplicar por 30 para obtener el recuento total por placa. El área inoculada de una placa Petrifilm Levaduras y Mohos es de aproximadamente 30 cm<sup>2</sup> (**Recuento de levaduras = 480 (estimado) ; Recuento de mohos = 21**).

La placa de Petrifilm Levaduras y Mohos de la figura 4 contiene un elevado número de colonias de levaduras, demasiado numeroso para ser contado (TNTC). Las colonias pequeñas y azules en el borde de la placa la diferencian de una placa de mohos TNTC (**Recuento de levaduras = TNTC, recuento actual >10<sup>6</sup>**).

Algunas veces las placas Petrifilm Levaduras y Mohos con un número alto de colonias de levaduras pueden parecer que tengan un crecimiento azul sólo en los bordes (figura 5). También es un recuento de levaduras TNTC (**Recuento de levaduras = TNTC, recuento actual >10<sup>6</sup>**).

Si las placas Petrifilm Levaduras y Mohos parecen no tener crecimiento, levantar el film superior (figura 6). Si hay presentes muchas levaduras, se verán colonias blancas en el gel. Se anota como un recuento de levaduras TNTC (**Recuento de levaduras = TNTC**).

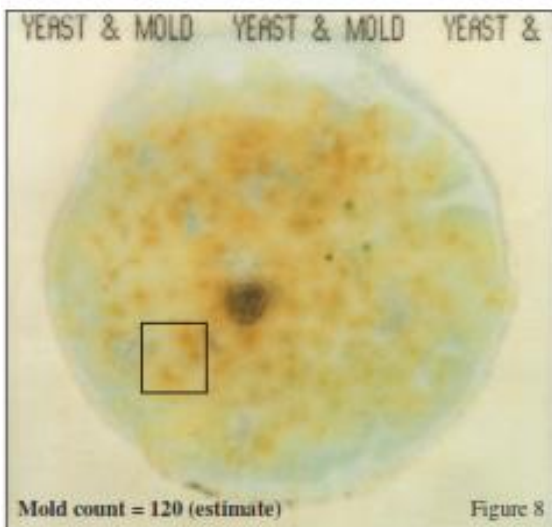




## Mohos

Las colonias de mohos en la placa Petrifilm Levaduras y Mohos de la figura 7 son colonias de pigmentación variable, con bordes difusos y un foco central. Son grandes, empezando a esporular y superponerse entre sí en la placa. Para facilitar el recuento dividir la placa en secciones y buscar focos que permitan distinguir colonias individuales. El recuadro muestra 15 mohos (**Recuento de mohos = 59**).

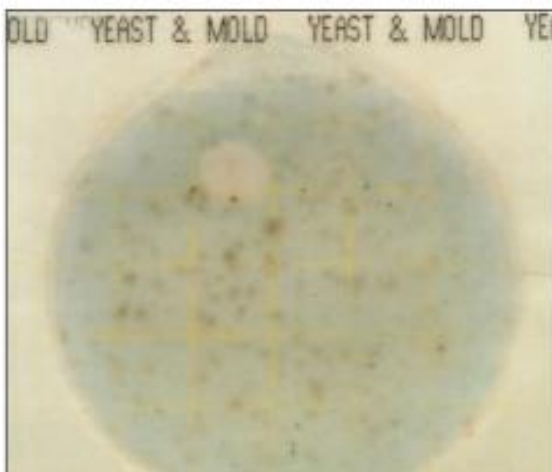
Notar la pigmentación variable con bordes vellosos en la placa de la figura 8, causado por el elevado número de colonias de mohos y la esporulación que ha tenido lugar. Estimar el número contando los focos. En el cuadrado que se muestra hay 4 colonias (**Recuento de mohos = 120 (estimado)**).



Igual que con todos los métodos de recuento en placas, las placas con muchas colonias pueden mostrar características de colonias atípicas. Es importante hacer una correcta dilución para asegurar un recuento exacto.

Las placas Petrifilm Levaduras y Mohos de las figuras 9 y 10 son diluciones 1:10 y 1:100, respectivamente, del mismo producto. Las colonias de la figura 9 son pequeñas, pálidas y numerosas, haciendo el contaje difícil de estimar. Hay una burbuja como artefacto (**Recuento de mohos = TNTC**).

La dilución del producto para obtener un recuento de colonias en el margen deseado (15-150 colonias) facilita el recuento. Los mohos de la figura 10 son grandes, con bordes difusos y focos centrales (**Recuento de mohos = 58**). El apiñamiento de las colonias de la placa en la figura 9 impide su crecimiento típico.



## ANEXO 6

### GUÍA INTERPRETACIÓN MESÓFILOS AEROBIOS

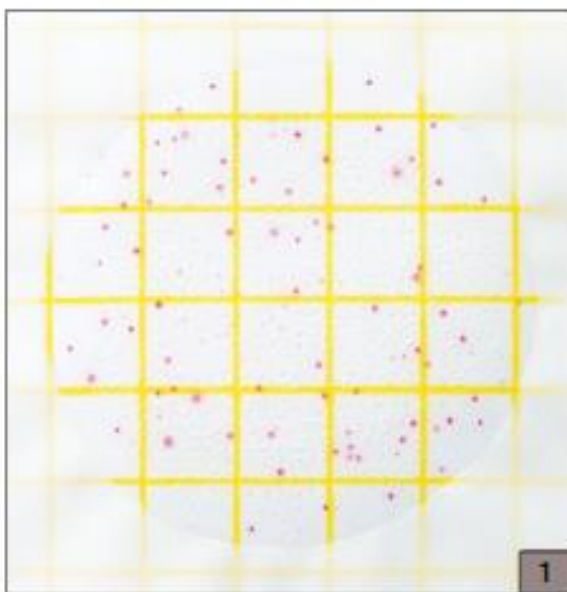
**3M** Guía de interpretación

# Petrifilm™

## Placas para el Recuento de Aerobios AC

Esta guía lo familiarizará con las Placas Petrifilm™ para el Recuento de Aerobios (cuenta total en placa o aerobios mesófilos). Para mayor información, contacte al Representante Autorizado de Productos Microbiológicos de 3M más cercano.

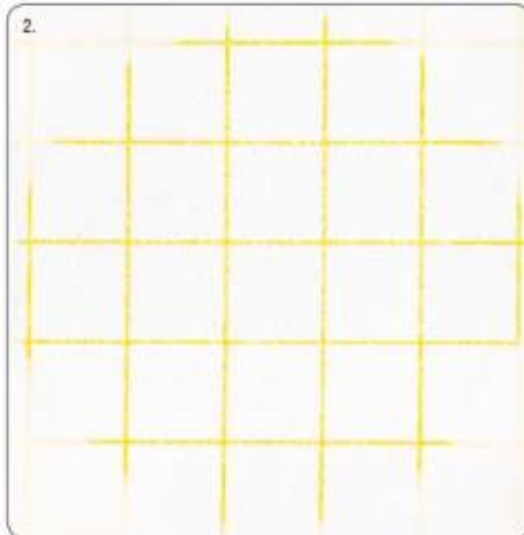
Las Placas Petrifilm™ para Recuento de Aerobios Totales (Aerobic Count AC) son un medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene nutrientes del *Agar Standard Methods*, un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador de color rojo que facilita el recuento de las colonias. Las Placas Petrifilm AC se utilizan para el recuento de la población total existente de bacterias aerobias en productos, superficies, etc.



#### Conteo de Bacterias Aerobias =152

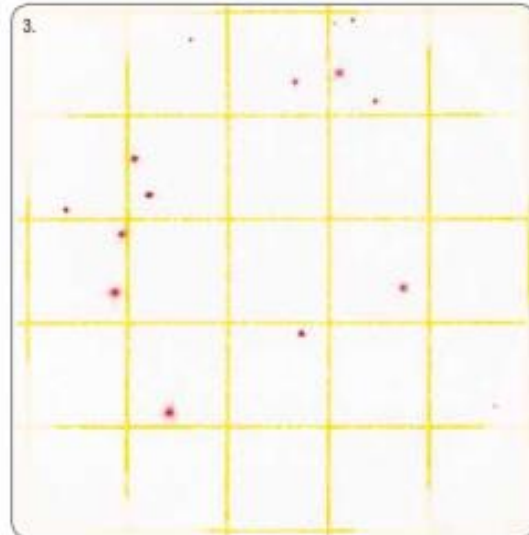
El tinte indicador rojo que se encuentra en la placa colorea las colonias para su mejor identificación. Cuente todas las colonias rojas sin importar su tamaño o la intensidad del tono rojo.

## 3M™ Petrifilm™ Placas para Recuento de Aerobios



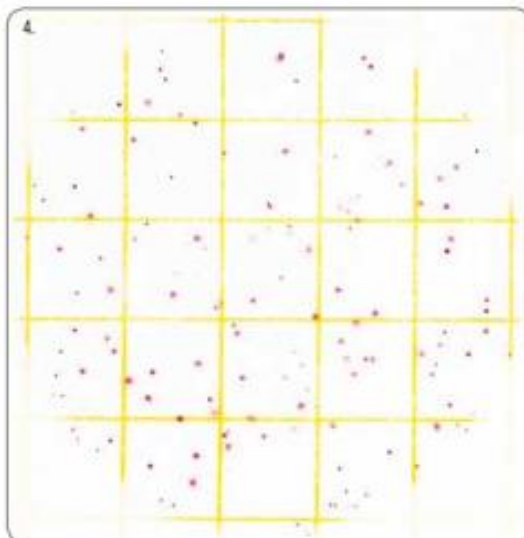
**Recuento = 0**

La interpretación de la placa Petrifilm para Aerobios resulta muy fácil. La Figura 2 muestra una placa Petrifilm Recuento de Aerobios sin colonias.



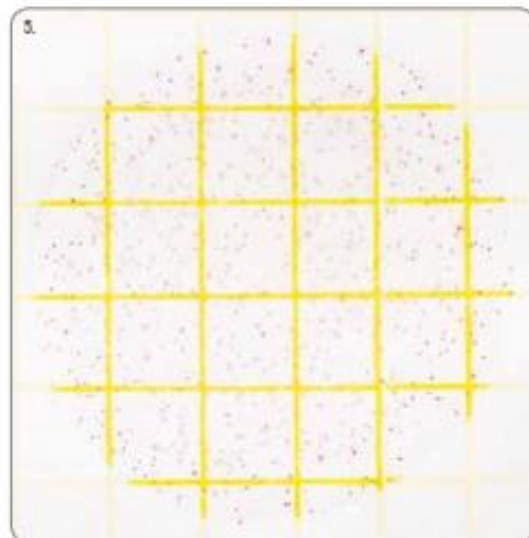
**Recuento = 16**

La Figura 3 muestra una placa Petrifilm Recuento de Aerobios con pocas colonias bacterianas. Un indicador rojo presente en la placa colorea todas las colonias. Contar todas las colonias rojas independientemente de su tamaño y de la intensidad de color. Usar un contador estándar tipo Quebec o un lector de placas 3M™ Petrifilm™ para leer la placa Petrifilm.



**Recuento = 143**

Al igual que con una placa Petri normal, el rango de recuento para una placa Petrifilm de Aerobios es de 10 - 300 colonias. Ver Figura 4.



**Recuento estimado = 420**

Cuando el número de colonias es superior a 300 como ocurre en la Figura 5, se puede realizar una estimación. Contar las colonias de una cuadrícula (1 cm<sup>2</sup>) y multiplicar por 20 para obtener el recuento total por placa. El área de inóculo de una placa Petrifilm de Aerobios es de 20 cm<sup>2</sup> aproximadamente.



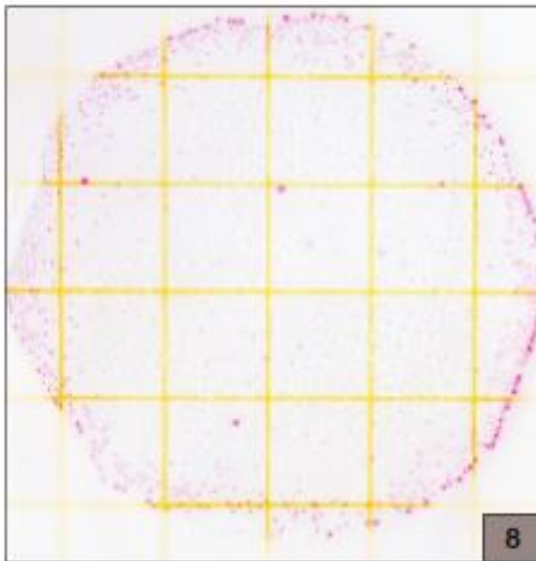
**Conteo de Bacterias Aerobias = MNPC**  
**Conteo estimado:  $10^7$**

La figura 6 muestra una Placa Petrifilm AC con colonias muy numerosas para contar.



**Conteo de Bacterias Aerobias = MNPC**  
**Conteo estimado:  $10^8$**

Con conteos muy altos, el área total de crecimiento puede virar o colorearse rosa, como se muestra en la figura 7. Usted podría observar colonias individuales sólo en el filo o borde del área de crecimiento. Registre este conteo como muy numeroso para contar (MNPC).



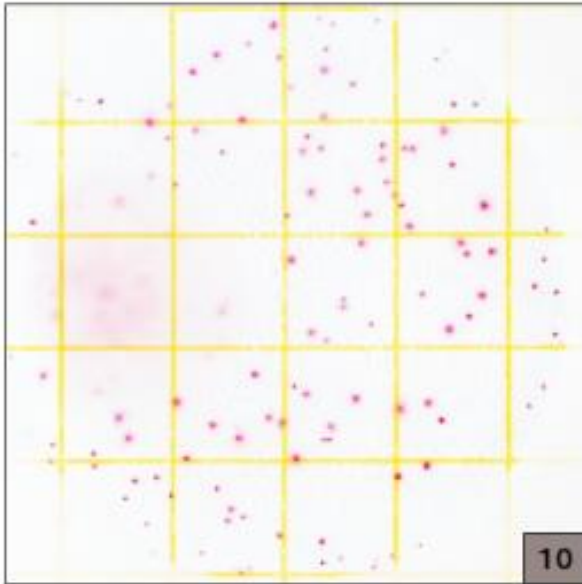
**Conteo de Bacterias Aerobias = MNPC**  
**Conteo estimado:  $10^7$**

Ocasionalmente, la distribución de las colonias puede aparecer de forma desigual, no homogénea, como se muestra en la figura 8. Esto también es una indicación de un resultado MNPC.



**Conteo de Bacterias Aerobias = MNPC**  
**Conteo estimado:  $10^7$**

Las colonias de la figura 9 podrían confundirse como contables a primera vista. Sin embargo, si usted observa detalladamente el borde o filo del área de crecimiento, podrá visualizar una alta concentración de colonias. Registre este resultado como MNPC.

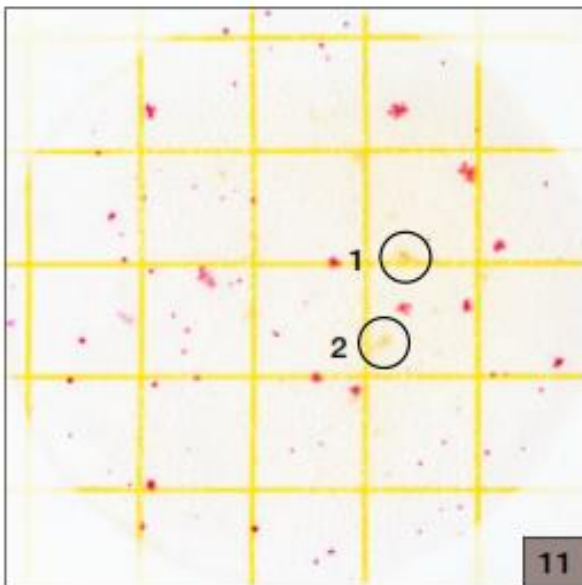


### Conteo de Bacterias Aerobias = 160

Como se aprecia en la figura 10, algunas especies de bacterias pueden llegar a licuar el gel de las Placas Petrifilm AC.

#### Cuando esto ocurra:

1. Determine el promedio en los cuadros no afectados y estime los resultados.
2. Realice conteos preliminares para verificar el crecimiento; la licuefacción generalmente se presenta de manera tardía.



### Conteo de Bacterias Aerobias = 83

Debido a que en las Placas Petrifilm AC las colonias de aerobios se tiñen de rojo, se las puede diferenciar de partículas o residuos de producto, ya que éstos tienen una forma irregular y color opaco (observe los círculos 1 y 2 de la figura 11).

3M Petrifilm. (2004). Placas para el recuento de aerobios AC. México. Recuperado de [http://solutions.productos3m.es/wps/portal/3M/es\\_ES/FoodSafetyEU/FoodSafety/ProductApplications/IndicatorsPetrifilm/PetrifilmPlates/](http://solutions.productos3m.es/wps/portal/3M/es_ES/FoodSafetyEU/FoodSafety/ProductApplications/IndicatorsPetrifilm/PetrifilmPlates/)



## ANEXO 8

### EQUIPO PREPARACIÓN AGUA DE PLATA (CORTESÍA ING. OSWALDO CARBONARI)

Equipos utilizados para la obtención de Agua de Plata Coloidal (Cortesía: Oswaldo Carbonari. ARGENTUN)



Osciloscopio Hameg (visión del tipo de onda) el aparato color naranja es un medidor de voltios, amperios, homios, un probador de múltiples funciones.



En la parte de abajo un medidor de frecuencia 10 hz, 2 ghz (sirve para ver los impulsos de frecuencia)



Regulador de revoluciones de giros viene utilizado con el mezclador de agua (temporizado a inversión automática con sensor de rotación)



Abajo el aparato negro es la fuente de alimentación de las barritas de plata, al lado está el contenedor de agua donde en la tapa del contenedor se pueden ver las pinzas roja y negra que mantienen posicionadas las barritas de plata, en la mitad de la tapa está colocado el motorcito que funciona con un mezclador en plástico sirve para dar movimiento al agua.

Los aparatos pequeños manuales como el medidor de pH y el medidor de ppm también vienen utilizados en la elaboración del agua de plata en las diferentes concentraciones.

## ANEXO 9

### RECOMENDACIONES DE USO PLACAS PETRIFILM MESÓFILOS AEROBIOS

#### 3M Placas Petrifilm™ para el Recuento de Aerobios

#### Recomendaciones de uso

Para detallar información sobre PRECAUCIONES, COMPENSACIONES POR GARANTÍA / GARANTÍA LIMITADA, LIMITACIONES POR RESPONSABILIDAD DE 3M, ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN, e INSTRUCCIONES DE USO, remítase al inserto de producto en el paquete.

#### Almacenamiento



**1** Almacene los paquetes cerrados a una temperatura  $\leq 8^{\circ}\text{C}$  ( $\leq 46^{\circ}\text{F}$ ). Las placas deben usarse antes de su fecha de caducidad. En áreas de alta humedad, donde la condensación puede ser un inconveniente, es recomendable que los paquetes se atemperen al ambiente del lugar de trabajo antes de abrirlos. Las Placas Petrifilm tienen un tiempo de vida útil de 18 meses desde su fecha de elaboración. Observe la fecha de caducidad en la parte superior de la placa.



**2** Para cerrar un paquete abierto, doble el extremo y séllelo con cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y, por lo tanto, la alteración de las placas.

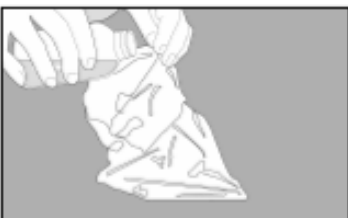


**3** Mantenga los paquetes cerrados (según se indica en el punto 2) a temperatura  $\leq 25^{\circ}\text{C}$  ( $\leq 77^{\circ}\text{F}$ ) y una humedad relativa  $\leq 50\%$ . No refrigere los paquetes que ya hayan sido abiertos. Utilice las Placas Petrifilm máximo 1 mes después de abrirlo el paquete. Para almacenamiento prolongado de paquetes abiertos, una vez cerrados (según punto 2) colóquelos en un contenedor sellable (tipo funda con cierre) y almacénelos en congelación. Para usar las placas, saque el paquete del congelador, retire el número de placas necesarias y guarde el resto en las mismas condiciones antes descritas hasta su fecha de caducidad.

#### Preparación de la muestra



**4** Prepare al menos una dilución de 1:10 de la muestra. Pese o pipetee la muestra en una funda o bolsa de Stomacher, botella de dilución o cualquier otro contenedor estéril apropiado.



**5** Adicione la cantidad apropiada de uno de los siguientes diluyentes estériles: tampón Butterfield (tampón IDF fosfato, 0.0425 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y con pH ajustado a 7.2); agua de peptona al 0.1%; diluyente de sal peptonada (método ISO 6887); buffer de agua de peptona (método ISO 6579); solución salina (0.85 a 0.90%); caldo ietheen libre de bisulfato o agua destilada.

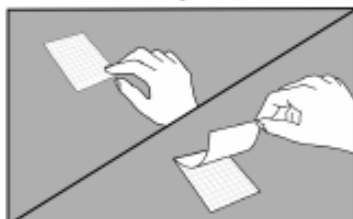


**6** Mezcle u homogenice la muestra mediante los métodos usuales.

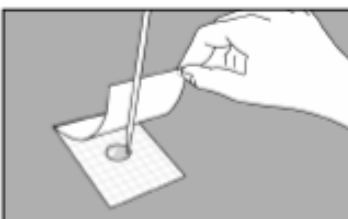
Ajuste el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2: Para productos ácidos: use solución 1N de NaOH. Para productos básicos: use solución 1N de HCl.

No utilice buffers que contengan citrato, bisulfito o tiosulfato de sodio, porque pueden inhibir el crecimiento.

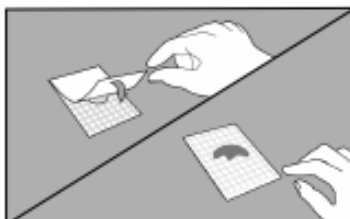
#### Inoculación



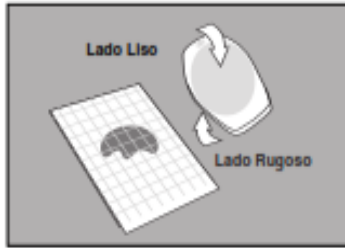
**7** Coloque la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levante la lámina semitransparente superior.



**8** Con la pipeta perpendicular a la Placa Petrifilm, coloque 1 ml de la muestra en el centro de la película cuadrículada inferior.



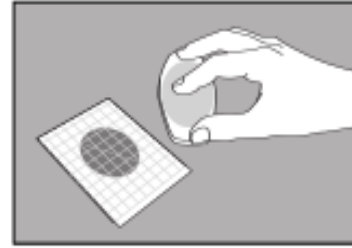
**9** Libere la película superior dejando que caiga sobre la dilución. No la deslice hacia abajo.



**10** Con el lado rugoso hacia abajo, coloque el dispensador o esparcidor sobre la película superior, cubriendo totalmente la muestra.

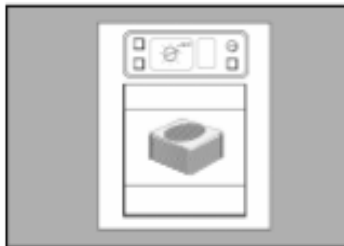


**11** Presione suavemente el dispensador o esparcidor para distribuir la muestra sobre el área circular. No gire ni deslice el dispensador. Recuerde distribuir la muestra antes de inocular una siguiente placa.



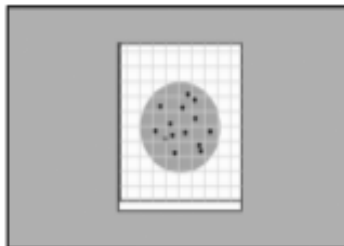
**12** Levante el dispensador o esparcidor. Espere por lo menos 1 minuto a que se solidifique el gel y proceda a la incubación.

## Incubación

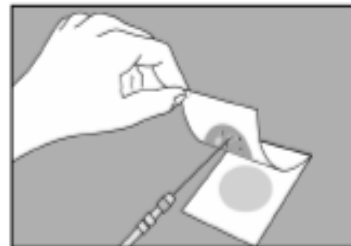


**13** Incube las placas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.

## Interpretación



**14** Las Placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz. Consulte la Guía de Interpretación para leer los resultados.



**15** Las colonias pueden ser aisladas para su identificación posterior. Levante la película superior y recoja la colonia del gel.

El tiempo de incubación y la temperatura varían según el método. Los métodos aprobados más conocidos son:

- **AOAC método oficial 986.33**  
(leche y productos lácteos)  
Incubar 48 hrs. ( $\pm 3$  hrs.) a  $32^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ).
- **AOAC método oficial 990.12**  
Incubar 48 hrs. ( $\pm 3$  hrs.) a  $35^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ).
- **AFNOR método validado 3M 01/1-09/89**  
Incubar 72 hrs. ( $\pm 3$  hrs.) a  $30^{\circ}\text{C}$ .
- **Método MNKL 146.1993**  
Incubar 72 hrs. ( $\pm 3$  hrs.) a  $30^{\circ}\text{C}$ .

## Comentarios adicionales

\* Si tiene dudas o preguntas, llame al 1-851-733-7562 o al Representante de Ventas 3M más cercano a usted.

**3M**

Microbiology Products  
3M Center Bldg. 275-5W-05  
St. Paul, MN 55144-1000  
USA  
1800-228-3957  
microbiology@mmm.com  
www.3M.com/microbiology

3M México  
Av. Santa Fe 55  
Col. Santa Fe, CP 01210  
México, D.F.  
Tel. (55) 5270-0454  
microbiologiamx@mmm.com  
www.3M.com/microbiologia

3M Argentina  
Los Árboles 842  
Hurlingham  
Buenos Aires, Argentina  
Tel. (11) 4469-8200  
microbiologia-ar@mmm.com

Petrifilm es una marca registrada de 3M.  
Impreso en: México.  
Revisión: 2004.  
Referencia: 70-2008-8102-0.

## ANEXO 10

### RECOMENDACIONES DE USO PLACAS PETRIFILM MOHOS Y LEVADURAS

3M™ Petrifilm™  
Levaduras y Mohos



#### Almacenamiento



1 Refrigerar las bolsas cerradas. Usar antes de la fecha de caducidad impresa en la bolsa.



2 Para cerrar las bolsas, doblar los extremos y cerrarlos con celo.



3 Mantener las bolsas cerradas de nuevo a -21 °C, a <50% HR. No refrigerar las bolsas abiertas. Usar las placas Petrifilm en 1 mes desde su apertura.

#### Preparación



4 Preparar una dilución del producto alimenticio a 1: 10 o superior. Pesar o pipetear la muestra en una bolsa Whirlpac, bolsa Stomacher, botella de dilución, o cualquier otro contenedor estéril apropiado.



5 Añadir una cantidad adecuada de diluyente. Pueden ser los métodos standard de tampón fosfato, agua peptonada al 0,1 %, triptona sal, agua destilada, solución salina fosfato tamponada o tampón de Butterfield. No utilizar tampones que contengan citrato de sodio o tiosulfato.

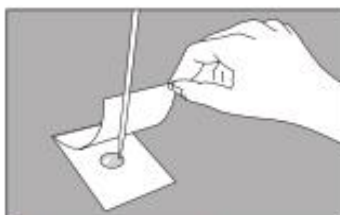


6 Mezclar u homogeneizar la muestra mediante los métodos usuales. Si se requiere una sensibilidad mayor con productos lácteos o zumos consultar el folleto para Petrifilm en productos lácteos y zumos.

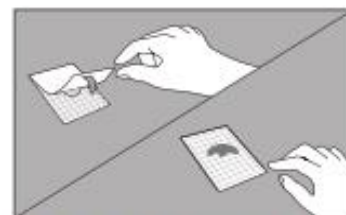
#### Inoculación



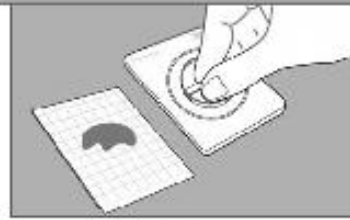
7 Colocar la placa Petrifilm en una superficie plana. Levantar el film superior.



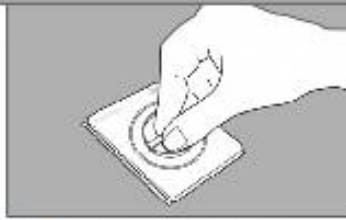
8 Con una pipeta perpendicular a la placa Petrifilm colocar 1 mL de muestra en el centro del film inferior.



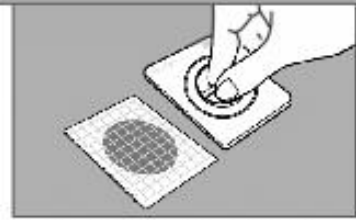
9 Dejar caer el film superior con cuidado evitando introducir burbujas de aire.



**10** Sujetando el aplicador por la barra soporte, colocar el aplicador para Petrifilm levaduras y mohos sobre la placa Petrifilm.

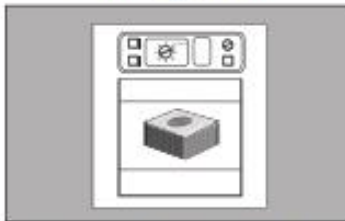


**11** Ejercer una presión sobre el aplicador para repartir el inóculo sobre el área circular. No girar ni deslizar el aplicador.



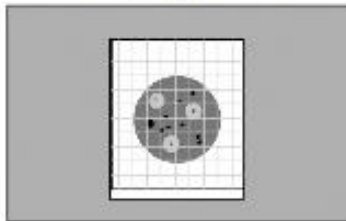
**12** Levantar el aplicador. Esperar un minuto a que solidifique el gel.

## Incubación



**13** Incubar las placas Petrifilm cara arriba en pilas de hasta 20 placas a temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 3-5 días.

## Interpretación



**14** Leer las placas Petrifilm en un contador de colonias standard tipo Quebec o una fuente de luz con aumento. Para leer los resultados consultar la Guía de Interpretación.

## Comentarios adicionales

- los pasos 9 y 10 son únicos para las placas Petrifilm levaduras y Mohos.
- Nota: recordar inocular y poner el aplicador antes de pasar a la siguiente placa.

Date	Version
Février 2004	1.0

**3M**

Microbiology Products  
Laboratoires 3M Santé

Boulevard de l'Oise  
F - 95029 Cergy Pontoise Cedex  
Tél. 01 30 31 85 77

For Europe, please contact:  
Laboratoires 3M Santé  
Tel.: (33) 1 30 31 85 77  
Fax: (33) 1 30 31 85 78

## ANEXO 11

### RECOMENDACIONES DE USO PLACAS PETRIFILM *E. coli*/Coliformes

#### 3M Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli* / Coliformes Recomendaciones de uso

Para información detallada sobre ADVERTENCIAS, PRECAUCIONES, COMPENSACIONES POR GARANTÍA / GARANTÍA LIMITADA, LIMITACIONES POR RESPONSABILIDAD DE 3M, ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN, e INSTRUCCIONES DE USO, remítase al inserto de producto en el paquete.

#### Almacenamiento



**1** Almacene los paquetes cerrados a una temperatura +8 °C (+46 °F). Las placas deben usarse antes de su fecha de caducidad. En áreas de alta humedad, donde la condensación puede ser un inconveniente, es recomendable que los paquetes se atemperen al ambiente del lugar de trabajo antes de abrirlos. Las Placas Petrifilm tienen un tiempo de vida útil de 18 meses desde su fecha de elaboración. Observe la fecha de caducidad en la parte superior de la placa.



**2** Para cerrar un paquete abierto, doble el extremo y séllelo con cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y, por lo tanto, la alteración de las placas.



**3** Mantenga los paquetes cerrados (según se indica en el punto 2) a temperatura +25 °C (+77 °F) y una humedad relativa <math>\leq 50\%</math>. **No refrigere** los paquetes que ya hayan sido abiertos. Utilice las Placas Petrifilm máximo un mes después de abierto el paquete.

#### Preparación de la muestra



**4** Prepare una dilución de una muestra de alimento.\* Pese o pipeteo la muestra en un recipiente adecuado, como una bolsa Stomacher, una botella de dilución o cualquier otro contenedor estéril apropiado. \*Ver las indicaciones para Productos Lácteos y Jugos.



**5** Adicione la cantidad apropiada de uno de los siguientes diluyentes estériles: tampón Butterfield (tampón IDF fosfato, 0.0425 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y con pH ajustado a 7.2); agua de peptona al 0.1%; diluyente de sal peptonada (método ISO 6887); buffer de agua peptonada (método ISO 6579); solución salina (0.85 a 0.90%); caldo lathen libre de bisulfato o agua destilada.



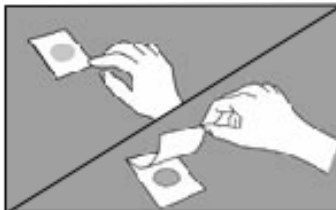
**6** Mezcle u homogenice la muestra mediante los métodos usuales.

Ajuste el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2:

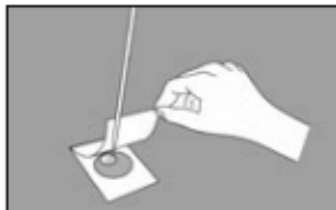
- Para productos ácidos: use solución 1N de NaOH.
- Para productos básicos: use solución 1N de HCl.

No utilice buffers que contengan citrato, bisulfato o fosfato de sodio, porque pueden inhibir el crecimiento.

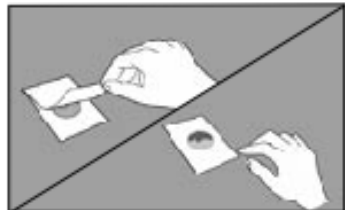
#### Inoculación



**7** Coloque la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levante la película superior.



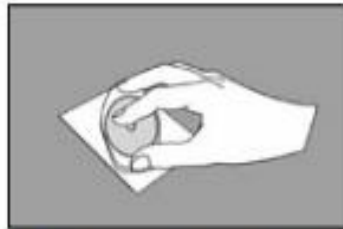
**8** Con la Pipeta Electrónica 3M™, o una pipeta equivalente **perpendicular** a la Placa Petrifilm, coloque 1 mL de la muestra en el centro de la película inferior.



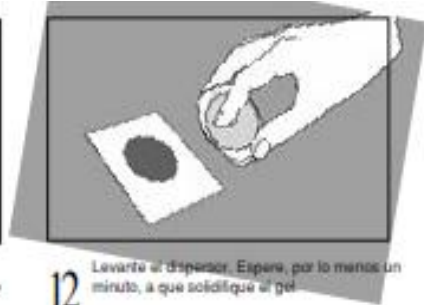
**9** Baje con cuidado la película superior para evitar que atrape burbujas de aire. **No la deje caer.**



**10** Con el lado **liso** hacia abajo, coloque el dispensador en la película superior sobre el inóculo.

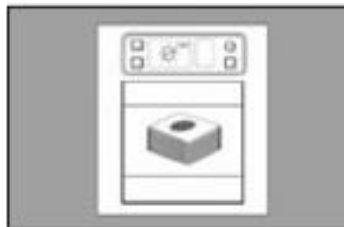


**11** Presione **súavemente** el dispensador para distribuir el inóculo sobre el área circular. No gire. Ni deslice el dispensador.



**12** Levante el dispensador. Espere, por lo menos un minuto, a que solidifique el gel.

### Incubación



**13** Incube las placas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.

### Interpretación



**14** Las Placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz. Consulte la Guía de Interpretación para leer los resultados.



**15** Las colonias pueden ser aisladas para su posterior identificación. Levante la película superior y tome la colonia del gel.

El tiempo de incubación y la temperatura varían según el método. Los métodos aprobados más conocidos son:

- **AOAC método oficial 991.14**  
Para coliformes:  
incubar 24 h  $\pm$  2 h a 35 °C  $\pm$  1 °C.  
Para *E. coli*:  
incubar 48 h  $\pm$  2 h a 35 °C  $\pm$  1 °C.
- **AOAC método oficial 998.08**  
Para *E. coli* (carnes, aves, marinos):  
incubar 24 h  $\pm$  2 h a 35 °C  $\pm$  1 °C.
- **Método NMKL (147.1993)**  
Para coliformes:  
incubar 24 h  $\pm$  2 h a 37 °C  $\pm$  1 °C.  
Para *E. coli*:  
incubar 48 h  $\pm$  2 h a 37 °C  $\pm$  1 °C.

### Comentarios adicionales

- Nota: Recuerde inocular y poner el aplicador antes de pasar a la siguiente placa.
- Para contactar localmente a 3M Microbiología en Latinoamérica, visítenos en nuestra página de internet: [www.3M.com/microbiology](http://www.3M.com/microbiology)
- Para servicio técnico en Latinoamérica, contacte la dirección [serviciotecnico@mmm.com](mailto:serviciotecnico@mmm.com) o llame al 5255-5270-2223.



**3M Microbiology**  
3M Center, Bldg. 275-5W-05  
St. Paul, MN 55144-1000  
USA  
1800-228-3957  
[microbiology@mmm.com](mailto:microbiology@mmm.com)  
[www.3M.com/microbiology](http://www.3M.com/microbiology)

**3M México**  
Av. Santa Fe 190  
Col. Santa Fe, C.P. 01210  
México, D.F.  
Tel. (55-52) 5270-0454  
01 800-712-2527  
[microbiologiamx@mmm.com](mailto:microbiologiamx@mmm.com)

**3M Argentina**  
Olga Cossetini 1031  
Buenos Aires,  
CP C1107CEA  
Argentina  
Tel. (54-11) 4339-2400  
[microbiologia-ar@mmm.com](mailto:microbiologia-ar@mmm.com)

Petrifilm es una marca registrada de 3M.  
Impreso en México.  
Revisión: 2006-01  
Referencia: 70-2006-8105-3.

## ANEXO 12

# MÉTODOS VALIDADOS POR LA AOAC INTERNACIONAL (*Association of Analytical Communities*)

## 3M™ Petrifilm™ Plate Certificates, Recognitions and Validations

3M Food Safety is certified to ISO-9001 for design and manufacturing

### International Recognition

#### ◆ AFNOR

All foods	Aerobic Count Plates	NF Validation Certificate Number 3M 01/1-09/89 (as compared to ISO 4833 method)
All foods (except raw shellfish)	Coliform Count Plates 24 hour total coliform result	NF Validation Certificate Number 3M 01/2-09/89A (as compared to ISO 4832 VRBL method)
		NF Validation Certificate Number 3M 01/2-09/89B (as compared to ISO 4831 MPN method)
All foods	Coliform Count Plates 24 hour thermotolerant coliform result	NF Validation Certificate Number 3M 01/2-09/89C (as compared to V08-000 VRBL at 44°C method)
	Select E. coli Count Plates	NF Validation Certificate Number 3M 01/8-06/01 (as compared to ISO 16649-2 E. coli method)
	Rapid Coliform Count Plates 14 hour result (incubate at 30°C for processed pork products)	NF Validation Certificate Number 3M 01/5-03/97A (as compared to ISO 4832 VRBL 30°C method)
	Rapid Coliform Count Plates 24 hour result (incubate at 30°C for processed pork products)	NF Validation Certificate Number 3M 01/5-03/97B (as compared to ISO 4832 VRBL 30°C method)
All foods (except processed pork products)	Rapid Coliform Count Plates 24 hour result (incubate at 30°C for seafood products)	NF Validation Certificate Number 3M 01/5-03/97C (as compared to ISO 4831 MPN method)
All foods	Enterobacteriaceae Count Plates	NF Validation Certificate Number 3M 01/0-09/97 (as compared to ISO 21528 part 2 VRBG method)
	High-Sensitivity Coliform Count Plates	NF Validation Certificate Number 3M 01/7-03/99 (as compared to ISO 4831 MPN method)
	Staph Express Count System	NF Validation Certificate Number 3M 01/9-04/03 (as compared to EN ISO 6888-1 method)

#### ◆ AOAC® INTERNATIONAL Official Method of Analysis<sup>SM</sup>

Raw and pasteurized milk	Aerobic Count, Coliform Count Plates	Method 980.33
Dairy products	Aerobic Count, Coliform Count Plates	Method 989.10
	High-Sensitivity Coliform Count Plates	Method 996.02
Foods	Aerobic Count Plates	Method 990.12
	Coliform Count, E. coli/Coliform Count Plates	Method 991.14
	Yeast and Mold Count Plates	Method 997.02
	Rapid Coliform Count Plates	Method 2000.15
Poultry, meats and seafood	E. coli/Coliform Count Plates	Method 998.08
Selected foods	Rapid S. aureus Count System	Method 2001.05
	Enterobacteriaceae Count Plates	Method 2003.01
Selected processed and prepared foods	Staph Express Count System	Method 2003.07
Selected dairy foods	Staph Express Count System	Method 2003.08
Selected poultry, meats and seafood	Staph Express Count System	Method 2003.11

Method approval by private or public organizations (e.g., AOAC INTERNATIONAL or AFNOR) does not guarantee the performance of 3M™ Petrifilm™ Plates for any particular food product or process.

To order 3M Petrifilm plates in the U.S., call **1-800-328-1671** • Latin America/Africa regions, call **52255-5270-0454** • Asia Pacific region, call **65-64548611**

### 3M

**3M Food Safety**  
3M Center  
Building 275-5W-05  
St. Paul, MN 55144-1000  
USA  
1-800-328-6553  
www.3m.com/foodsafety

**3M Canada**  
Post Office Box 5757  
London, Ontario N6A 4T1  
Canada  
1-800-364-3577

**3M Europe & MEA**  
3M Deutschland GmbH  
Carl-Schurz – Strasse 1  
D41453 Neuss/Germany  
+49-2131-143000

**3M Latin America**  
3M Center  
Building 275-5W-05  
St. Paul, MN 55144-1000  
1-651-737-2239

**3M Asia Pacific**  
9 Tagore Lane  
Singapore, 787472  
65-6458611

**3M Japan**  
31-1, Tamagardai, 2-Chrome  
Setagaya-Ku, Tokyo  
158-8583, Japan  
81-3-3709-8289

**3M Australia/New Zealand**  
9-15 Chivers Road  
Thornleigh, NSW 2120  
Australia  
1300 363 878

3M and Petrifilm are trademarks of 3M.  
Please recycle. Printed in U.S.A.  
© 3M 2014. All rights reserved.  
70-2008-5431-6



## ANEXO 14

### MATRIZ DE DATOS OBTENIDOS

PAP: 1	ENSALADAS					RESPONSABLE										Fecha de reporte										
						R1										01/10/2014										
	Mesófilos aerobios					CT	CT	CT	CT	CT	EC	EC	EC	EC	EC	Levaduras					Mohos					
	CONTAJE					CONTAJE					CONTAJE					CONTAJE					CONTAJE					
Concentración Agua de plata	Muestra Pura	4ppm		10p pm		Muestra Pura	4ppm		10p pm		Muestra Pura	4ppm		10p pm		Muestra Pura	4ppm		10ppm		Muestra Pura	4 ppm		10 ppm		
Tiempo de contacto		1min	5 min	1min	5 min		1min	5 min	1min	5 min		1min	5 min	1min	5 min		1min	5 min	1min	5 min		1min	5 min	1min	5 min	
CÓDIGO																										
E1	MNPC	67	36	1	3	58	6	0	0	0	0	0	0	0	0	7	22	5	0	0	0	1	0	0	0	
E2	142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	510	21	129	56	82	12	0	0	5	0	
E3	MNPC	320	380	122	135	320	118	6	65	42	0	0	1	0	1	41	128	98	61	58	0	0	0	0	0	
E4	14	4	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	600	510	300	146	122	0	0	0	0	0	
E5	940	600	400	125	82	3400	191	140	47	81	1	0	0	0	0	660	660	98	115	107	0	2	0	4	3	
E6	MNPC	700	620	103	93	MNPC	640	9	240	0	0	0	0	0	0	780	810	540	510	390	6	6	7	9	3	
E7	900	96	50	2	1	42	14	2	3	1	1	0	0	0	0	127	52	47	52	50	0	3	2	2	0	
E8	920	203	145	12	6	75	30	33	14	12	0	0	0	0	0	240	79	47	68	35	5	9	7	1	4	
E9	1020	82	56	25	25	460	3	0	3	0	0	0	0	0	0	480	26	7	13	3	9	4	1	1	0	
E10	1520	700	580	136	108	102	48	43	36	32	0	0	0	0	0	420	300	300	180	240	10	9	4	4	3	
		UFC/gr					UFC/gr										UFC /gr					PROPAGULOS /gr				

Elaborado por D. Bonifaz

PAP: 2		ENSALADAS				RESPONSABLE										Fecha de reporte										
						R2										18/11/2014										
		Mesófilos aerobios				CT	CT	CT	CT	CT	EC	EC	EC	EC	EC	Levaduras				Mohos						
		CONTAJE				CONTAJE					CONTAJE					CONTAJE										
Concentración	Muestra Pura	4ppm		10p pm		Muestra Pura	4ppm		10p pm		Muestra Pura	4ppm		10p pm		Muestra Pura	4ppm		10p pm		Muestra Pura	4ppm		10p pm		
Agua de plata																										
Tiempo de contacto																										
CÓDIGO		1min	5 min	1min	5 min		1min	5 min	1min	5 min		1min	5 min	1min	5 min		1min	5 min	1min	5 min		1min	5 min	1min	5 min	
E1	560	91	110	51	47	93	22	24	35	9	3	1	0	1	0	930	450	510	570	480	0	0	0	0	5	
E2	600	213	187	62	47	116	43	39	31	19	2	0	0	0	0	134	82	76	54	43	10	3	5	3	10	
E3	MNPC	4200	2600	91	60	147	128	131	105	62	26	19	20	3	0	11000	5100	4800	6000	6600	4	3	4	4	4	
E4	MNPC	MNPC	5200	3800	2000	103	107	78	55	51	0	0	0	0	0	MNPC	MNPC	14000	MNPC	15000	4	2	2	1	1	
E6	MNPC	3800	2600	2200	1400	MNPC	2800	1800	2000	2000	0	0	0	0	0	MNPC	14000	14000	15000	15000	3	2	0	7	1	
E7	MNPC	4400	1600	2200	1400	5800	2400	2600	2600	114	0	0	0	0	0	130	12000	11000	84000	72000	8	0	0	1	1	
E8	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	35	2200	1800	3200	MNPC	0	0	0	0	0	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	15	7	14	9	10	
		UFC/gr				UFC /gr					UFC /gr					PROPAGULOS /gr										

PAP: 3		ENSALADAS				RESPONSABLE										Fecha de reporte										
						R3										18/11/2014										
		Mesófilos aerobios				CT	CT	CT	CT	CT	EC	EC	EC	EC	EC	Levaduras				Mohos						
		CONTAJE				CONTAJE					CONTAJE					CONTAJE										
Concentración	Muestra Pura	4ppm		10p pm		Muestra Pura	4ppm		10p pm		Muestra Pura	4ppm		10p pm		Muestra Pura	4ppm		10ppm		Muestra Pura	4ppm		10ppm		
Agua de plata																										
Tiempo de contacto																										
CÓDIGO		1min	5 min	1min	5 min		1min	5 min	1min	5 min		1min	5 min	1min	5 min		1min	5 min	1min	5 min		1min	5 min	1min	5 min	
E1	MNPC	MNPC	6000	2600	1800	15	5	3	4	2	0	0	0	0	0	116	44	35	27	48	2	0	1	4	0	
E2	MNPC	2200	3000	99	99	330	150	96	123	48	0	0	0	0	0	99	38	32	41	22	11	4	3	5	1	
		UFC/gr				UFC /gr					UFC /gr					PROPAGULOS /gr										

Elaborado por D. Bonifaz

PAP: 4		ENSALADAS				RESPONSABLE										Fecha de reporte									
						R4										18/11/2014									
		Mesófilos aerobios				CT	CT	CT	CT	CT	EC	EC	EC	EC	EC	Levaduras				Mohos					
		CONTAJE				CONTAJE					CONTAJE					CONTAJE				CONTAJE					
Concentración	Muestra Pura	4ppm		10p pm		Muestra Pura	4ppm		10p pm		Muestra Pura	4ppm		10p pm		Muestra Pura	4ppm		10p pm		Muestra pura	4ppm		10ppm	
Tiempo de contacto		1min	5 min	1min	5 min		1min	5 min	1min	5 min		1min	5 min	1min	5 min		1min	5 min	1min	5 min		1min	5 min	1min	5 min
CÓDIGO																									
E1	MNPC	MNPC	6000	2600	1800	6600	3800	131	36	27	0	0	0	4	0	3900	4500	3600	3300	105	13	8	8	2	2
E2	MNPC	2200	3000	99	99	68	51	48	59	49	0	0	0	0	0	35	18	15	19	14	0	0	1	0	0
		UFC/gr				UFC /gr										UFC /gr				PROPAGULOS /gr					

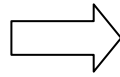
Elaborado por D. Bonifaz

## ANEXO 15

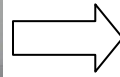
### PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS



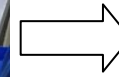
Preparación del material



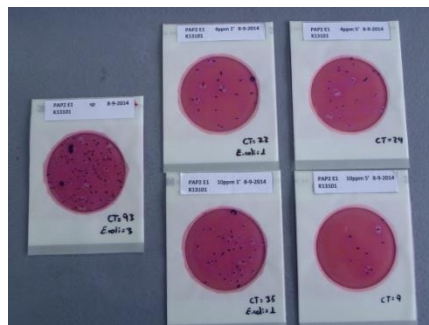
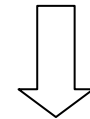
Toma de muestra



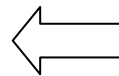
Trituración de la muestra



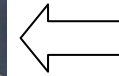
Pesaje de la muestra



Lectura de resultados



Siembra de la muestra



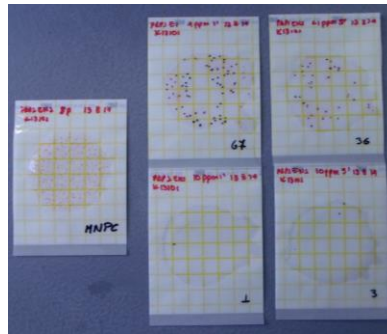
Dilución de la muestra

## ANEXO 16

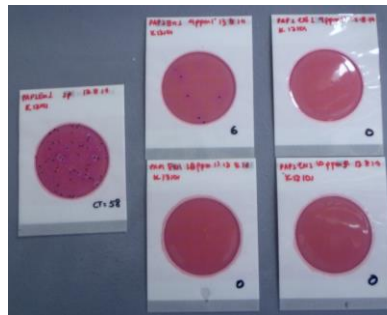
### IMÁGENES RECUENTO FINAL PLACAS PETRIFILM

### IMÁGENES RECUENTO FINAL PLACAS PETRIFILM (PAP 1)

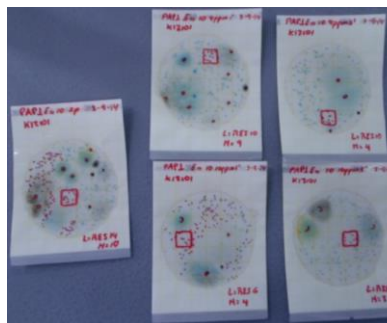
Recuentos Indicadores de  
contaminación



Recuento placas Petrifilm Mesófilos aerobios



Recuento placas Petrifilm *E. coli*/Coliformes

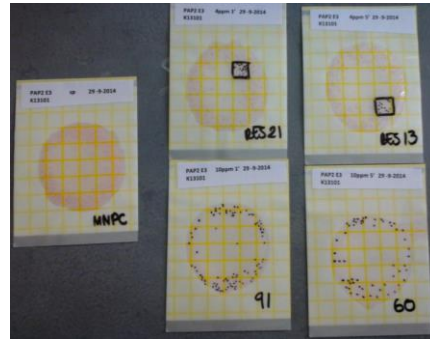


Recuento placas Petrifilm de Mohos y Levaduras

Fotos tomadas por D. Bonifaz

## IMÁGENES RECUENTO FINAL PLACAS PETRIFILM (PAP 2)

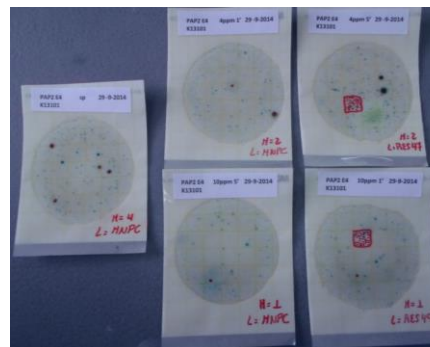
Recuentos Indicadores de contaminación



Recuento placas Petrifilm Mesófilos aerobios



Recuento placas Petrifilm *E. coli*/Coliformes



Recuento placas Petrifilm de Mohos y Levaduras

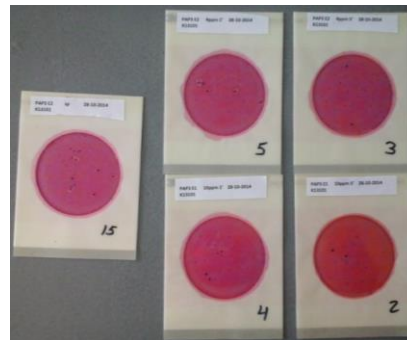
Fotos tomadas por D. Bonifaz

## IMÁGENES RECUENTO FINAL PLACAS PETRIFILM (PAP 3)

Recuentos Indicadores de  
contaminación



Recuento placas Petrifilm Mesófilos aerobios



Recuento placas Petrifilm *E. coli*/Coliformes

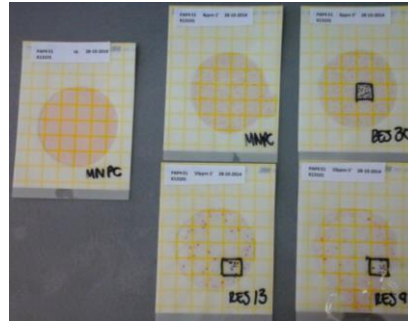


Recuento placas Petrifilm de Mohos y Levaduras

Fotos tomadas por D. Bonifaz

## IMÁGENES RECUENTO FINAL PLACAS PETRIFILM (PAP 4)

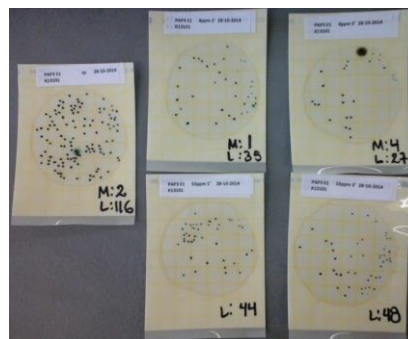
Recuentos Indicadores de  
contaminación



Recuento placas Petrifilm Mesófilos aerobios



Recuento placas Petrifilm *E. coli*/Coliformes



Recuento placas Petrifilm de Mohos y Levaduras

Fotos tomadas por D. Bonifaz