

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN**



**ESCUELA DE POSGRADO**

**TESIS**

**“EFECTO DEL AGUA OZONIZADA SOBRE LA  
REDUCCIÓN MICROBIANA DE  
ESCHERICHIA COLI PRESENTE EN  
HORTALIZAS MINIMAMENTE PROCESADAS  
EN EL MERCADO MODELO DE HUARAL,  
2018”**

**PRESENTADO POR:**

**Ing. CARO DEGOLLAR, Edson Max**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS  
ALIMENTOS**

**ASESOR:**

**Dr. FERNÁNDEZ HERRERA, Fredesvindo**

**HUACHO - 2019**

**“EFECTO DEL AGUA OZONIZADA SOBRE LA REDUCCIÓN  
MICROBIANA DE ESCHERICHIA COLI PRESENTE EN  
HORTALIZAS MINIMAMENTE PROCESADAS EN EL MERCADO  
MODELO DE HUARAL, 2018”**

**Ing. CARO DEGOLLAR, Edson Max**

**TESIS DE MAESTRÍA**

**ASESOR: Dr. FERNÁNDEZ HERRERA, Fredesvindo**

**UNIVERSIDAD NACIONAL**

**JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

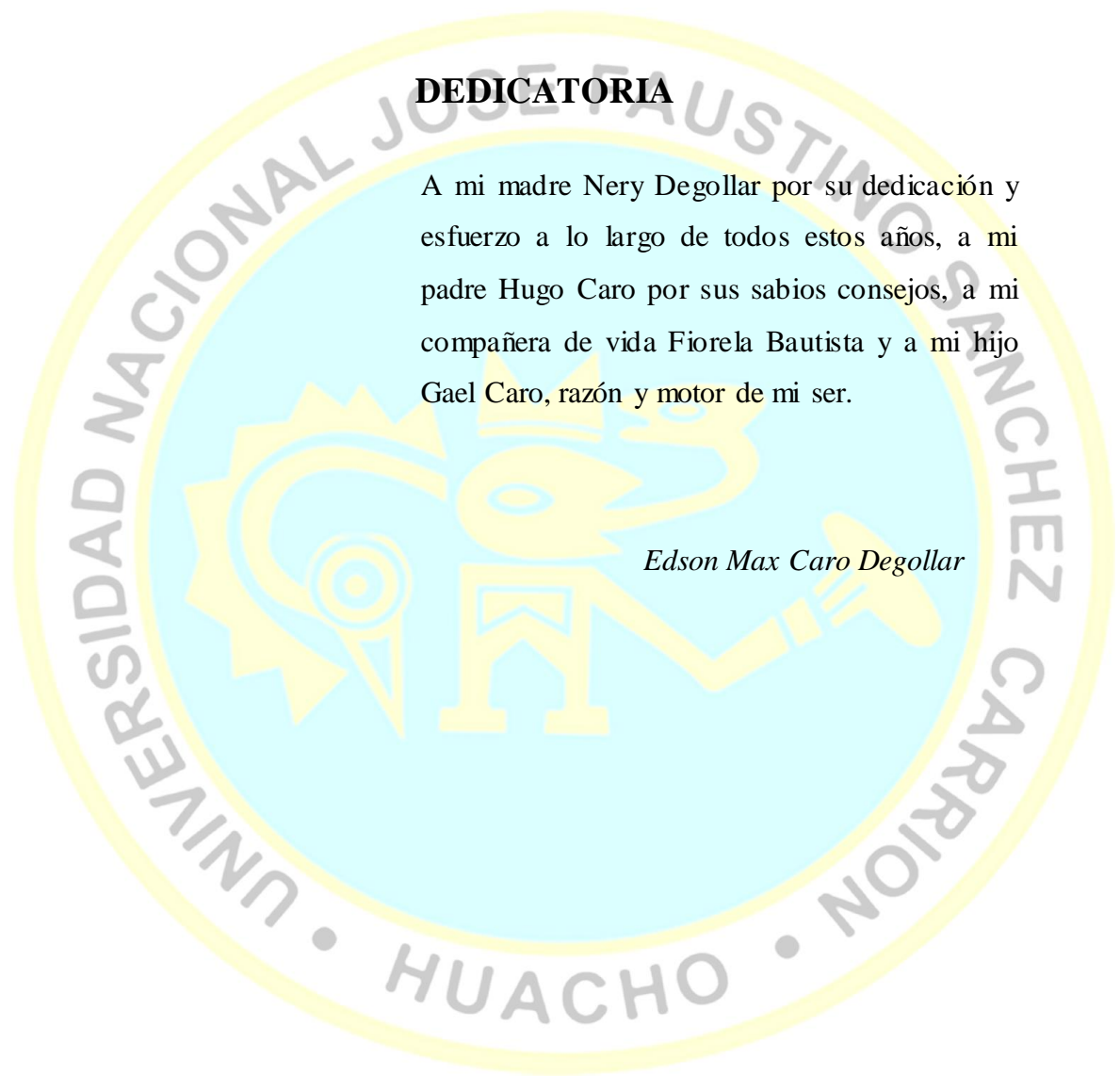
**HUACHO**

**2019**

## **DEDICATORIA**

A mi madre Nery Degollar por su dedicación y esfuerzo a lo largo de todos estos años, a mi padre Hugo Caro por sus sabios consejos, a mi compañera de vida Fiorela Bautista y a mi hijo Gael Caro, razón y motor de mi ser.

*Edson Max Caro Degollar*



## AGRADECIMIENTO

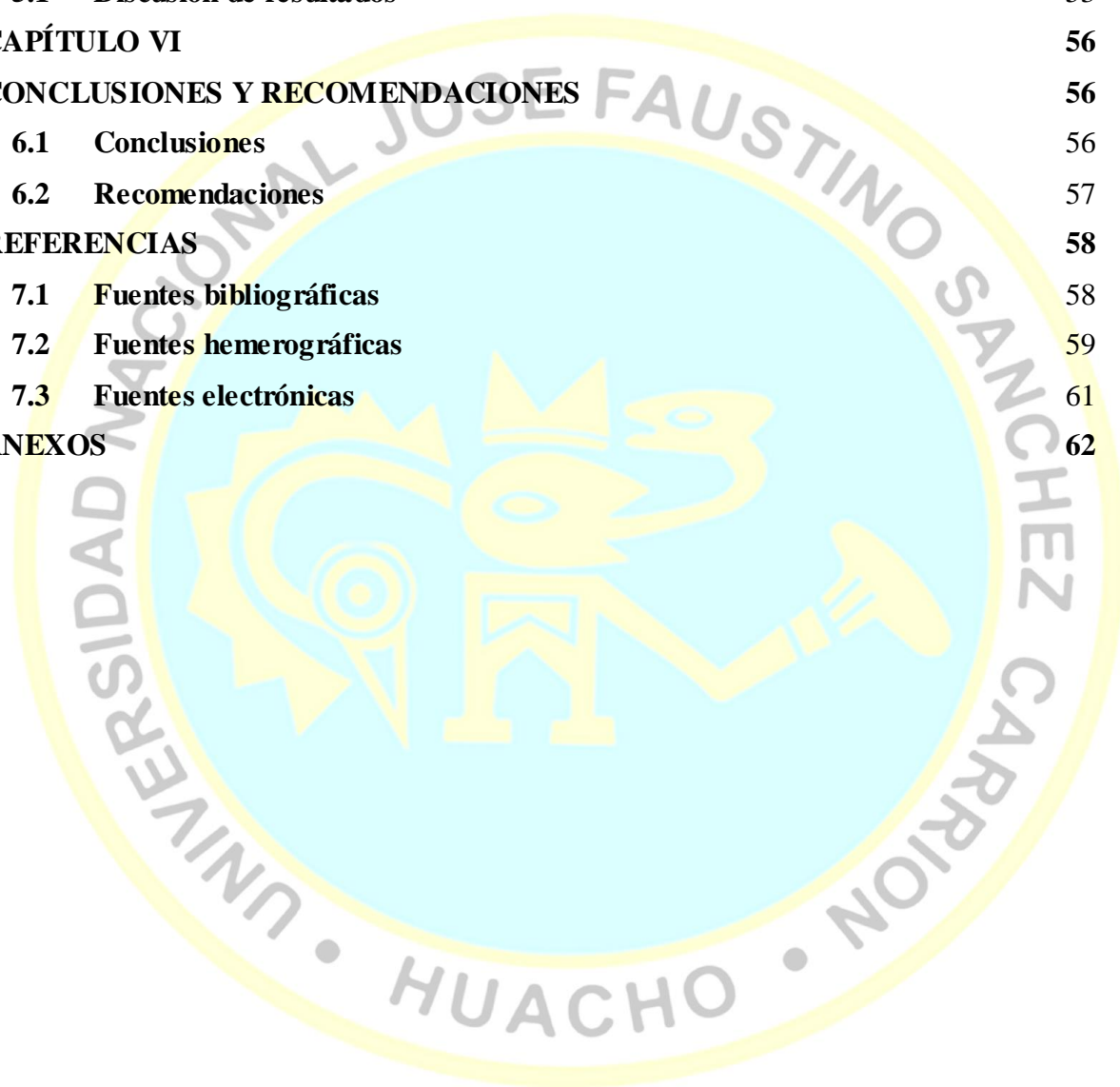
Un agradecimiento especial a mi Asesor Dr. FERNÁNDEZ HERRERA, Fredesvindo por su paciencia y guía en el desarrollo de esta investigación y a la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión por los recursos y facilidades brindadas para el desarrollo de esta tesis.



# ÍNDICE

<b>DEDICATORIA</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>viii</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>1</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Descripción de la realidad problemática</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Formulación del problema</b>	<b>2</b>
<b>1.2.1 Problema general</b>	<b>2</b>
<b>1.2.2 Problemas específicos</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Objetivos de la investigación</b>	<b>3</b>
<b>1.3.1 Objetivo general</b>	<b>3</b>
<b>1.3.2 Objetivos específicos</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Justificación de la investigación</b>	<b>4</b>
<b>1.5 Delimitaciones del estudio</b>	<b>5</b>
<b>1.6 Viabilidad del estudio</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>6</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Antecedentes de la investigación</b>	<b>6</b>
<b>2.1.1 Investigaciones internacionales</b>	<b>6</b>
<b>2.1.2 Investigaciones nacionales</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Bases teóricas</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Definición de términos básicos</b>	<b>28</b>
<b>2.4 Hipótesis de investigación</b>	<b>29</b>
<b>2.4.1 Hipótesis general</b>	<b>29</b>
<b>2.4.2 Hipótesis específicas</b>	<b>29</b>
<b>2.5 Operacionalización de las variables</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>31</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Diseño metodológico</b>	<b>31</b>
<b>3.2 Población y muestra</b>	<b>31</b>
<b>3.2.1 Población</b>	<b>31</b>
<b>3.2.2 Muestra</b>	<b>32</b>

3.3	Técnicas de recolección de datos	32
3.4	Técnicas para el procesamiento de la información	36
<b>CAPÍTULO IV</b>		<b>37</b>
<b>RESULTADOS</b>		<b>37</b>
4.1	Análisis de resultados	37
4.2	Contrastación de hipótesis	50
<b>CAPÍTULO V</b>		<b>53</b>
<b>DISCUSIÓN</b>		<b>53</b>
5.1	Discusión de resultados	53
<b>CAPÍTULO VI</b>		<b>56</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>		<b>56</b>
6.1	Conclusiones	56
6.2	Recomendaciones	57
<b>REFERENCIAS</b>		<b>58</b>
7.1	Fuentes bibliográficas	58
7.2	Fuentes hemerográficas	59
7.3	Fuentes electrónicas	61
<b>ANEXOS</b>		<b>62</b>



## RESUMEN

La investigación tuvo como **objetivo** determinar el efecto de la aplicación del agua ozonizada a diferentes concentraciones y tiempos de contacto sobre la reducción microbiana de *Escherichia coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral. Para la **metodología** se recolectaron e identificaron muestras de hortalizas mínimamente procesadas en el mercado Modelo de Huaral posteriormente se determinó el recuento de *E. coli* de todas las muestras y se seleccionó la muestra crítica, aquella que presentó el mayor recuento de UFC/g, seguidamente se subdividió la muestra crítica y se le aplicaron nueve tratamientos en los que combinamos tres concentraciones de ozono 0.1, 0.5 y 1 mg/L con tres tiempos de inmersión 30, 150 y 300 segundos, para volver a determinar el recuento de *E. coli* post-tratamiento con agua ozonizada. Para el procesamiento de datos se empleó un diseño factorial de  $3^2$  con el que se probó la hipótesis. **Resultados:** En cuanto a la muestra crítica, de las ocho muestras la “A-002” resultó siendo la más alta en recuento de *E. coli* alcanzando hasta los 4.06 Log UFC/g. En cuanto a su aplicación con los nueve tratamientos se obtuvieron las mayores reducciones de hasta 2.58 Log UFC/g a concentraciones de 1 mg/L con 300 segundos de tiempo de inmersión, así como también pequeñas reducciones poblacionales de 0.79 Log UFC/g con concentraciones de 0.1 mg/L con 30 segundos de tiempo de inmersión. **Conclusión:** El agua ozonizada a concentraciones y tiempos de inmersión adecuados tiene un efecto bactericida significativo sobre la población microbiana de *E. coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral. Los parámetros óptimos de concentración de ozono y tiempo de inmersión en agua ozonizada para obtener la máxima reducción poblacional de *E. coli* (2.58 Log UFC/g) presente hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral, son de 1 mg/L y 5 minutos respectivamente.

Palabras clave: Ozonización, reducción poblacional, lechuga, ensaladas de verduras

## ABSTRACT

The **objective** of the research was to determine the effect of ozonated water application at different concentrations and contact times on the microbial reduction of *Escherichia coli* present in minimally processed vegetables in the Huaral model market. For the **methodology**, samples of minimally processed vegetables were collected and identified in the market of Huaral Model, after which the *E. coli* count of all the samples was determined and the critical sample was selected, the one that presented the highest CFU/g count, followed by The critical sample was subdivided and nine treatments were applied in which we combined three concentrations of ozone 0.1, 0.5 and 1 mg/L with three immersion times 30, 150 and 300 seconds, to re-determine the *E. coli* count after - Ozonated water treatment. **Results:** Regarding the critical sample, of the eight samples the "A-002" turned out to be the highest in *E. coli* count reaching up to 4.06 Log CFU/g. Regarding its application with the nine treatments, the highest reductions were obtained of up to 2.58 Log CFU/g at concentrations of 1 mg/L with 300 seconds of immersion time, as well as small population reductions of 0.79 Log CFU/g with concentrations of 0.1 mg/L with 30 seconds of immersion time. **Conclusion:** Ozonized water at adequate concentrations and immersion times has a significant bactericidal effect on the microbial population of *E. coli* present in minimally processed vegetables on the Huaral model market. The optimal parameters of ozone concentration and immersion time in ozonated water to obtain the maximum population reduction of *E. coli* present in minimally processed vegetables in Huaral model market, are 1 mg/L and 5 minutes respectively.

Keywords: Ozonization, population reduction, lettuce, vegetable salads



## INTRODUCCIÓN

El consumo de hortalizas mínimamente procesadas por parte de la población peruana viene marcando las tendencias de los nuevos hábitos de consumo de alimentos saludables y nutritivos debido a la buena imagen que se percibe de las mismas y al gran aporte nutricional que estos brindan sobre todo en vitaminas, sin embargo la presencia ciertas bacterias como la *E. coli* alertan de un problema crítico en estos productos que demandan de acciones eficaces para su prevención o mitigación.

La presente investigación busca determinar el efecto de la aplicación del agua ozonizada a diferentes concentraciones y tiempos de contacto sobre la reducción microbiana de *Escherichia coli* presente en las hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral, además de determinar los parámetros óptimos de concentración de ozono y tiempo de inmersión en agua ozonizada para alcanzar la máxima reducción poblacional de *E. coli*, el trabajo no abordará en las causas que generan el problema de la presencia de *E. coli* en las hortalizas mínimamente procesadas sino más bien en una alternativa para reducir su población.

Nuestro estudio consta de seis grandes bloques en los que tratamos el planteamiento del problema (capítulo I), marco teórico (capítulo II), la metodología empleada para el desarrollo de la investigación (capítulo III), los resultados obtenidos (capítulo IV), las discusiones (capítulo V) y las conclusiones y recomendaciones recogidas (capítulo VI).

# CAPÍTULO I

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1 Descripción de la realidad problemática

El incremento en el consumo de hortalizas frescas por parte de la población viene marcando las tendencias de los nuevos hábitos de consumo de alimentos saludables y nutritivos debido a la buena imagen que se percibe de las mismas y al gran aporte nutricional que estos brindan sobre todo en vitaminas. Esto ha generado que se oferten diversas hortalizas y en distintas presentaciones. Siendo las ensaladas las más populares en los mercados y mercadillos de las ciudades del Perú, los cuales en su gran mayoría están formados por asociaciones de pequeños comerciantes con escasos conocimientos de manipulación de alimentos y deficientes condiciones higiénicas sanitarias en sus establecimientos. Lo que perjudica notablemente la calidad microbiológica de la hortalizas y ensaladas expandidas en mercados (Rivera, Rodríguez, & López, 2009).

Uno de los principales microorganismos indicadores de higiene es la *Escherichia coli* según la R.M. N° 591 del Ministerio de Salud publicado el 2008, sin embargo debemos indicar que existen hasta 7 patotipos de *Escherichia coli* productoras de diarrea (Farfán, Ariza, Vargas, & Vargas, 2016), lo que constituye una gran problemática para la salud. Por ello se han intensificado las campañas para el uso del hipoclorito de sodio como una alternativa para la desinfección, no obstante uno

de los inconvenientes que enfrentan los procesos que emplean al cloro es la aparición de los Sub-productos de la desinfección. La relación de los trihalometanos y otros sub-productos de la desinfección con propiedades mutágenas y cancerígenas en experimentos con seres vivos (Olmedo, 2008), alertan a la población mundial sobre los riesgos de su aplicación.

Muchos mercados internacionales, conscientes del grave problema que atenta contra la salud de su población, tienen altas exigencias y han vetado el consumo de alimentos con trazas de estos sub-productos. Por ello es importante buscar alternativas que aseguren la desinfección de las frutas y hortalizas sin la generación de sustancias nocivas, sobre todo en la reducción a niveles aceptables de las poblaciones de *Escherichia coli* en alimentos crudos de consumo directo que no pasan por tratamiento térmico o no están sometidos a procesos de desinfección como es el caso de las ensaladas expandidas en los mercados y mercadillos del Perú.

## **1.2 Formulación del problema**

### **1.2.1 Problema general**

¿Cuál es el efecto de la aplicación del agua ozonizada a diferentes concentraciones y tiempos de contacto sobre la reducción microbiana de *Escherichia coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral, 2018?

### **1.2.2 Problemas específicos**

¿Cuál es el efecto de la aplicación del agua ozonizada sobre el recuento poblacional de la *Escherichia coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral, 2018?

¿Cuáles son los parámetros óptimos de concentración de ozono y tiempo de contacto del agua ozonizada para obtener la máxima reducción poblacional de *Escherichia coli* presente hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral, 2018?

### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Determinar el efecto de la aplicación del agua ozonizada a diferentes concentraciones y tiempos de contacto sobre la reducción microbiana de *Escherichia coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral, 2018.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

Determinar el efecto de la aplicación del agua ozonizada sobre el recuento poblacional de la *Escherichia coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral, 2018.

Determinar los parámetros óptimos de concentración de ozono y tiempo de contacto del agua ozonizada para obtener la máxima reducción poblacional de *Escherichia coli* presente hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral, 2018.

#### 1.4 Justificación de la investigación

La presente investigación, se justifica en los siguientes ámbitos, descritos a continuación:

Tecnológico: la utilización de ozono disuelto en agua como desinfectante de las hortalizas en cuarta gama, mejorara la tecnología de barreras que requieren estos productos incrementándose la posibilidad de alargar su vida útil en el mercado, sin el riesgo de la formación de los sub-productos de la desinfección generados por el cloro.

Social: la utilización de ozono disuelto en agua como desinfectante de hortalizas en cuarta gama, brindara alimentos de mejor calidad para la población, sin organismos patógenos y sin los riesgos contra la salud por los sub-productos de la desinfección que genera el cloro.

Académico: la utilización de ozono disuelto en agua como desinfectante de las hortalizas en cuarta gama, aporta en las investigaciones académicas acerca del uso industrial del O<sub>3</sub> por tratarse de una aplicación directa en alimentos de consumo frecuente en el Perú.

Ambiental: la utilización de ozono disuelto en agua como desinfectante de las frutas y hortalizas en cuarta gama, minimiza el consumo de recursos naturales y generación de residuos al medio ambiente debido a que se forma a partir del oxígeno del aire y regresa al mismo posterior a su aplicación.

## 1.5 Delimitaciones del estudio

- Temático:
  - Empleo del ozonizador de agua.
  - Recuento de *Escherichia coli* en hortalizas mínimamente procesadas.
  - Desinfección de ensaladas de hortalizas.
- Temporal: 2018
- Geográfico: En la provincia de Huaral, Lima-Perú

## 1.6 Viabilidad del estudio

- Se cuenta con la tecnología y equipos para la producción de agua ozonizada.
- El mercado de modelo de Huaral abastece de ensaladas a los consumidores y brinda una muestra representativa para esta investigación.
- Se tienen disponibles los servicios tercerizados para los análisis microbiológicos de *Escherichia coli* por parte de laboratorios acreditados por el INACAL.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Antecedentes de la investigación**

##### **2.1.1 Investigaciones internacionales**

Tras la revisión de antecedentes internacionales a continuación se presentan algunos estudios muy relacionados con el tema en estudio.

Głowacz & Rees en el 2016 publicaron un artículo titulado “The practicality of using ozone with fruit” donde plantean como principal lineamiento que la búsqueda de las mejores condiciones y dosis; y combinarlo con los materiales de embalaje apropiados es un gran desafío para el ajuste comercial de la tecnología de ozono. El hecho de que cada vez se disponga de más información sobre el uso de ozono como tratamiento post-cosecha en hortalizas es de gran importancia para la industria de productos frescos, ya que en el Reino Unido la evidencia científica se utiliza a menudo para la formulación de políticas y la toma de decisiones. (Głowacz & Rees, 2016)

Łozowicka & Jankowska en el 2016 publicaron un artículo titulado “Comparison of the effects of water and thermal processing on pesticide removal in selected fruit and vegetables” cuyo propósito fue determinar que el ozono disuelto en agua presenta un efecto reductor en la concentración de plaguicidas sobre algunas frutas y verduras, en comparación del Agua Clorada y procesamiento térmico donde se analizaron arándanos, brócoli, fresas y tomates rociados con productos fitosanitarios. El lavado por inmersión en cloro y en agua ozonizada, así como la

ebullición, se usaron para evaluar la eliminación de once pesticidas. Donde se determinó que el lavado con agua ozonizada es más efectivo que el lavado en agua clorada. Sin embargo, la alta temperatura a ebullición causó una disminución significativa en la concentración de la mayoría de los compuestos (hasta 97%). (Łozowicka & Jankowska, 2016)

Ali, Ong, & Forney en el 2014 publicaron un artículo titulado “Effect of ozone pre-conditioning on quality and antioxidant capacity of papaya fruit during ambient storage” cuyo propósito fue determinar las características fisicoquímicas y la actividad antioxidante de la papaya tratada con ozono versus la fruta no tratada. La papaya recién cosechada se expuso continuamente a ozono gaseoso a 0, 1.5, 2.5, 3.5 y 5 ppm durante 96 horas antes del almacenamiento ambiental a  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  y  $70 \pm 5\%$  de humedad relativa (RH) durante 14 días. Donde determinó que la fruta expuesta a 2.5 ppm de ozono tenía niveles más altos de sólidos solubles totales (25%), ácido ascórbico (12.4%), b-caroteno (19.6%), licopeno (52.1%) y actividad antioxidante (30.9%); y también redujo la pérdida de peso (11.5%) en el día 10 en comparación con el control. Los atributos sensoriales de la papaya tratada con 2.5 ppm de ozono fueron superiores en dulzura y aceptabilidad general. Estos resultados respaldan la aplicación del ozono como una técnica de conservación de alimentos no térmica y segura para la papaya, que puede beneficiar tanto a los productores como a los consumidores. (Ali, Ong, & Forney, 2014)

Alwi & Ali en el 2014 publicaron un artículo titulado “Reduction of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* populations on fresh-cut bell pepper using gaseous ozone” cuyo objetivo fue



determinar la eficacia del ozono gaseoso para reducir los patógenos transmitidos por los alimentos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* en pimiento recién cortado. La eficacia del ozono gaseoso para reducir las poblaciones bacterianas se investigó in vitro e in vivo. Donde determino que el efecto óptimo del ozono en la reducción de poblaciones bacterianas se logró con exposiciones a corto plazo de menos de 6 horas. El ozono redujo la población bacteriana al alterar la estructura de las células bacterianas, lo que conduce a la muerte celular. Los resultados también mostraron que las células bacterianas tienen diferente resistencia al ozono donde el ozono fue más efectivo contra *L. monocytogenes*, seguido por *E. coli* y *Salmonella Typhimurium*. La reducción óptima de la población bacteriana en pimiento cortado fresco se logró con la exposición a 9 ppm de ozono durante 6 horas. Este tratamiento redujo 2.89, 2.56 y 3.06 log de poblaciones de *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* y *L. monocytogenes*, respectivamente. Siendo la exposición a 9 ppm de ozono durante 6 horas la que presenta un alto potencial para ser un tratamiento de desinfección alternativo para reducir la población de patógenos en el pimiento recién cortado. (Alwi & Ali, 2014)

Frisón, Vissani, Ocampo, Ponisio, & Basílico en el 2013 publicaron un artículo titulado “Efectos del agua ozonizada sobre microorganismos patógenos y alterantes de frutas y hortalizas” cuyo objetivo fue determinar eficiencia del agua ozonizada para reducir bacterias patógenas como *Bacillus cereus*, *Pseudomonas sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.* y sobre hongos fitopatógenos, micotoxigénicos y alterantes de frutas y hortalizas como *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*, *Alternaria alternata* y *Cladosporium cladosporioides*

en hojas de lechuga y naranjas enteras. Donde se logró determinar que en ensayos sobre hojas de lechuga, que contenían inoculadas *E. coli* en niveles de hasta  $10^6$  células/mL a la cual se sometió a una inmersión con agua ozonizada a 2 ppm, por 5 minutos y sobre naranjas enteras, que contenían inoculadas conidios de los mohos en niveles de  $10^5$  hasta  $10^6$  conidios/mL, con agua ozonizada a 3 ppm por 15 minutos. Donde lograron reducir hasta 3 log la concentración de microorganismos iniciales sin lograr el nivel de 5 log deseado para considerar una sanitización segura. Sin embargo se considera como una alternativa importante como sanitizante puesto que normalmente no se encuentran altas concentraciones de estos microorganismos en estos alimentos (Frisón, Vissani, Ocampo, Ponisio, & Basílico, 2013).

Bialka & Demirci en el 2007 publicaron un artículo titulado “Efficacy of Aqueous Ozone for the Decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on Raspberries and Strawberries” cuyo objetivo fue determinar la eficacia del ozono disuelto en agua como desinfectante para frambuesas y fresas. Donde se inocularon con patógenos a las frutas y luego las trataron con concentraciones acuosas de ozono de 1.7 a 8.9 mg/litro a 20°C durante 2 a 64 min, además probaron con una concentración acuosa de ozono de 21 mg/litro a 4°C durante 64 min, y con agua como control. Determinando que las reducciones máximas de patógenos en frambuesas fueron 5,6 y 4,5 log UFC/g para *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella*, respectivamente, a 4°C, mientras que las reducciones en fresas fueron 2,9 y 3,3 log UFC/g para *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*, respectivamente, a 20 °C después de 64 minutos, mientras que el lavado con agua (burbujeo con aire como control) dio como resultado reducciones de aproximadamente 1 log UFC/g. (Bialka & Demirci, 2007)

### 2.1.2 Investigaciones nacionales

En cuanto a las investigaciones nacionales desarrolladas en base al tema en estudio podemos citar lo siguiente:

Valdiviezo en el 2016 en su tesis “Efecto de la dosis de ozono gaseoso y tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, recuento de mohos y levaduras y aceptabilidad general en racimos de uva (*Vitis vinifera L.*) Variedad red globe” cuyo objetivo fue determinar si existe un efecto favorable en la aplicación de ozono gaseoso en racimos de uva, Red Globe, para ello estableció la aplicación de una dosis de 3 ppm como parte de la metodología experimental. Donde logro reducir la pérdida de peso, mantener la textura, mantener la apariencia general y reducir mohos y levaduras, durante 28 días en los racimos de uva. (Valdiviezo, 2016)

Vasquez, Marquez, & Siche en el 2016 publicaron un artículo titulado “Efecto del ozono gaseoso sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y apariencia general de *Punica Granatum L. wonderful* fresca” cuyo objetivo fue determinar el efecto significativo en la relación de la concentración de ozono gaseoso y el almacenamiento con respecto a la firmeza de la fruta, la pérdida de peso, el contenido de sólidos solubles, el color, el contenido total de antocianinas, el recuento de mohos y levaduras y el aspecto general en la granada. Donde encontraron valores óptimos de concentraciones entre 40 - 50 ppm de ozono gaseoso para un tiempo de almacenamiento de 50 - 55 días con niveles de aceptación favorables para las características fisicoquímicas, microbiológicas y

aparición general de la *Punica Granatum L. wonderful*. (Vasquez, Marquez, & Siche, 2016)

Carrasco en el 2014 en su tesis “Los servicios de comercialización y la calidad de los recursos hidrobiológicos en el mercado Modelo de la Provincia de Huaral” cuyo objetivo fue determinar la situación del mercado Modelo de Huaral para comprobar la aplicación de lo dispuesto en el Decreto Legislativo N° 1062 la ley de inocuidad de los alimentos y su reglamento dado por RM 127-2011. Donde encontró que en cuanto a requerimientos de diseño y construcción de mercados minoristas los puestos de venta no se encuentran aptos para la comercialización de los recursos hidrobiológicos, por la dificultad que tienen para su saneamiento y por el deterioro de sus paredes y pisos los cuales pueden afectar la inocuidad de los productos, de igual forma en cuanto a equipamiento no se encuentran completamente equipados, no cuentan con equipos congeladores para conservar las especies hidrobiológicas, se comprobó que no utilizan la vestimenta adecuada y no practican las buenas prácticas de higiene y manipulación de pescado y productos pesqueros, no cuenta con un sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control. (Carrasco, 2014)

Rivera, Rodríguez, & López en el 2009 publicaron un artículo titulado “Contaminación fecal en hortalizas que se expendan en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú” cuyo objetivo fue determinar el nivel de coliformes fecales y la frecuencia de *Escherichia coli* en más de 80 muestras de hortalizas, obtenidas de los principales mercados de Cajamarca. Donde encontraron que el 40% de muestras presentaron coliformes fecales, además *E. coli* en perejil y lechuga. (Rivera, Rodríguez, & López, 2009)

## **2.2 Bases teóricas**

### **2.2.1 Ozono**

El ozono es un gas que se forma de manera natural en la estratosfera (15-50 km de altitud) como resultado de la radiación UV y solar frente al oxígeno. Se puede producir sintéticamente en procesos fotoquímicos, a partir de radiación UV, arco eléctrico de alta tensión y radiación gamma. El ozono es una forma alotrópica de oxígeno que resulta de la fusión de radicales libres de oxígeno (O); en el oxígeno molecular (O<sub>2</sub>), formando ozono como molécula triatómica (O<sub>3</sub>). El ozono está generando moléculas de oxígeno cuando se exponen a una fuente de alta energía, como la corriente eléctrica a altos voltajes o la radiación ultravioleta. Las moléculas de oxígeno se dividen en los átomos de oxígeno libre que reaccionan con el resto de las moléculas de oxígeno en las moléculas de ozono triatómicas (O<sub>3</sub>). (Dobeic, 2017)

#### **2.2.1.1 Generación de ozono**

El ozono se puede producir sintéticamente mediante uno de los tres procesos: el proceso de descarga eléctrica (corona), el método electroquímico y la radiación ultravioleta (UV). El método más utilizado es la descarga eléctrica (corona). En este proceso, se logra una producción relativamente baja de ozono consumiendo mucha electricidad, mientras que los métodos electroquímicos y UV son incluso menos efectivos. (Dobeic, 2017)

##### **A. El método de descarga eléctrica (corona)**

Este es el método en el cual el aire seco limpiado apropiadamente, o el oxígeno puro (O<sub>2</sub>) fluye entre los dos electrodos de alto voltaje separados por un material dieléctrico. Se necesita electricidad a una tensión de 5000V, que induce un calor

extra alto que, si no se proporciona enfriamiento de electrodos, puede provocar una reversión rápida de la descomposición del ozono en átomos de oxígeno y moléculas, especialmente cuando las temperaturas superan los 35 ° C. El ozono se genera del aire seco, la mezcla de ozono y el resto del aire generalmente contiene de 1 a 3% de ozono y de 3 a 6% de ozono cuando se usa oxígeno puro para la generación de ozono. (Dobeic, 2017)

#### **B. Método electroquímico (plasma frío)**

En este método, la corriente eléctrica pasa entre el ánodo y el cátodo en la solución electrolítica de agua y electroaniones. El resultado de este proceso es la generación de moléculas de ozono y oxígeno en el ánodo. No se necesita suministro de gas y baja tensión de la corriente eléctrica, por lo tanto, el suministro de gas es innecesario y la demanda de energía eléctrica es baja. (Dobeic, 2017)

#### **C. Método ultravioleta (UV)**

La energía de la radiación UV (140-190 nm de longitud de onda) divide las moléculas de oxígeno u oxígeno puro ( $O_2$ ) en átomos de oxígeno que reaccionan con el resto de las moléculas de oxígeno en ozono. Se logran bajas cantidades de ozono mediante este método. (Dobeic, 2017)

#### **2.2.1.2 Factores que influyen en la eficacia del tratamiento con ozono**

La efectividad del ozono contra los microorganismos depende no solo de la cantidad aplicada, sino también del ozono residual en el medio. El ozono residual es la concentración de ozono que se puede detectar en el medio después de la aplicación a la superficie objetivo. Tanto la inestabilidad del ozono bajo ciertas condiciones como la presencia de materiales que consumen ozono afectan el nivel

de ozono residual disponible en el medio. Por lo tanto, es importante distinguir entre la concentración de ozono aplicado y el ozono residual necesario para una desinfección efectiva. Es aconsejable monitorear la disponibilidad de ozono durante el tratamiento. (Pascual, Llorca, & Canut, 2007)

A pesar de los indudables efectos positivos del ozono y las ventajas sobre otros productos químicos en la industria alimentaria, aún no existe una decisión final y un consenso sobre si el ozono puede utilizarse como desinfectante en la industria alimentaria para el saneamiento. A pesar de algunos de los riesgos del uso y la toxicidad moderada, cuando se aplica correctamente y está bajo la supervisión y monitoreo, sigue siendo uno de los desinfectantes alternativos más efectivos en la industria alimentaria. (Dobeic, 2017)

### **2.2.1.3 Efecto del ozono sobre los microorganismos**

La inactivación de bacterias por ozono es un proceso complejo porque el ozono ataca numerosos componentes celulares, incluyendo proteínas, lípidos insaturados y enzimas respiratorias en las membranas celulares, peptidoglucanos en envolturas celulares, enzimas y ácidos nucleicos en el citoplasma, proteínas y peptidoglucanos en capas de esporas y cápsidas de virus. Por lo que se considera al ozono molecular como el principal inactivador de microorganismos, aunque también se enfatiza en la actividad antimicrobiana de los subproductos reactivos de la descomposición del ozono como  $\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^-$  y  $\text{HO}_3$ . El ozono puede oxidar varios componentes de la envoltura celular, incluidos los ácidos grasos poliinsaturados, las enzimas unidas a la membrana, las glicoproteínas y los glicolípidos que conducen a la filtración del contenido celular y eventualmente causan lisis. Cuando los dobles enlaces de los

lípidos insaturados y los grupos sulfhidrilo de las enzimas se oxidan por el ozono, se produce una alteración de la actividad celular normal que incluye la permeabilidad celular y la muerte rápida. (Khadre, Yousef, & Kim, 2001)

Khadre et al. (2001) resumieron los estudios de ozono acuoso en la inactivación de bacterias gram-negativas tratadas con 0.004 a 6.5 ug/mL de ozono acuoso, cuyas poblaciones disminuyeron 0.5 a 6.5 log<sub>10</sub> CFU / mL (tabla 1).

**Tabla 1**

*Inactivación de bacterias gram-negativas por ozono en agua*

Bacteria	Condiciones de tratamiento				Log <sub>10</sub> – unid reducidas
	Ozono (ug/mL)	Tiempo (min)	pH	Temp. (°C)	
<i>Escherichia coli</i>	0.065	0.5			3.5
<i>E. coli</i>	0.004 a 0.8	0.5 a 2.0	6.9		0.5 a 6.5
<i>E. coli</i>	0.19	5	2.8		> 2.0
<i>E. coli</i>	0.23 a 0.26	1.67	7	24	4
<i>E. coli</i>	0.53	0.1	6.8	1	2
<i>E. coli O157:H7</i>	0.3 - 1.0	< 0.5	5.9	25	1.3 - 3.8
<i>Legionella</i>	0.32	20	7	24	> 4.5
<i>peumophila</i>	0.47	20	7	24	> 5.0
<i>L. pneumophila</i>	0.21	5			>2.0
<i>Salmonella</i>					
<i>enteritidis</i>	0.5 a 6.5	0.5		25	0.6 a ~4
<i>S. typhimurium</i>	0.23 a 0.26	1.67	7	24	4.3
<i>Pseudomonas</i>					
<i>fluorescens</i>	0.2 a 1.2	<0.5	5.9	25	0.9 a 5

**Nota.** Recuperado de Khadre et al. (2001)



### 2.2.2 *Escherichia coli*

La *Escherichia coli* se estableció como un patógeno transmitido por los alimentos en 1971 cuando los quesos importados aparecieron en 14 estados de los Estados Unidos que estaban contaminados con una cepa enteroinvasiva que causó enfermedades en casi 400 individuos. Antes de 1971, se notificaron al menos cinco brotes transmitidos por alimentos en otros países, siendo el primero de Inglaterra en 1947. Como patógeno humano, la evidencia sugiere que fue reconocida como una causa de diarrea infantil en el siglo XVIII. Desde los brotes transmitidos por la carne en los Estados Unidos de 1982 y 1993, el estado de esta bacteria como patógeno transmitido por los alimentos es incuestionable. (Monroe, 2000)

#### 2.2.2.1 Clasificación serológica

Las cepas patógenas de *Escherichia* se clasifican serológicamente de la misma manera que otras Enterobacterias. Para el género *E. coli*, se han reconocido más de 200 serotipos O. Debido a que las proteínas flagelares son menos heterogéneas que las cadenas laterales de carbohidratos que forman los grupos O, existen considerablemente menos tipos de antígenos, aproximadamente 30. En función de los síndromes y las características de la enfermedad, y también de su efecto sobre ciertos cultivos celulares y agrupaciones serológicas, se reconocen cinco grupos de virulencia de *E. coli*: enteroagregativo (EAaggEC), enterohemorrágico (EHEC), enteroinvasivo (EIEC), enteropatógeno (EPEC), y enterotoxigénica (ETEC). (Monroe, 2000)

### 2.2.3 Hortalizas mínimamente procesadas.

Las hortalizas son definidas como.

Un conjunto de plantas herbáceas, anuales o perennes, que se consumen como alimento en forma cruda o cocida. Dentro de las hortalizas están incluidas las verduras y legumbres verdes. Las hortalizas son de gran importancia en la alimentación por la cantidad de sales minerales y vitaminas que aportan a la dieta humana. (Cañedo, Alfaro, & Kroschel, 2011, pág. 9)

Así mismo se han identificado y clasificado a las principales hortalizas encontrándose que existen unas 40 en el comercio, pero su número varía de país en país según las costumbres y hábitos de cada población; las más importantes se encuentran identificadas y clasificación según la parte de la planta utilizada, el clima donde crecen, forma de cultivo y la familia o género al que pertenecen en la tabla 2. (Cásseres , 1980)

El término mínimamente procesado (es decir, procesado ligeramente) identifica verduras frescas que han sido cortadas en pequeñas porciones de tamaño de porción y están listas para comer por ejemplo Brócoli (grupo *Brassica oleracea L. Botrytis*), zanahorias (*Daucus carota L.*), lechuga (*Lactuca sativa L.*), espinaca (*Spinacia oleracea L.*) o para cocinar por ejemplo alcachofas (*Cynara scolymus L.*), brócoli, maíz dulce (*Zea mays L. var. rugosa Bonaf.*), patatas peladas (*Solanum tuberosum L.*), etc. El consumo de verduras recién cortadas está aumentando rápidamente y se están desarrollando continuamente nuevos productos. Los cambios demográficos en las próximas décadas prometen aumentar aún más la demanda de verduras recién cortadas. Los consumidores están cada vez más preocupados por la calidad terapéutica y nutritiva de su dieta. La aplicación mínima de productos químicos a

las verduras recién cortadas y su aspecto fresco satisfacen muchas de estas preocupaciones. Las hortalizas recién cortadas que están disponibles comercialmente incluyen brócoli, repollo, zanahorias, lechuga, papas, espinacas, las alcachofas, los pepinos, las cebollas (*Allium cepa L.*) y los tomates. (Saltveit, 2003)

**Tabla 2**

*Principales hortalizas según la parte de la planta utilizada*

<b>Parte de la planta</b>	<b>Hortaliza</b>
Frutos que son hortalizas	Ají o chile, berenjena, chayote, cucúrbitas(ayote), melón, sandía, pepino, oca y tomate
Tallos, brotes y flores	Alcachofa, brócoli, coliflor, espárrago, repollito de bruselas y repollo
Pecíolos y hojas como hortalizas	Acelga, apio, espinaca, lechuga, mostaza y ruibarbo
Semillas tiernas de cereales como hortalizas	Maíz dulce (choclos, elotes)
Hortalizas de vaina y semilla tierna	Arveja, frijol de costa o rabisa, frijol de lima, gandul haba y vainita (poroto verde)
Hortalizas de bulbo	Ajo, cebolla y puerro
Hortalizas de raíz	Nabo, remolacha, rábano y zanahoria
Tubérculos, rizomas y raíces tropicales	Camote, malanga, ñame, papa, yautía y yuca.

**Nota.** Recuperado de Producción de Hortalizas de Cásseres, (1980).

Si se envasa en películas altamente permeables al oxígeno, las principales preocupaciones son la calidad del producto y el pardeamiento enzimático en el caso de los productos de color claro. Sin embargo, cuando se utiliza un empaque de baja permeabilidad al O<sub>2</sub> con el almacenamiento a largo plazo, existe la posibilidad de que crezcan patógenos microbianos como *C. botulinum* y *L. monocytogenes*. Esta preocupación ha llevado a numerosos cuestionamientos sobre la seguridad del producto final. (Monroe, 2000)

#### **2.2.4 Mercado modelo de Huaral.**

Es un mercado minorista denominado mercado Modelo de Huaral, del cual podemos indicar.

Que el mercado se encuentra ubicado en el departamento de Lima, Provincia de Huaral, Distrito de Huaral, siendo sus coordenadas geográficas: Latitud 11° 30' 05, 1866" Sur y Longitud 77° 12, 14,37" Oeste. Y colinda por el norte con la calle Luis Felipe Subauste Del Rio, por el este con la calle Camino Viejo Jesús Del Valle, por el sur con la Prolongación Zapata y por el oeste con la Prolongación Remigio Morales Bermúdez. Además cuenta con un área de venta ropa y calzados, una zona de venta de materiales de ferretería, un área de venta de comida, un área de venta de carnes de aves, de res y de cerdo y un área de venta de recursos hidrobiológicos. (Carrasco, 2014, pág. 70)

Como se observa en la figura 1 el mercado modelo de Huaral se encuentra ubicado en una gran extensión al sur de la ciudad.



**Figura 1.** Mapa del mercado Modelo de Huaral recuperado de Google maps s.f. (Google, 2018)

En el mercado de Modelo de Huaral se puede adquirir las principales hortalizas cultivadas en el departamento de Lima como se indica en la tabla 3, sin embargo también es posible adquirir hortalizas provenientes de todas partes del Perú las mismas que primero llegan a los mercados mayoristas de la capital y luego son enviados al mercado de modelo de Huaral.

**Tabla 3***Producción de hortalizas, en el departamento de Lima, 2016*

<b>Hortalizas</b>	<b>Toneladas Métricas</b>
Ají	10 510
Ajo	8 751
Albahaca	18
Alcachofa	6 774
Apio	4 826
Betarraga	4 357
Brócoli	29 473
Caigua	825
Col o repollo	7 691
Coliflor	11 115
Culantro	5 846
Espinaca	2 510
Lechuga	27 106
Nabo	41
Pallar grano verde	4 510
Pepinillo	15 107
Pimiento	4 516
Poro	2 885
Rabanito	16
Rocoto	20
Vainita	12462
Zanahoria	35017
Zapallo	19 213

**Nota.** Recuperado de Perú Compendio Estadístico 2017 del Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI).

### **2.2.5 Reglamento Sanitario de Funcionamiento de Mercados de Abasto (Resolución Ministerial N° 282-2003-SA/DM)**

En el año 2003 se emitió la Resolución Ministerial N° 282-2003-SA/DM - Reglamento Sanitario de Funcionamiento de Mercados de Abasto cuyos objetivos son asegurar la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos, establecer los requisitos operativos y de buenas prácticas así como de establecer los requisitos mínimos que deben cumplir los mercados. En el Título III referido a las buenas prácticas de manipulación, en el artículo 19° se establecen las prácticas de aseo que deberán cumplir los manipuladores así como las prohibiciones (comer, fumar, escupir, tomar licor, usar maquillaje, perfumes, etc.), en el artículo 20° se establece la vestimenta adecuada que deben emplear los manipuladores de alimentos. De igual forma en el Artículo 30° referido a la comercialización de frutas y hortalizas detalla que: “las hortalizas deberán mantenerse en buen estado de limpieza, integridad, color natural y frescura, hasta el momento de la venta” (p. 246766). En su Artículo 31° referido a los Puestos de frutas y hortalizas enmarca las características y operaciones del puesto de comercialización como son; el uso tarimas o parihuelas, el material de los mostradores, andamios, tarimas y parihuelas que sean de materiales sanitarios de fácil limpieza, el empaque de expendio deberá hacerse en bolsas de plástico nuevas. **(Ministerio de Salud del Perú, 2003)**

También se establece en el Anexo 2 del Reglamento Sanitario de Funcionamiento de Mercados de Abasto las características de aceptación y rechazo para los vegetales frescos (tabla 4).

**Tabla 4***Características sensoriales de aceptación y rechazo de los vegetales frescos*

<b>Alimento</b>	<b>Características aceptables</b>	<b>Características de rechazo</b>
Hortalizas	Las verduras de hoja no deben haber floreado (excepto la coliflor y el brócoli). Hojas verdes, enteras, brillantes, sin haber alcanzado la lignificación (estado leñoso)	Secas o pegajosas, olor desagradable. Hojas amarillas o con pigmentación negruzca. Atacadas por insectos, larvas, moluscos (caracoles) u hongos. Cubiertas de tierra u otras materias extrañas.
Frutas	Limpias, enteras.	Secas o magulladas, color pálido o negruzco, no característico. Mordidas o picadas, sin parásitos.
Tubérculos, raíces y bulbos	Firmes al tacto.	Secos o blandos, con brotes, picados. Las papas no deben estar verdosas. Cubiertos de tierra.

**Nota.** Recuperado del Reglamento Sanitario de Funcionamiento de Mercados de Abasto (Resolución Ministerial N° 282-2003-SA/DM)



## **2.2.6 Norma Sanitaria que Establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano (Resolución Ministerial N° 591-2008/MINSA)**

En el 2008 se emitió la Resolución Ministerial N°591-2008/MINSA que establece: “las condiciones microbiológicas de calidad sanitaria e inocuidad que deben cumplir los alimentos y bebidas en estado natural, elaborados o procesados, para ser considerados aptos para el consumo humano” (p.1).

Dentro del apartado de las disposiciones generales de la RM N°591-2008/MINSA se establece la conformación de los criterios microbiológicos los cuales están constituidos por; el grupo de alimento al que se aplica el criterio microbiológico, los agentes microbianos, el plan de muestreo que ha de aplicarse al alimentos y los límites microbiológicos establecidos para los grupos de alimentos.

En el ítem 5.6 de la RM N° 591-2008/MINSA se agrupan a los microorganismos en tres categorías; microorganismos indicadores de alteración donde se detallan a los microorganismos asociados con la alteración y pérdida de vida útil, microorganismos indicadores de higiene donde se especifican microorganismos no patógenos asociados a falta de higiene y finalmente microorganismos patógenos donde se especifican a aquellos que pueden causar daño a la salud. En el caso de la E. coli estará presente en las categorías de microorganismos indicadores de higiene y en patógenos con el patotipo H7:O157.

En el ítem 6.1 de la RM N° 591-2008/MINSA se establecen los grupos de alimentos en base a su afinidad por distintos aspectos los cuales son:

- Leche y productos lácteos,
- Helados y mezclas para helados,
- Productos grasos,
- Productos deshidratados, liofilizados o concentrados y mezclas,
- Granos de cereales, leguminosas y derivados,
- Azúcares, mieles y productos similares,
- Productos de confitería y derivados del cacao,
- Productos de panadería, pastelería, galletería y otros,
- Alimentos para regímenes especiales,
- Carnes y productos cárnicos
- Productos hidrobiológicos
- Huevos y ovoproductos
- Especias, condimentos y salsas,
- Frutas, hortalizas y frutos secos,
- Comidas preparadas,
- Bebidas
- Estimulantes y fruitivos
- Semiconservas
- Conservas

En el caso de las hortalizas mínimamente procesadas es posible encontrarla en dos grupos. El grupo de Frutas, hortalizas y frutos secos el que establece los siguientes sub-grupos:

- Frutas y hortalizas frescas. (sin ningún tratamiento)
- Frutas y hortalizas frescas semiprocesadas (lavadas, desinfectadas, peladas, cortadas y/o precocidas), refrigeradas y/o congeladas. Donde encontramos a la

*E.coli* como un bioindicador para las hortalizas mínimamente procesadas regulado por la RM N°591-2008/MINSA (Tabla5)

- Frutas y hortalizas desecadas, deshidratadas o liofilizadas.
- Frutas y hortalizas en vinagre, aceite o salmuera o fermentadas.

**Tabla 5**

*Criterios microbiológicos para frutas y hortalizas frescas semiprocesadas.*

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g.	
					m	M
Aerobios Mesofilos	1	3	5	3	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	2	10	10 <sup>2</sup>
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia/25 g	--
<i>Listeria monocytogenes</i> (*)	10	2	5	0	Ausencia/25 g	--

(\*) Solo para frutas y hortalizas de tierra (a excepción de las pre-cocidas)

**Nota.** Recuperado de la Resolución Ministerial N° 591-2008/MINSA

Sin embargo también se tiene el grupo de las comidas preparadas donde también es posible encontrar a las hortalizas mínimamente procesadas con la denominación de ensaladas crudas y que además establece los siguientes sub-grupos:

- Comidas Preparadas sin tratamiento térmico (ensaladas crudas, mayonesas, salsa de papa huancaína, ocopa, postres, jugos, otros). Comidas preparadas que llevan ingredientes con y sin tratamiento térmico (ensaladas mixtas, palta rellena, sándwiches, cebiche, postres, refrescos, otros). Donde

también encontramos a la *E. coli* como un bioindicador para las ensaladas crudas (Tabla 6).

- Comidas preparadas con tratamiento térmico (ensaladas cocidas, guisos, arroces, postres cocidos, arroz con leche, mazamorra, otros)

**Tabla 6**

*Alimentos preparados sin tratamiento térmico - ensaladas crudas.*

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g.	
					m	M
Aerobios Mesofilos	2	3	5	2	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
<i>Coliformes</i>	5	3	5	2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
<i>Staphylococcus aureus.</i>	5	3	5	2	10	10 <sup>2</sup>
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	2	10	10 <sup>2</sup>
<i>Salmonella sp.</i>	10	3	5	0	Ausencia/25 g	--

**Nota.** Recuperado de la Resolución Ministerial N° 591-2008/MINSA

## 2.3 Definición de términos básicos

1. Alotropía: es una de dos o más formas diferentes de un elemento los cuales presentan diversas propiedades químicas. (Chang & College, 2002)
2. Antimicrobiano: "...es una sustancia que puede hacer más lento el crecimiento microbiano o impedirlo totalmente". (Schlegel, 1997, pág. 222)
3. Calidad: "propiedad o conjunto de propiedades inherentes a algo, que permiten juzgar su valor." (Real Academia Española, 2014)
4. Desinfectar: "Quitar a algo la infección o la propiedad de causarla, destruyendo los gérmenes nocivos o evitando su desarrollo". (Real Academia Española, 2014)
5. Ebullición: "...se realiza en la interfase sólido-líquido cuando un líquido se pone en contacto con una superficie que se mantiene a una temperatura superior a la de saturación del líquido". (Çengel & Boles, 2012, pág. 151)
6. Electrolito: "...es una sustancia que, cuando se disuelve en agua, forma una disolución que conduce la electricidad". (Chang & College, 2002, pág. 106)
7. Espora: "Forma de resistencia que adoptan las bacterias ante condiciones ambientales desfavorables". (Real Academia Española, 2014)
8. Fotoquímica: "Rama de la química que estudia la interacción entre las radiaciones luminosas y las moléculas, así como los cambios físicos y químicos que resultan de ella". (Real Academia Española, 2014)
9. Inocuo: "que no hace daño". (Real Academia Española, 2014)
10. Patógenos: es agente biológico que causa perjuicio a su hospedador. (Schlegel, 1997)

## 2.4 Hipótesis de investigación

### 2.4.1 Hipótesis general

Existe una relación significativa entre aplicación del agua ozonizada a diferentes concentraciones y tiempos de inmersión, y la reducción microbiana de *Escherichia coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral, 2018.

### 2.4.2 Hipótesis específicas

La aplicación del agua ozonizada reducirá el recuento poblacional de *Escherichia coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral, 2018.

Los parámetros óptimos de concentración de ozono y tiempo de inmersión en agua ozonizada para obtener la máxima reducción poblacional de *Escherichia coli* presente hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral, 2018 estarán en función del menor recuento microbiológico.

## 2.5 Operacionalización de las variables

Variable Independiente: (CAUSA)

Aplicación del agua ozonizada.

Variable Dependiente: (EFECTO)

Población microbiana de *Escherichia coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas

**Tabla 7**

*Operacionalización de variables*

VARIABLES	CONCEPTUALIZACIÓN DE LA VARIABLE	DIMENSIÓN DE LA VARIABLE	INDICADORES
<b>Independientes</b>			
Aplicación del agua ozonizada.	Ozono disuelto en agua aplicado en alimentos para destruir gérmenes, como virus, bacterias y otros microbios que pueden causar infecciones y enfermedades.	Método de Desinfección	Concentración de Ozono.  Tiempo de contacto del Agua Ozonizada.
<b>Dependiente</b>			
Reducción microbiana de <i>Escherichia coli</i> presente en hortalizas mínimamente procesada	Cantidad de microorganismos de tipo <i>E. coli</i> presentes en hortalizas mínimamente procesadas por causa de la contaminación.	Inocuidad Alimentaria	Recuento de <i>Escherichia coli</i>  Límite Máximo Permisible

**Fuente:** Elaboración propia

## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA

#### 3.1 Diseño metodológico

**Tipo de investigación:** correlacional, ya que se encontró la relación de causa y efecto entre las variables independientes (concentración de ozono en agua y tiempo de inmersión) con la variable dependiente (reducción poblacional de la *E. coli*).

**Diseño de investigación:** experimental, porque se manipuló las variables independientes sobre una determinada muestra a fin de evaluar su efecto sobre una variable dependiente.

#### 3.2 Población y muestra

##### 3.2.1 Población

La población o universo que constituyó esta investigación correspondió a las hortalizas mínimamente procesadas y expandidas en el mercado modelo de Huaral durante el periodo de estudio.



### **3.2.2 Muestra**

Para la investigación se consideró el número de puestos de venta de hortalizas mínimamente procesadas y a partir de ello la cantidad necesaria de unidades cerradas de hortalizas mínimamente procesadas (bolsas cerradas) que fue necesario para el estudio de cada uno de los puestos.

### **3.3 Técnicas de recolección de datos**

Se recolectó los datos de forma ordenada partiendo de la secuencia descrita a continuación:

#### **A. Recolección e identificación de muestras.**

De cada uno de los puestos que expenden hortalizas mínimamente procesadas en el mercado Modelo de Huaral se tomó un acumulado en unidades cerradas de aproximadamente 8 kg de muestra, los cuales son expendidos en bolsas de polipropileno de 1 kg.

A partir de ello se realizó la respectiva identificación (Tabla 8), pesado y almacenamiento en refrigeración y se envió al laboratorio de Frutas y Hortalizas de la Facultad de Ingeniería Agraria, Industrias Alimentarias y Ambiental de la UNJFSC.

**Tabla 8**

*Identificación de muestras por puesto de venta de hortalizas mínimamente procesadas en el mercado Modelo de Huaral.*

N°	Código de Muestra
Puesto de venta 1	A-001
Puesto de venta 2	A-002
Puesto de venta 3	A-003
Puesto de venta 4	A-004
Puesto de venta 5	A-005
Puesto de venta 6	A-006
Puesto de venta 7	A-007
Puesto de venta 8	A-008

**Fuente:** Elaboración propia

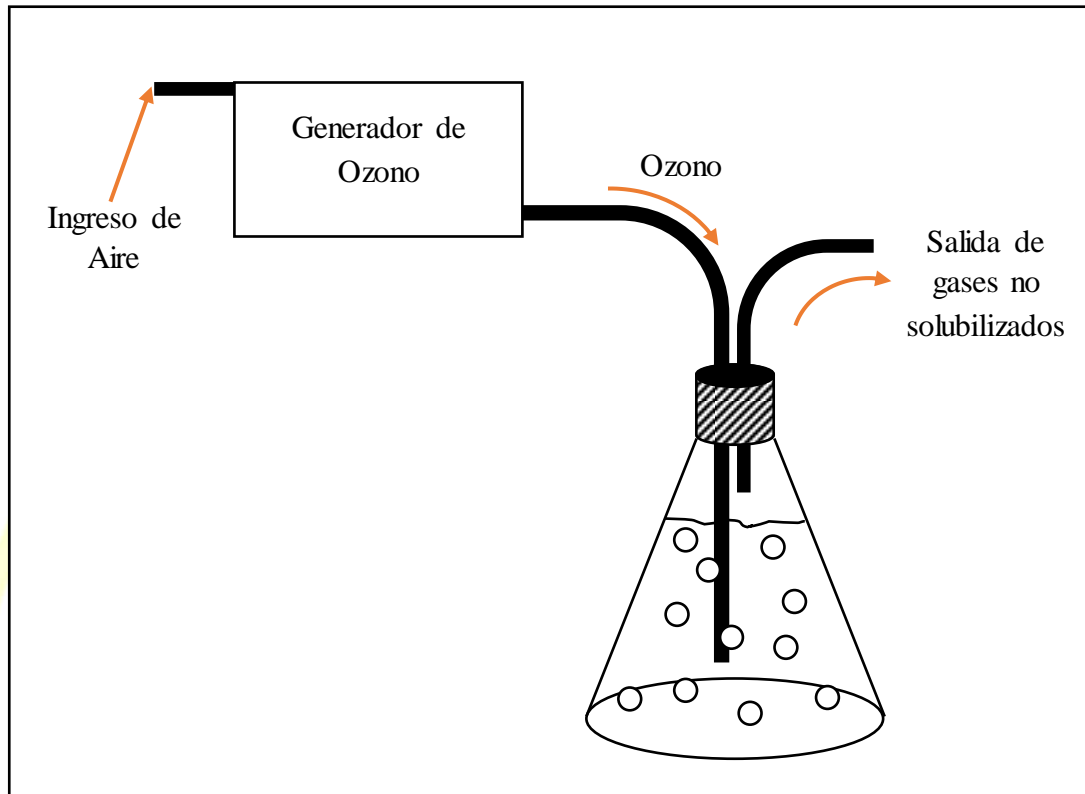
#### **B. Determinación de *E. coli* y selección de muestra crítica.**

En el laboratorio se procedió a determinar microbiológicamente el recuento de *E.coli* a cada una de las muestras y se siguió la metodología del AOAC empleando Rapid *E. coli* /Coliform Count Plate - Petrifilm® 3M descrita en el Anexo 3. Pasado el periodo de incubación se realizó la selección de la muestra más crítica es decir la que presentó mayor recuento de UFC/g, y se sometió a la aplicación del ozono.

#### **C. Calibración del ozonizador.**

A partir de las especificaciones del equipo Ozonizador OZ2PCS de la marca OZOTECH (Anexo 1) que indica una capacidad de generación de ozono de hasta 0.2 gramos/hora a partir de aire, se realizó la medición de concentración de ozono en agua empleando el CHECKIT® Lovibond (Anexo 4) y de manera simultánea se

controló el tiempo transcurrido para proceder a realizar la correlación de ozono vs tiempo para un litro de agua no clorada en un contenedor de vidrio cerrado con un orificio pequeño para la salida de gases.



**Figura 2.** Esquema del sistema de generación de ozono y aplicación en sistema cerrado.

#### **D. Ozonizado de sub-muestras a partir de muestra crítica.**

A partir de la muestra crítica se sub-dividió la muestra pesándose pequeñas unidades de 10 g y se sometió al proceso de ozonizado por triplicado.

En el contenedor de vidrio cerrado alcanzada la concentración de ozono dado por el tratamiento (tabla 9) se procedió a añadir la sub-muestra de hortalizas mínimamente procesada y se dejó en inmersión por un lapso de tiempo especificado por el tratamiento.

**Tabla 9**

*Especificación de los tratamientos a emplear para la reducción microbiana de E. coli presente en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado Modelo de Huaral.*

Tratamientos	Ozono (mg/L)	Tiempo (seg)
1	0.1	30
2	0.1	150
3	0.1	300
4	0.5	30
5	0.5	150
6	0.5	300
7	1	30
8	1	150
9	1	300

**Fuente:** Elaboración propia

Como se aprecia en la tabla 9 el ozonizado se realizó con nueve tratamientos en los que se combinó tres concentraciones de ozono 0.1, 0.5 y 1 ppm O<sub>3</sub> con tres tiempos de inmersión 0.5, 2.5 y 5 minutos además también se tuvo un blanco a quien no se le realizó tratamiento alguno.

**E. Determinación del recuento en placa y reducción poblacional de la E. coli por cada Tratamiento.**

Las sub-muestras ozonizadas fueron enviadas al laboratorio donde se procedió a determinar microbiológicamente el recuento de E. coli, y se siguió la metodología del AOAC empleando Rapid E. coli /Coliform Count Plate - Petrifilm® 3M descrita en el Anexo 3. Pasado el periodo de incubación se realizó el recuento

UFC/g y expresión en logaritmo base 10, para determinar la reducción poblacional en base a la diferencia del valor reportado por la muestra crítica y el reportado por cada tratamiento.

### 3.4 Técnicas para el procesamiento de la información

Para el procesamiento de la información se empleó un diseño factorial  $3^2$  con nueve tratamientos y tres replicas codificado como se indica en la Tabla 10.

**Tabla 10**

*Signos del diseño factorial  $3^2$  aplicado a las variables en estudio.*

Tratamiento	Ozono (mg/L)	Tiempo (seg)	Ozono (mg/L)	Tiempo (seg)	Ozono (mg/L)	Tiempo (seg)
1	Bajo	Bajo	-1	-1	0.1	30
2	Bajo	Medio	-1	0	0.1	150
3	Bajo	Alto	-1	+1	0.1	300
4	Medio	bajo	0	-1	0.5	30
5	Medio	medio	0	0	0.5	150
6	Medio	alto	0	+1	0.5	300
7	Alto	bajo	+1	-1	1	30
8	Alto	medio	+1	0	1	150
9	Alto	Alto	+1	+1	1	300

**Fuente:** Elaboración propia

Así mismo se empleó la estadística para determinar datos como la moda, mediana, varianza, análisis de varianza (ANVA), prueba de Tukey y regresión múltiple respecto a los recuentos de *Escherichia coli* con los diversos tratamientos y para la comprobación de la hipótesis respectiva. Para facilitar el análisis estadístico se utilizó el programa Statistica 10 versión de prueba.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1 Análisis de resultados

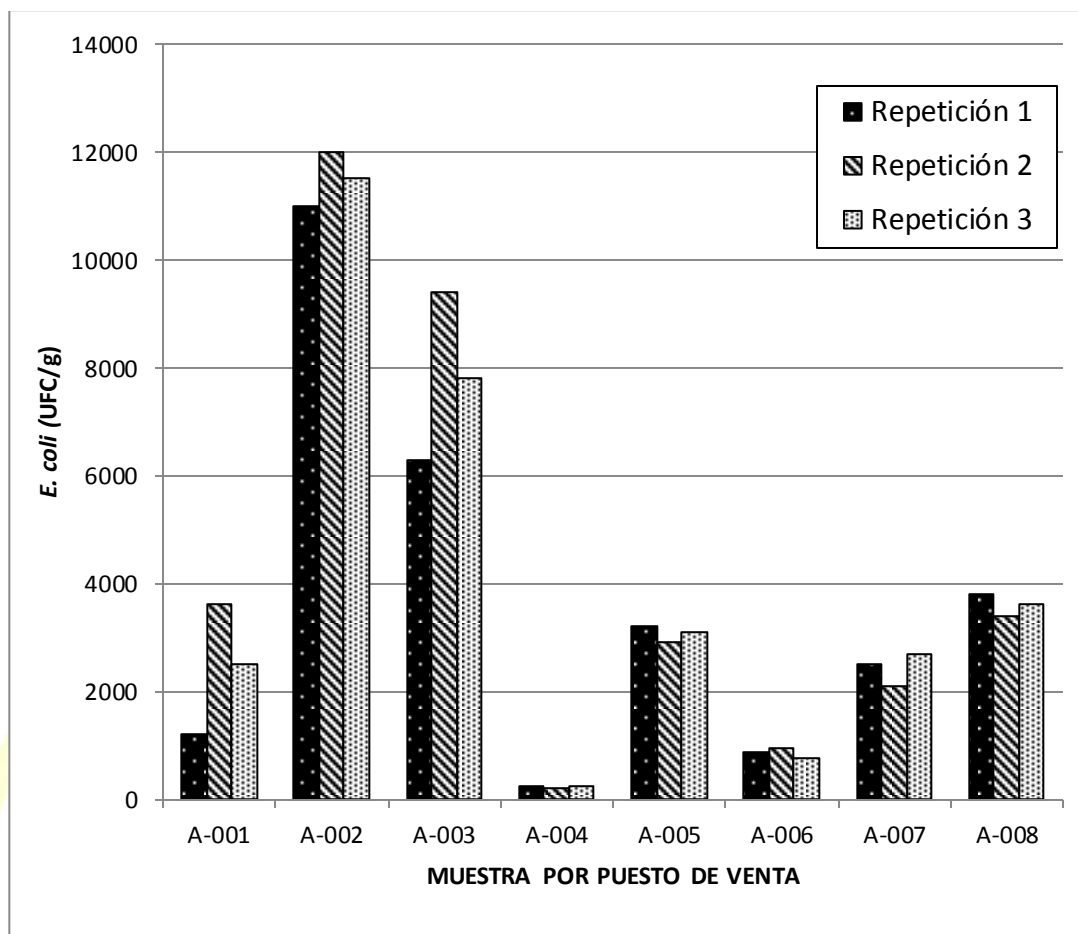
Del total de muestras analizadas de hortalizas mínimamente procesadas en el mercado Modelo de Huaral, se encontró que la muestra A-002 presentó el mayor recuento de *Escherichia coli* frente a las demás, tal y como se muestra en la tabla 11 y la figura 3.

**Tabla 11**

*Resultados del recuento de E.coli en placa a partir de hortalizas mínimamente procesadas en el mercado Modelo de Huaral*

Muestra	<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)			Media (Log UFC/g)
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	
A-001	1.2 x 10 <sup>3</sup>	3.6 x 10 <sup>3</sup>	2.5 x 10 <sup>3</sup>	3.39
<b>A-002</b>	<b>1.1 x 10<sup>4</sup></b>	<b>1.2 x 10<sup>4</sup></b>	<b>1.15 x 10<sup>4</sup></b>	<b>4.06</b>
A-003	6.3 x 10 <sup>3</sup>	9.4 x 10 <sup>3</sup>	7.8 x 10 <sup>3</sup>	2.89
A-004	2.6 x 10 <sup>2</sup>	2.1 x 10 <sup>2</sup>	2.3 x 10 <sup>2</sup>	2.36
A-005	3.2 x 10 <sup>3</sup>	2.9 x 10 <sup>3</sup>	3.1 x 10 <sup>3</sup>	3.49
A-006	8.6 x 10 <sup>2</sup>	9.5 x 10 <sup>2</sup>	7.7 x 10 <sup>2</sup>	2.93
A-007	2.5 x 10 <sup>3</sup>	2.1 x 10 <sup>3</sup>	2.7 x 10 <sup>3</sup>	3.39
A-008	3.8 x 10 <sup>3</sup>	3.4 x 10 <sup>3</sup>	3.6 x 10 <sup>3</sup>	3.56

**Fuente:** Elaboración propia



*Figura 3. Comparación de resultados del recuento de E. coli en placa a partir de hortalizas mínimamente procesadas en el mercado Modelo de Huaral.*

Para elegir la muestra sometida a tratamientos de desinfección con Agua ozonizada a diferentes concentraciones y tiempos de inmersión se realizó el ANVA, empleándose el STATISTICA 10 versión de prueba, y se determinó que si existe diferencia significativa entre la comparación de las medias de cada muestra, obteniéndose que existe diferencia significativa para un  $p < 0.05$  tal y como se muestra en la tabla 12.

**Tabla 12**

*Análisis de varianza (ANVA) para el recuento en placa del E. coli en Hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral.*

---

Univariate Results for Each DV (ANALISIS DE MUESTRAS) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

---

Effect	Degr. of Freedom	UFC/g SS	UFC/g MS	UFC/g F	UFC/g p
Intercept	1	383120504	383120504	719.1769	0.000000
Muestra	7	302871662	43267380	81.2196	0.000000
Error	16	8523533	532721		
Total	23	311395196			

---

**Fuente:** STATISTICA 10 versión de prueba

Así mismo se complementó el análisis de comparación entre muestras del recuento en placa de *E. coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado Modelo de Huaral con la prueba de Tukey (tabla 13) encontrándose que las muestra A-002 y la A-003 no presentan resultados estadísticamente iguales frente a las otras muestras o en comparación entre ambas. Sin embargo la muestra A-002 presenta un mayor número de UFC/g de *E. coli* la cual resultó ser la más crítica y la que se escogió para realizar los tratamientos de desinfección con agua ozonizada.



**Tabla 13**

*Prueba de Tukey para el recuento en placa del E. coli en Hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral.*

Tukey HSD test; variable UFC/g (ANALISIS DE MUESTRAS) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 5327E2, df = 16.000

Cell No.	Muestra	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
		2433.3	11500.	7836.7	233.33	3066.7	860.00	2433.3	3600.0
1	A-001		0.0002	0.0002	0.0325	0.9560	0.2113	1.0000	0.5355
2	A-002	0.0002		0.0004	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
3	A-003	0.0002	0.0004		0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
4	A-004	0.0325	0.0002	0.0002		0.0042	0.9583	0.0325	0.0009
5	A-005	0.9560	0.0002	0.0002	0.0042		0.0318	0.9560	0.9824
6	A-006	0.2113	0.0002	0.0002	0.9583	0.0318		0.2113	0.0057
7	A-007	1.0000	0.0002	0.0002	0.0325	0.9560	0.2113		0.5355
8	A-008	0.5355	0.0002	0.0002	0.0009	0.9824	0.0057	0.5355	

**Fuente:** STATISTICA 10 versión de prueba

Tras la aplicación de los nueve tratamientos a la muestra A-002 con las distintas concentraciones y tiempos de inmersión se muestran los resultados de recuento en placa *E. coli* obtenidos en la tabla 14. Como se aprecia los niveles de concentración de ozono en agua más altos y tiempo de inmersión de las hortalizas mínimamente procesadas más prolongados presentan los menores recuentos de *E. coli* en placa, tal y como se observó en el tratamiento T9 frente al T1.

**Tabla 14**

*Resultados del recuento de E.coli en placa de la Muestra A-002 con la aplicación de los distintos tratamientos de concentración y tiempo de contacto con el agua ozonizada.*

<b>Tratamiento</b>	<b>Ozono (mg/L)</b>	<b>Tiempo (segundos)</b>	<b>E. coli (UFC/g)</b>
T1	0.1	30	1.26 x 10 <sup>3</sup>
	0.1	30	1.85 x 10 <sup>3</sup>
	0.1	30	1.44 x 10 <sup>3</sup>
T2	0.1	150	1.12 x 10 <sup>3</sup>
	0.1	150	1.49 x 10 <sup>3</sup>
	0.1	150	9.40 x 10 <sup>2</sup>
T3	0.1	300	5.60 x 10 <sup>2</sup>
	0.1	300	2.10 x 10 <sup>2</sup>
	0.1	300	3.90 x 10 <sup>2</sup>
T4	0.5	30	9.40 x 10 <sup>2</sup>
	0.5	30	8.90 x 10 <sup>2</sup>
	0.5	30	6.80 x 10 <sup>2</sup>
T5	0.5	150	1.66 x 10 <sup>3</sup>
	0.5	150	5.40 x 10 <sup>2</sup>
	0.5	150	4.60 x 10 <sup>2</sup>
T6	0.5	300	6.20 x 10 <sup>2</sup>
	0.5	300	6.20 x 10 <sup>2</sup>
	0.5	300	8.90 x 10 <sup>2</sup>
T7	1.0	30	4.00 x 10 <sup>1</sup>
	1.0	30	2.00 x 10 <sup>2</sup>
	1.0	30	5.00 x 10 <sup>1</sup>
T8	1.0	150	8.00 x 10 <sup>1</sup>
	1.0	150	1.00 x 10 <sup>2</sup>
	1.0	150	2.30 x 10 <sup>2</sup>
T9	1.0	300	5.00 x 10 <sup>1</sup>
	1.0	300	8.00 x 10 <sup>1</sup>
	1.0	300	3.00 x 10 <sup>1</sup>

**Fuente:** Elaboración propia

A partir de estos resultados en la tabla 15 expresamos los recuentos de *E. coli* en función de logaritmo base 10 y se calculó la diferencia o reducción poblacional en base a la media del recuento inicial de la muestra A-002 expresado en la tabla 11.

**Tabla 15**

*Resultados la reducción poblacional de la E. coli presente en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral tratada con agua ozonizada.*

Tratamiento	Ozono (mg/L)	Tiempo (segundos)	Recuento de <i>E. coli</i>		Reducción Poblacional (Log. UFC/g)
			UFC/g	Log. UFC/g	
T1	0.1	30	$1.26 \times 10^3$	3.10	0.96
	0.1	30	$1.85 \times 10^3$	3.27	0.79
	0.1	30	$1.44 \times 10^3$	3.16	0.90
T2	0.1	150	$1.12 \times 10^3$	3.05	1.01
	0.1	150	$1.49 \times 10^3$	3.17	0.89
	0.1	150	$9.40 \times 10^2$	2.97	1.09
T3	0.1	300	$5.60 \times 10^2$	2.75	1.31
	0.1	300	$2.10 \times 10^2$	2.32	1.74
	0.1	300	$3.90 \times 10^2$	2.59	1.47
T4	0.5	30	$9.40 \times 10^2$	2.97	1.09
	0.5	30	$8.90 \times 10^2$	2.95	1.11
	0.5	30	$6.80 \times 10^2$	2.83	1.23
T5	0.5	150	$1.66 \times 10^3$	3.22	0.84
	0.5	150	$5.40 \times 10^2$	2.73	1.33
	0.5	150	$4.60 \times 10^2$	2.66	1.40
T6	0.5	300	$6.20 \times 10^2$	2.79	1.27
	0.5	300	$6.20 \times 10^2$	2.79	1.27
	0.5	300	$8.90 \times 10^2$	2.95	1.11
T7	1.0	30	$4.00 \times 10^1$	1.60	2.46
	1.0	30	$2.00 \times 10^2$	2.30	1.76
	1.0	30	$5.00 \times 10^1$	1.70	2.36
T8	1.0	150	$8.00 \times 10^1$	1.90	2.16
	1.0	150	$1.00 \times 10^2$	2.00	2.06
	1.0	150	$2.30 \times 10^2$	2.36	1.70
T9	1.0	300	$5.00 \times 10^1$	1.70	2.36
	1.0	300	$8.00 \times 10^1$	1.90	2.16
	1.0	300	$3.00 \times 10^1$	1.48	2.58

**Fuente:** Elaboración propia

Se sometió a prueba los cuatro modelos existentes para la representación de la interacción de variables. En la tabla 16 se muestra la comparación de los  $R^2$  para determinar el mejor modelo que represente dicha interacción, específicamente entre las variables independientes (concentración de ozono en agua y tiempo de inmersión) y la dependiente (reducción poblacional de *E. coli*).

**Tabla 16**

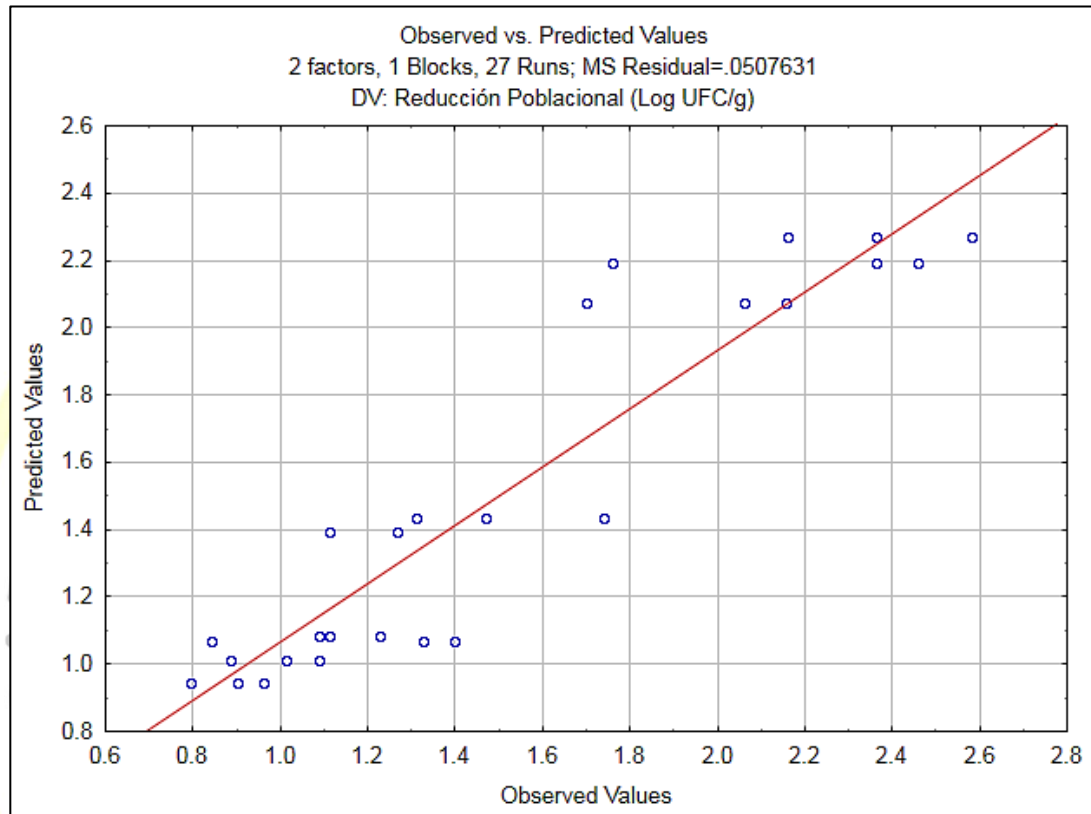
*Análisis de los modelos de MSR para la reducción poblacional de E. coli en Hortalizas mínimamente procesadas con aplicación de agua ozonizada.*

Código	Modelo	Suma de cuadrados del Error (SC)	$R^2$
(a)	Solamente términos lineales de los efectos principales.	2.346955	0.70736
(b)	Términos lineales y cuadráticos de los efectos principales.	1.192843	0.85127
(c)	Términos lineales de los efectos principales y las interacciones de segundo orden.	2.220137	0.72318
(d)	Términos lineales y cuadráticos de los efectos principales y las interacciones de segundo orden.	1.066025	0.86708

**Fuente:** Elaboración propia

El  $R^2$  nos muestra que el mejor modelo que se ajusta a los datos obtenidos experimentalmente es, el de términos lineales y cuadráticos de los efectos principales y las interacciones de segundo orden, pues presenta un valor de 0.86708 para el coeficiente de determinación es decir es el que más se acerca al valor de 1.

Así mismo se apreció en la comparación gráfica de linealidad de los valores predichos vs los valores experimentales de la reducción poblacional de *E. coli* en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral tratadas con agua ozonizada (Figura 4), que los resultados obtenidos (puntos azules) están más cercanos al modelo “d” línea de color rojo.



**Figura 4.** Linealidad de los valores predichos vs los valores experimentales para la reducción poblacional de *E. coli* en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado Modelo de Huaral tratadas con agua ozonizada de los cuatro modelos probados.

De igual forma se realizó en análisis de varianza (ANVA) para el modelo de Términos lineales y cuadráticos de los efectos principales y las interacciones de segundo orden (tabla 17), determinándose que para un  $p < 0.05$  los factores Ozono, Ozono<sup>2</sup> y Tiempo son significativos, esto también es verificable en el diagrama de Pareto (figura 5) en el cual se aprecia que los factores mencionados superan a  $p = 0.05$ .

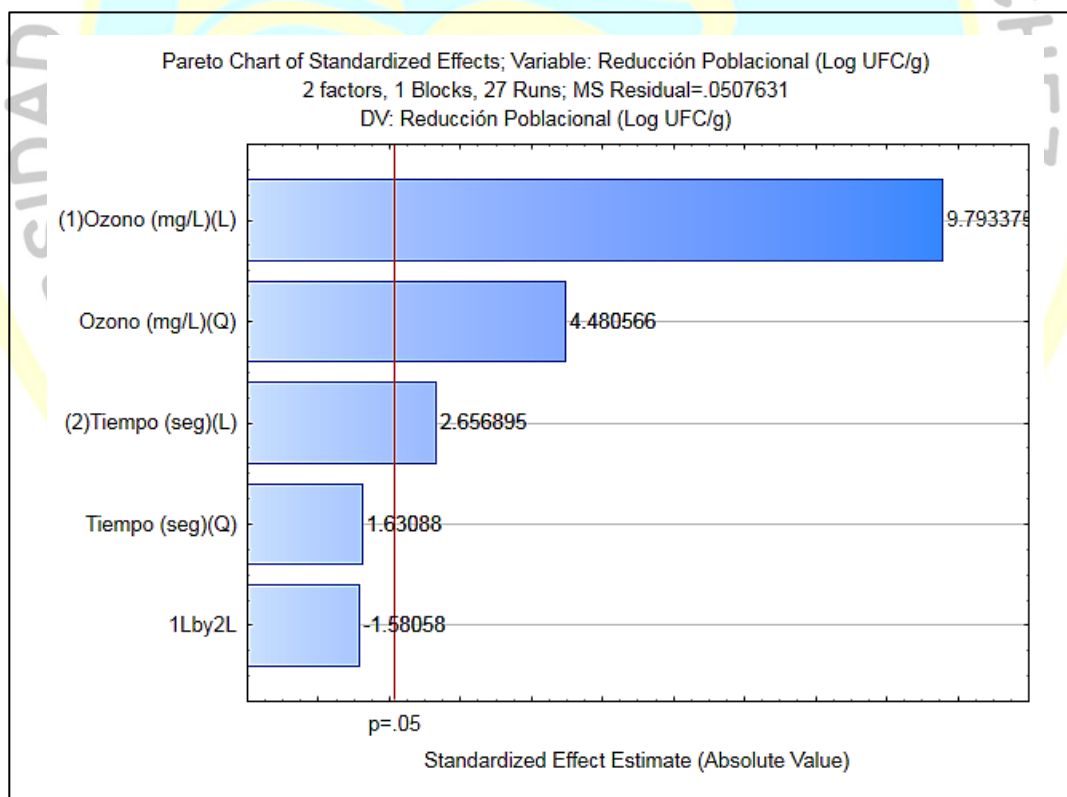
**Tabla 17**

*Análisis de varianza (ANVA) para la reducción poblacional de E. coli en Hortalizas mínimamente procesadas con aplicación de agua ozonizada.*

ANOVA; Var.: Reducción Poblacional (Log UFC/g); R-sqr=.86708; Adj.:.83543 (BASE DE DATOS DEL OZONO) 2 factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Residual=.0507631 DV: Reducción Poblacional (Log UFC/g)

Factor	SS	df	MS	F	p
Ozono	4.868699	1	4.868699	95.91019	0.000000
Ozono <sup>2</sup>	1.019093	1	1.019093	20.07547	0.000206
Tiempo	0.358341	1	0.358341	7.05909	0.014751
Tiempo <sup>2</sup>	0.135018	1	0.135018	2.65977	0.117823
Ozono*Tiempo	0.126818	1	0.126818	2.49823	0.128919
Error	1.066025	21	0.050763		
Total SS	8.020025	26			

**Fuente:** STATISTICA 10 versión de prueba



**Figura 5.** Diagrama de Pareto para la reducción poblacional de E. coli en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado Modelo de Huaral tratadas con agua ozonizada.

En la tabla 18 se presentan los coeficientes del modelo de Términos lineales y cuadráticos de los efectos principales y las interacciones de segundo orden para la reducción poblacional de *E. coli* en hortalizas mínimamente procesadas con aplicación de agua ozonizada.

**Tabla 18**

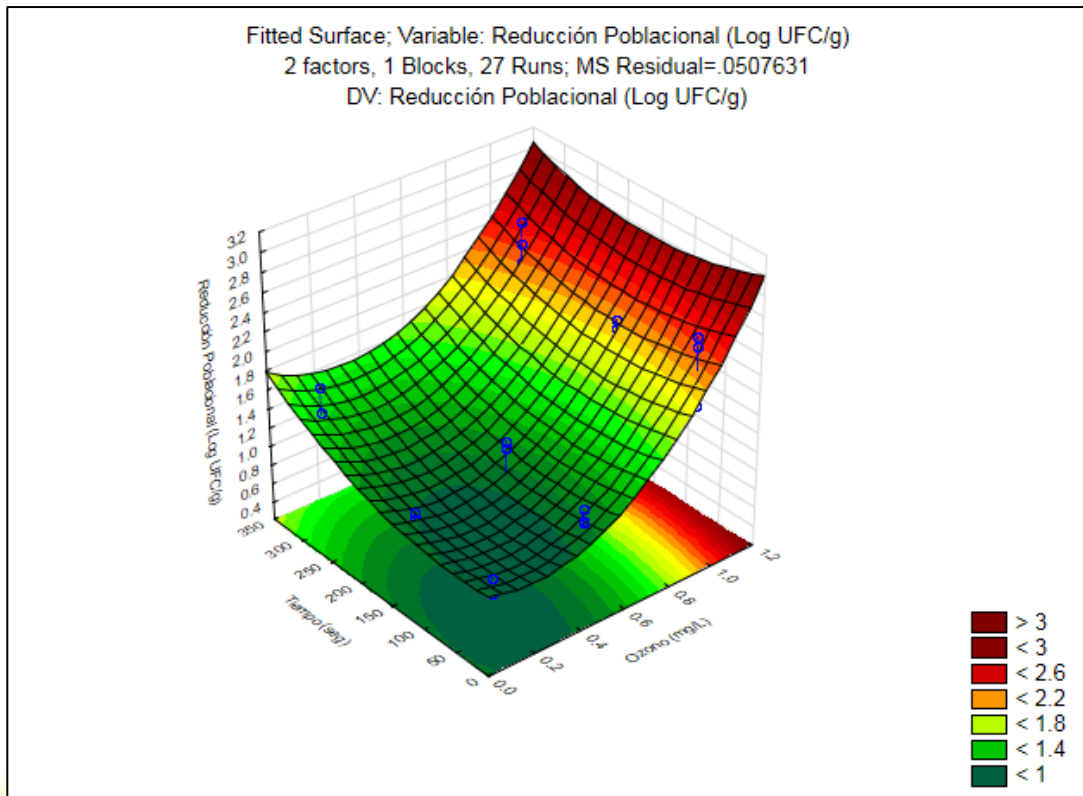
*Coefficientes de regresión del modelo de Términos lineales y cuadráticos de los efectos principales y las interacciones de segundo orden para la reducción poblacional de E. coli en hortalizas mínimamente procesadas con aplicación de agua ozonizada.*

Regr. Coefficients; Var.: Reducción Poblacional (Log UFC/g); R-sqr=.86708; Adj:.83543 (BASE DE DATOS DEL OZONO) 2 factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Residual=.0507631 DV: Reducción Poblacional (Log UFC/g)

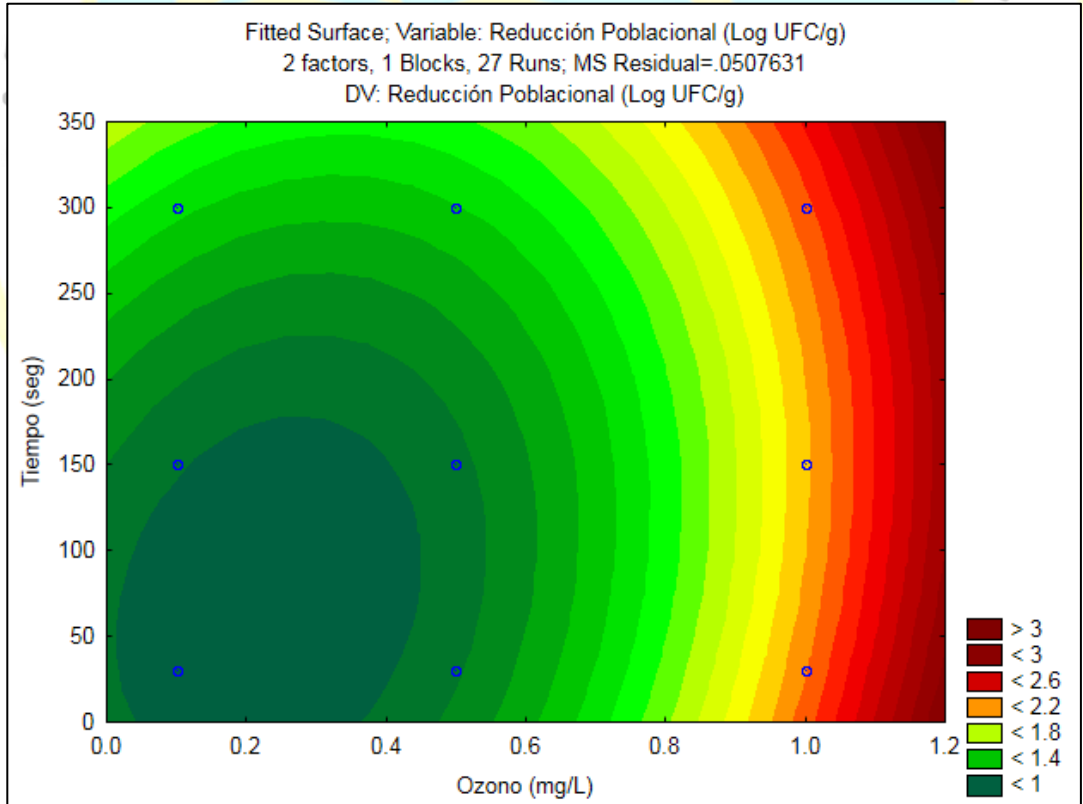
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(21)	P	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Intersección	1.028784	0.176404	5.83198	0.000009	0.66193	1.395635
Ozono	-0.836377	0.554684	-1.50785	0.146492	-1.98990	0.317151
Ozono <sup>2</sup>	2.064872	0.460851	4.48057	0.000206	1.10648	3.023263
Tiempo	-0.000783	0.001849	-0.42333	0.676355	-0.00463	0.003062
Tiempo <sup>2</sup>	0.000008	0.000005	1.63088	0.117823	-0.00000	0.000019
Ozono*Tiempo	-0.001685	0.001066	-1.58058	0.128919	-0.00390	0.000532

**Fuente:** STATISTICA 10 versión de prueba

Con el modelo elegido se pudo establecer una interpretación de los resultados de reducción poblacional a partir de las concentraciones de ozono en agua y tiempo de inmersión mediante la gráfica de superficie respuesta (Figura 6) y grafico de contornos (Figura 7).



**Figura 6.** Gráfico de superficie respuesta de la reducción poblacional de *E. coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas tratadas con agua ozonizada.



**Figura 7.** Gráfico de contornos de la reducción poblacional de *E. coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas tratadas con agua ozonizada.



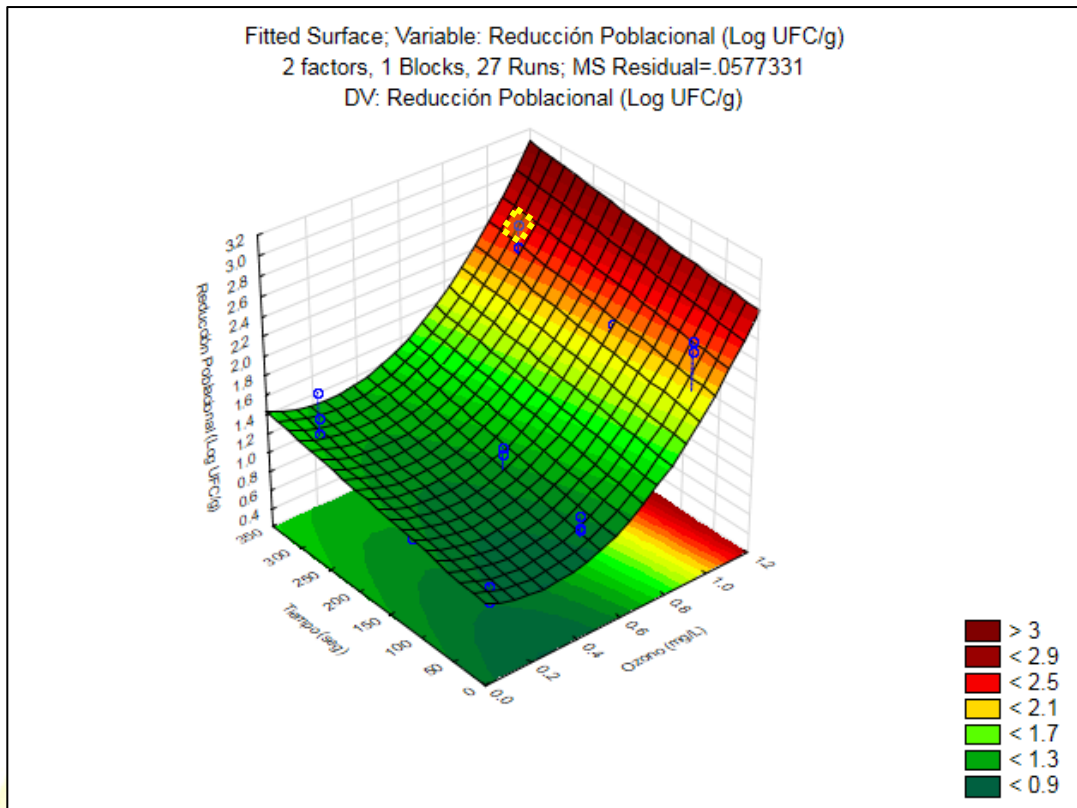
Matemáticamente el modelo, términos lineales y cuadráticos de los efectos principales y las interacciones de segundo orden, para la reducción poblacional de *E. coli* en hortalizas mínimamente procesadas con aplicación de agua ozonizada se puede expresar con la ecuación siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Reducción Poblacional} = & 1.0287837375224 - 0.83637705673028 * \text{ozono} + \\ & 2.0648720180816 * \text{ozono}^2 - 0.00078272206743213 * \\ & \text{tiempo} + 0.000008351022990661 * \text{tiempo}^2 - \\ & 0.001685272836631 * \text{ozono} * \text{tiempo} \end{aligned}$$

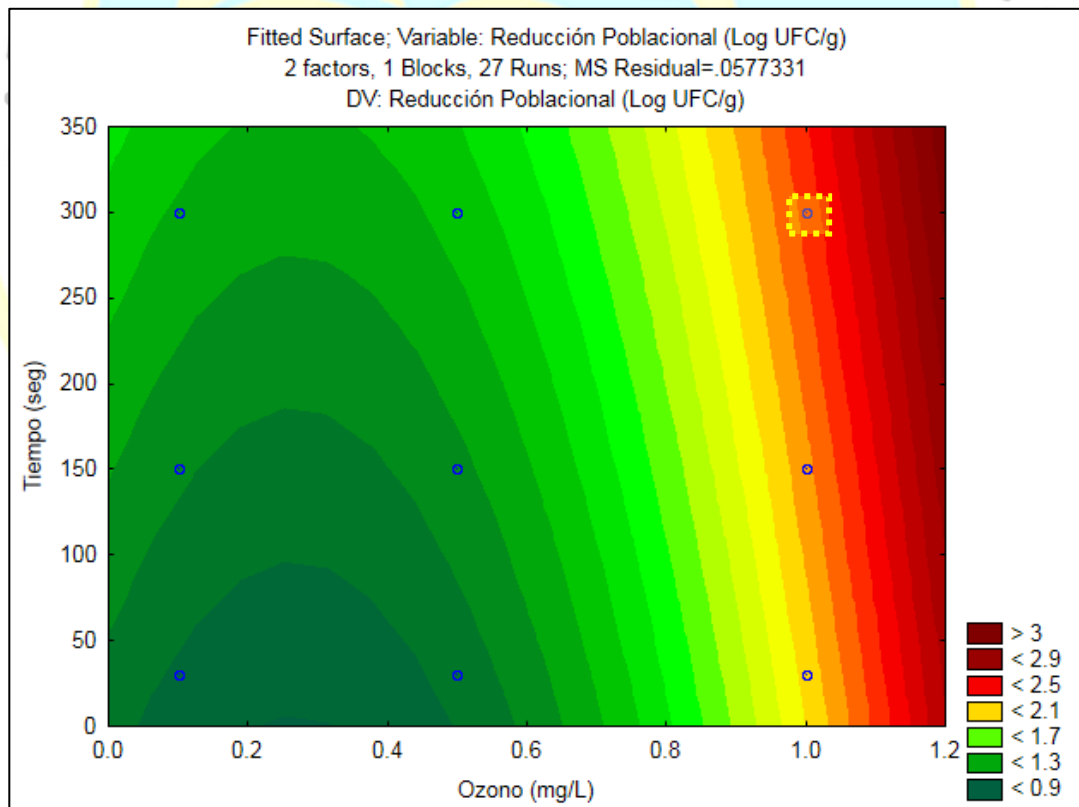
Sin embargo a partir del principio de parsimonia y la evaluación de la significancia de los coeficientes presentado en el ANVA (tabla 11) es preciso aclarar que el modelo reducido y estable corresponde a la ecuación siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Reducción Poblacional} = & 1.0287837375224 - 0.83637705673028 * \text{ozono} + \\ & 2.0648720180816 * \text{ozono}^2 - 0.00078272206743213 * \\ & \text{tiempo} \end{aligned}$$

A partir de este modelo reducido se pudo establecer una interpretación de los resultados de reducción poblacional a partir de las concentraciones de ozono en agua y tiempo de inmersión mediante la gráfica de superficie respuesta (Figura 8) y grafico de contornos (Figura 9) así como predecir los niveles de reducción poblacional a partir de valores fijados para las variables ozono y tiempo dentro de los límites del estudio.



**Figura 8.** Gráfico de superficie respuesta de la reducción poblacional de *E. coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas tratadas con agua ozonizada.



**Figura 9.** Gráfico de contornos de la reducción poblacional de *E. coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas tratadas con agua ozonizada.

## 4.2 Contratación de hipótesis

**Factor:** Ozono (mg/L)

**Hipótesis:**

Ho: La concentración de ozono en agua en los tres niveles no influyen y son iguales a efectos de la reducción poblacional de la *E. coli*.

Ha: Al menos uno de los niveles de concentración de ozono influye y difiere significativamente de las otras a efectos de la reducción poblacional de la *E. coli*.

**Significación:**

$$\alpha = 0.05$$

**Criterio de decisión:**

$F_c < F_{t_{0,05}}$  Acepta Ho

$F_c > F_{t_{0,05}}$  se rechaza Ho y se acepta Ha

**Decisión:**

$$F_c (0,05) 95.91 > F_{t(0,05;1,21)} 4.32$$

Se rechaza la hipótesis nula.

**Conclusión:**

Que al menos un tratamiento con agua ozonizada suministrado a diferentes concentraciones a las hortalizas mínimamente procesadas en el mercado Modelo de Huaral, difiere significativamente de las otras concentraciones de los tratamientos aplicados a la misma.

**Factor:** Tiempo (seg)

**Hipótesis:**

Ho: El tiempo de inmersión en agua ozonizada en los tres niveles no influyen y son iguales a efectos de la reducción poblacional de la *E. coli*.

Ha: Al menos uno de los niveles de tiempo de inmersión en agua ozonizada influye y difiere significativamente de las otras a efectos de la reducción poblacional de la *E. coli*.

**Significación:**

$$\alpha = 0.05$$

**Criterio de decisión:**

$F_c < F_{t_{0,05}}$  Acepta Ho

$F_c > F_{t_{0,05}}$  se rechaza Ho y se acepta Ha

**Decisión:**

$$F_{c(0,05)} 7.06 > F_{t(0,05;1,21)} 4.32$$

Se rechaza la hipótesis nula.

**Conclusión:**

Que al menos un tratamiento con agua ozonizada suministrado a diferentes tiempos de inmersión a las hortalizas mínimamente procesadas en el mercado Modelo de Huaral difiere significativamente de los otros tiempos de inmersión de los tratamientos aplicados a la misma.

**Factor:** Ozono\*Tiempo

**Hipótesis:**

Ho: La interacción de la concentración de ozono y el tiempo de inmersión en los nueve tratamiento no influyen y son iguales a efectos de la reducción poblacional de la *E. coli*.

Ha: Al menos una de las interacciones de la concentración de ozono y el tiempo de inmersión influye y difiere significativamente de las otras, a efectos de la reducción poblacional de la *E. coli*.

**Significación:**

$$\alpha = 0.05$$

**Criterio de decisión:**

$F_c < F_{t_{0,05}}$  Acepta Ho

$F_c > F_{t_{0,05}}$  se rechaza Ho y se acepta Ha

**Decisión:**

$$F_c(0,05) 2.49 < F_{t(0,05;1,21)} 4.32$$

Se acepta la hipótesis nula.

**Conclusión:**

Las interacciones entre la concentración de ozono en agua y el tiempo de inmersión no influyen y son iguales a efectos de la reducción poblacional de la *E. coli* por lo que se debe omitir del modelo.

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

#### 5.1 Discusión de resultados

A partir de los resultados encontrados, aceptamos la hipótesis alternativa general que establece que existe relación significativa entre la aplicación del agua ozonizada a diferentes concentraciones y tiempos de inmersión, y la reducción microbiana de *Escherichia coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral.

Estos resultados concuerdan con lo que sostienen Khadre et al. (2001) para la inactivación de bacterias gram-negativas por ozono en agua, Bialka & Demirci (2007) para la reducción de *E. coli* O157:H7 en frambuesas y fresas con agua ozonizada, Frisón, Vissani, Ocampo, Ponisio, & Basílico (2013) para la reducción de *E. coli* en hojas de lechuga y naranjas enteras con agua ozonizada, quienes señalan que a mayores concentraciones de ozono en agua y prolongados tiempos de inmersión de los alimentos, mayor será el grado de reducción microbiana de *E. coli*, siendo concordante a lo que en este estudio se halla.

De la misma forma considerando los resultados que se encontró en la presente investigación aceptamos la hipótesis alternativa específica que establece que la

aplicación del agua ozonizada reducirá el recuento poblacional de *Escherichia coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral, el mismo que concuerda con Bialka & Demirci (2007) en la aplicación para un patotipo de *E. coli* como es el O157:H7 y su aplicación de ozono y tiempos de inmersión de hasta 8.9 mg/L y 64 minutos respectivamente, alcanzando niveles máximos de hasta 4.8 log UFC/g, a la vez con Khadre et al. (2001) quien reporto resultados experimentales de hasta 6.5 log de reducción poblacional de *E. coli* con tiempos de inmersión y concentraciones de ozono de hasta 5 minutos y 1 mg/L respectivamente, y Frisón et al. (2013) quien redujo mas de 3 log UFC en hojas de lechuga aplicando 2 mg/L y 5 minutos de lavado, los mismos que son concordantes con nuestros experimentos que arrojaron resultados de hasta 2.58 log UFC/g con niveles de concentración de ozono de 1 mg/L y 5 minutos de tiempo de inmersión.

Ademas tambien se concuerda con Frison et al. (2013) quien indica que los niveles de *E. coli* en las hojas de lechuga son bastante menores a  $10^6$  células/mL ya que de los ocho puestos de venta de hortalizas mínimamente procesadas de donde se tomó las muestras que se analizó (la composición de las mismas presenta aproximadamente un 90% de lechuga, 10% de otras hortalizas zanahorias, rabanito, col, tomate, pepino, etc) el valor máximo reportado de *E. coli* fue de  $1.2 \times 10^4$  UFC/g.

De igual forma considerando los resultados aceptamos la segunda hipótesis alternativa específica que establece que los parámetros óptimos de concentración de ozono y tiempo de inmersión en agua ozonizada para obtener la máxima reducción poblacional de *Escherichia coli* presente hortalizas mínimamente procesadas en el

mercado modelo de Huaral, estarán en función del menor recuento microbiológico el mismo que es concordante con Frison et al. (2013) quien logró reducir más de 3 log con una dosis de 2 mg/L por 5 minutos en hojas de lechuga similar al encontrado con el Tratamiento 9 combinación de 1 mg O<sub>3</sub>/L de agua y un tiempo de inmersión de 5 minutos el cual consiguió reducir el nivel de *E. coli* hasta en 2.58 log UFC/g es decir conseguir niveles aceptables y parámetros óptimos para cumplir con la Resolución Ministerial N° 591-2008/MINSA (límite máximo 10<sup>2</sup> UFC/g).





## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 6.1 Conclusiones

- Se determinó que el agua ozonizada a concentraciones y tiempos de inmersión adecuados tiene un efecto bactericida significativos sobre la población microbiana de *Escherichia coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral, 2018.
- Se determinó que el agua ozonizada tiene un efecto bactericida significativo sobre el recuento poblacional de la *Escherichia coli* presente en hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral, de hasta - 2.58 log UFC/g de la población inicial de *E. coli*.
- Se logró determinar que los parámetros óptimos de concentración de ozono y tiempo de inmersión en agua ozonizada para obtener la máxima reducción poblacional de *Escherichia coli* presente hortalizas mínimamente procesadas en el mercado modelo de Huaral, son; de 1 mg/L y 5 minutos respectivamente.

## 6.2 Recomendaciones

- Se recomienda evaluar la factibilidad económica para la instalación de un sistema de desinfección con agua ozonizada a fin de implementarlo en los puestos y mercados que expendan frutas y hortalizas mínimamente procesadas.
- Se recomienda evaluar el grado de cumplimiento del Reglamento Sanitario de Funcionamiento de Mercados de Abasto (Resolución Ministerial N° 282-2003-SA/DM) en el mercado Modelo de Huaral, a fin de determinar las causas que influyen negativamente en la calidad de los alimentos que ahí se expendan.
- Se recomienda evaluar la presencia de microorganismos patógenos en frutas y hortalizas mínimamente procesadas en los mercados de abastos, a fin de adoptar medidas de prevención o mitigación.
- Se recomienda evaluar la aplicación del ozono gaseoso o disuelto en agua en otros tipos de alimentos susceptibles de la presencia de patógenos.

## REFERENCIAS

### 7.1 Fuentes bibliográficas

Cañedo, V., Alfaro, A., & Kroschel, J. (2011). *Manejo integrado de las plagas de insectos en hortalizas Principios y referencias técnicas para la Sierra Central de Perú*. Lima: Centro Internacional de la Papa (CIP).

Carrasco, O. E. (2014). *Los servicios de comercialización y la calidad de los recursos hidrobiológicos en el mercado Modelo de la Provincia de Huaral (Tesis de Pregrado)*. Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, Huacho.

Cásseres, E. (1980). *Producción de Hortalizas*. San José: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.

Çengel, Y., & Boles, M. (2012). *Termodinámica*. Mexico, D.F.: McGraw Hill Interamericana Editores, S.A. DE C.V.

Chang, R., & College, W. (2002). *Química*. Mexico, D.F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A.

Ministerio de Salud del Perú. (16 de Marzo de 2003). Reglamento Sanitario de Funcionamiento de Mercados de Abasto. (282-2003).

Monroe, J. (2000). *Modern Food Microbiology*. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc.

Saltveit, M. (2003). *Postharvest physiology and pathology of vegetables*. (J. Bartz, & J. Brecht, Edits.) New York: Marcel Dekker, Inc.

Schlegel, H. (1997). *Microbiología General*. Barcelona: Ediciones Omega S.A.

Valdiviezo, B. F. (2016). *Efecto de la dosis de ozono gaseoso y tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, recuento de mohos y levaduras y aceptabilidad general en racimos de uva (Vitis vinifera L.) Variedad red globe (Tesis de pregrado)*. Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo.

## 7.2 Fuentes hemerográficas

Ali, A., Ong, M., & Forney, C. (2014). Effect of ozone pre-conditioning on quality and antioxidant capacity of papaya fruit during ambient storage. *Food Chemistry*, 19-26.

Alwi, N., & Ali, A. (2014). Reduction of Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes and Salmonella enterica sv. Typhimurium populations on fresh-cut bell pepper using gaseous ozone. *Food Control*, 304-311.

Bialka, K., & Demirci, A. (2007). Efficacy of Aqueous Ozone for the Decontamination of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella on Raspberries and Strawberries. *Journal of Food Protection*, 1088-1092.

Dobeic, M. (2017). Ozone as a disinfectant in the food industry. *MESO*, 346-353.

Farfán, A., Ariza, S., Vargas, F., & Vargas, L. (2016). Mecanismos de virulencia de Escherichia coli enteropatógena. *Revista chilena de infectología*, 438-450.

Frisón, L., Vissani, M., Ocampo, H., Ponisio, D., & Basílico, J. (2013). Efectos del agua ozonizada sobre microorganismos patógenos y alterantes de frutas y

hortalizas. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 119-131.

Glowacz, M., & Rees, D. (2016). The practicality of using ozone with fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 4637-4643.

Google. (2018). *Google maps*. Recuperado el 12 de Agosto de 2018, de <https://www.google.com.pe/maps/place/Mercado+Modelo+de+Huaral/>

Khadre, M., Yousef, A., & Kim, J. (2001). Microbiological Aspects of Ozone applications in Food: A Review. *Journal of Food Science*, 1242-1252.

Łozowicka, B., & Jankowska, M. (2016). Comparison of the effects of water and thermal processing on pesticide removal in selected fruit and vegetables. *Journal of Elementology*, 99-111.

Ministerio de Salud del Perú. (16 de Marzo de 2003). Reglamento Sanitario de Funcionamiento de Mercados de Abasto. (282-2003).

Olmedo, M. (2008). Subproductos de la desinfección del agua por el empleo de compuestos de cloro. Efectos sobre la salud. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 335-342.

Pascual, A., Llorca, I., & Canut, A. (2007). Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. *Trends in Food Science & Technology*, 29-35.

Rivera, M., Rodríguez, C., & López, J. (2009). Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de cajamarca, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 45-48.

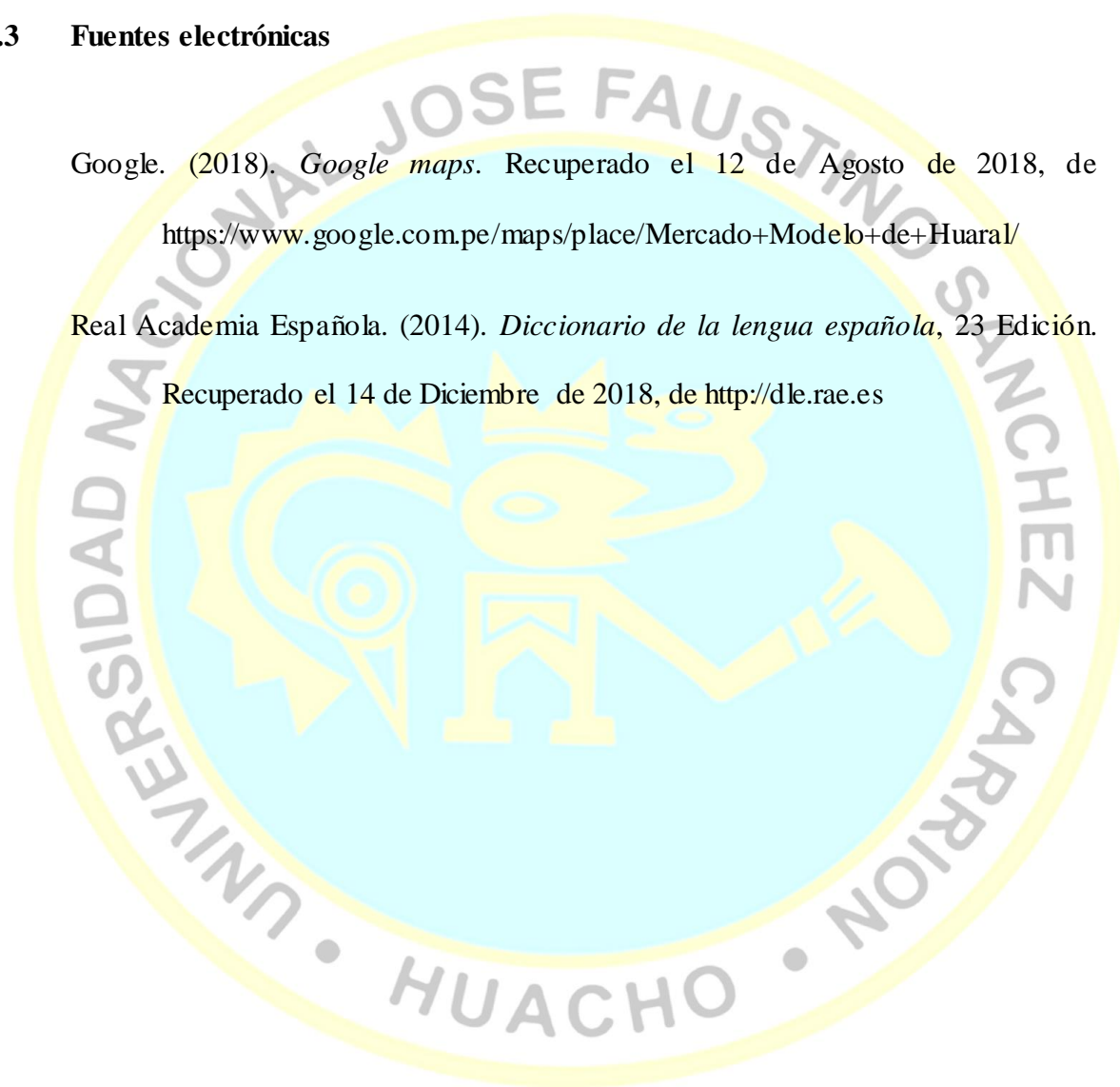
Saltveit, M. (2003). *Postharvest physiology and pathology of vegetables*. (J. Bartz, & J. Brecht, Edits.) New York: Marcel Dekker, Inc.

Vasquez, C. P., Marquez, L., & Siche, R. (2016). Efecto del ozono gaseoso sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y apariencia general de *Punica Granatum L. wonderful fresca*. *Scientia Agropecuaria*, 173-180.

### 7.3 Fuentes electrónicas

Google. (2018). *Google maps*. Recuperado el 12 de Agosto de 2018, de <https://www.google.com.pe/maps/place/Mercado+Modelo+de+Huaral/>

Real Academia Española. (2014). *Diccionario de la lengua española*, 23 Edición. Recuperado el 14 de Diciembre de 2018, de <http://dle.rae.es>



# ANEXOS

## ANEXO 1. Ficha técnica del ozonizador OZOTECH OZ2PCS

# OZOTECH

## PCS-Series Residential Ozone Systems

The **OZOTECH PCS-Series** ozone generator reliability and ruggedness have allowed the PCS-Series to withstand the test of time and to emerge as the top selling ozone generator in the world over the past 25 years.

The OZ1PCS & OZ2PCS Models deliver up to 0.45 grams per hour of ozone when connected to an oxygen feed supply. And up to 0.2 grams per hour when dry air is used.

The OZ4PC10 Model delivers up to 1 gram per hour of ozone when connected to an oxygen feed supply. And up to 0.5 grams per hour when dry air is used.

The patented, OZOTECH, cold spark corona discharge tubes provide reliable ozone production even in the most hostile environments. These models will provide years of service with easy maintenance. 115 or 230 VAC models are available in 50 or 60 Hz configurations.



Ozotech PCS-Series Ozone Systems

### Benefits

- Compact size
- Lightweight and corrosion resistant
- Easy to service
- High reliability
- Simple and reliable operation

### Standard Features

- Patented "Cold Spark" corona discharge
- Field serviceable corona cells
- CSA/US certified for consumer safety
- Lightweight aluminum chassis

### Specifications

Series	OZ1PCS-Series		OZ1PCS-Series		OZ2PCS-Series	
Part Number	205612 / 205613		200844 / 200845		205619 / 205620	
Concentration %	0.11	0.04	0.20	0.07	0.54	0.15
Air flow (SCFH)	-	10.00	-	10.00	-	10.00
PP Phoenix (SCFH)	4.00	-	6.00	-	5.00	-
G/Hr	0.17	0.15	0.45	0.26	1.10	0.56
Dimensions (H x W x D) (in / cm)	17 x 6.25 x 4.5 / 43.2 x 15.9 x 11.4		17 x 6.25 x 4.5 / 43.2 x 15.9 x 11.4		17 x 6.25 x 4.5 / 43.2 x 15.9 x 11.4	
Weight (lbs / kg)	11 / 5.0		11 / 5.0		17 / 7.7	

Engineered Water Treatment Solutions

**AXEON**  
WATER TECHNOLOGIES

MKTIF-320

P: 800-320-4074 • W: [www.axeonwater.com](http://www.axeonwater.com)  
F: 800-609-0829 • E: [sales@axeonwater.com](mailto:sales@axeonwater.com)  
40980 County Center Drive, Suite 100, Temecula, CA 92591

AXEON is a registered trademark of AXEON Water Technologies.



02/14 ©2014 AXEON Water Technologies



## Interpretation Guide

The 3M™ Petrifilm™ Rapid *E. coli*/Coliform Count Plate is a selective and differential sample-ready-culture medium system which contains proprietary nutrients, a cold-water-soluble gelling agent, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glucuronide (BCIG) an indicator of glucuronidase activity, and a tetrazolium indicator that facilitates colony enumeration. 3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plates are used for the enumeration of *Escherichia coli* (*E. coli*) and coliforms in the food and beverage industries.



**REC**  
Rapid *E. coli*/Coliform Count Plate





Most *E. coli* (about 97%) produce beta-glucuronidase, which produces a blue precipitate associated with the colony on the 3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plate. The top film on the 3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plate traps carbon dioxide gas produced by the lactose fermenting coliforms and *E. coli*. A small percentage of *E. coli* do not produce carbon dioxide gas as a result of lactose fermentation; these are known as anaerogenic *E. coli*. On the 3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plate, blue to blue-green colonies associated with and without entrapped gas (within approximately one colony diameter) are counted as *E. coli*.

Most *E. coli* O157 strains are atypical, for example they are glucuronidase negative, they will not produce a blue color, and therefore will be detected as coliforms on 3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plates.

The United States Food and Drug Administration (FDA) Bacteriological Analytical Manual (BAM) define coliforms as Gram negative rods, which produce acid and gas from lactose during metabolic fermentation. Non-*E. coli* coliform colonies growing on the 3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plate produce acid and gas, which causes the pH indicator to change the gel color to light yellow and gas trapped around red colonies. In this interpretation guide, the number of coliforms per the FDA BAM definition is the number of red colonies with gas production and blue colonies with and without gas production.

ISO defines coliforms by their ability to grow in method-specific, selective media. ISO method 4832 enumerates typical coliform colonies on Violet Red Bile Lactose (VRBL) agar, with confirmation of atypical colonies. On the 3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plate, coliforms are indicated by red colonies with or without gas production and blue colonies with and without gas production.

Please refer to the product instructions for additional information.

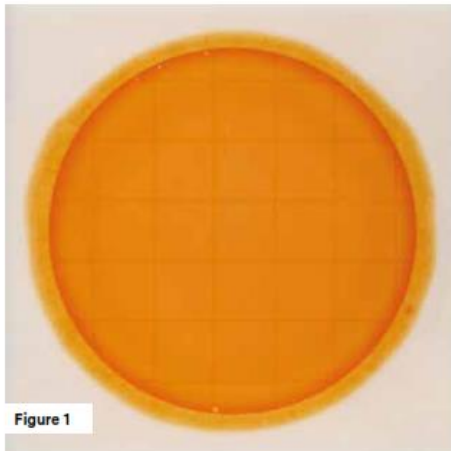


Figure 1

***E. coli* count = 0**  
**Total coliform count = 0**

3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plate without colonies.

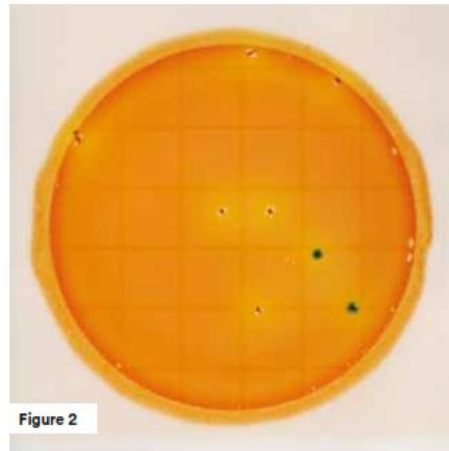


Figure 2

***E. coli* count = 2** (blue colonies with and without gas)  
**Total coliform count = 8** (red colonies with gas and blue colonies)

**Total coliform count = 8** (red colonies and blue colonies)

*E. coli* are blue to blue-green colonies with and without associated gas bubbles. The definition of coliforms may vary by country. Please refer to the section above and product instructions for definitions.

Do not count colonies on the foam barrier because they are removed from the selective influence of the medium.

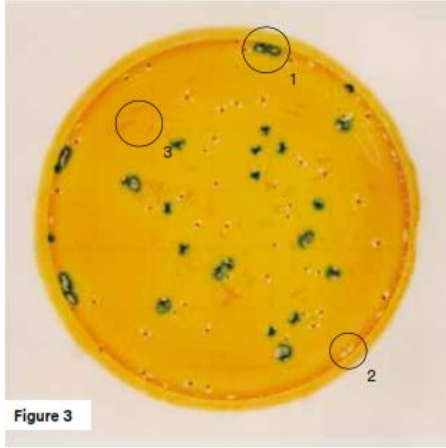


Figure 3

***E. coli* count = 25** (blue colonies with and without gas)  
**Total coliform count = 71** (red colonies with gas and blue colonies)  
**Total coliform count = 75** (red and blue colonies)

Two distinct colonies can be seen in Circle 1, although the blue precipitate from both colonies have merged together. The gas bubble formed by each colony has disrupted the colony so that the colony "outlines" the bubble.

Artifact bubbles may result from improper inoculation or from trapped air within the sample. They are irregularly shaped and are not associated with a colony (Circle 2).

Food particles are irregularly shaped and are not associated with gas bubbles (Circle 3).

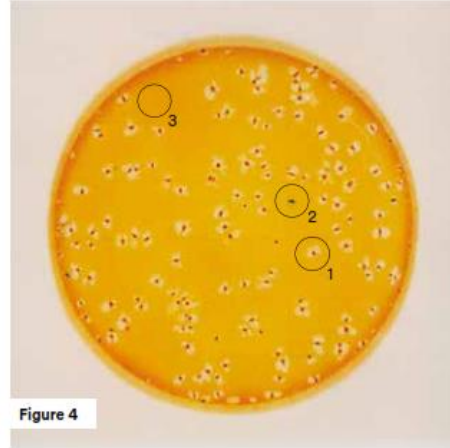


Figure 4

***E. coli* count = 3** (blue colonies with and without gas)  
**Estimated total coliform count = 145**

The circular growth area is approximately 30 cm<sup>2</sup>. Estimates can be made on 3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plates containing greater than 100 colonies. Count the number of colonies in one or more representative squares and determine the average number per square. Multiply the average number by 30 to determine the estimated count. In this picture, three types of colonies can be seen: Red colonies with gas (Circle 1), blue colonies with gas (Circle 2), and very tiny, pale pink colonies without gas. The tiny, pale pink colonies without gas are non-coliform and should not be counted (Circle 3).

Further a more accurate count, further dilution of the sample may be necessary.

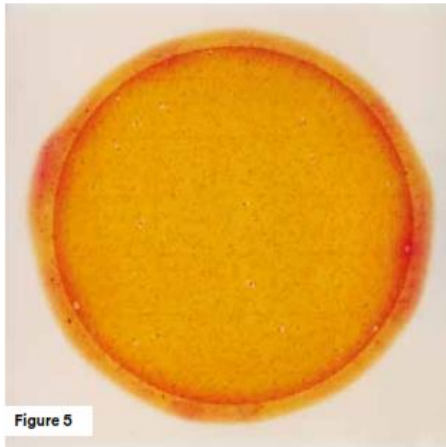


Figure 5

***E. coli* count = cannot be determined** (blue colonies with and without gas)  
**Total coliform count = TNTC**

The counting range for total coliform is less than or equal to 100 total colonies. Plates with colony counts TNTC may have one or more of the following characteristics: lightening of the gel color to yellow, many small, indistinct red or blue colonies and/or many gas bubbles. High concentrations of *E. coli* or coliforms may cause the outer edge of the growth area to turn pink to pink orange.

For a more accurate count, further dilution of the sample may be necessary.

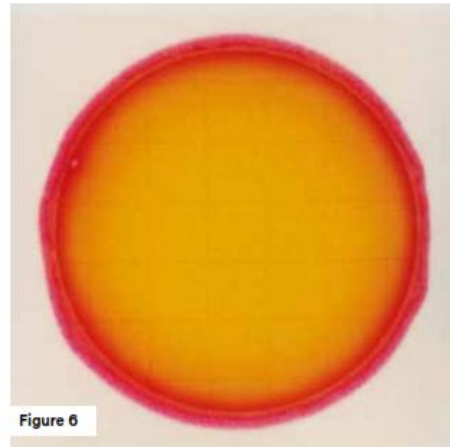


Figure 6

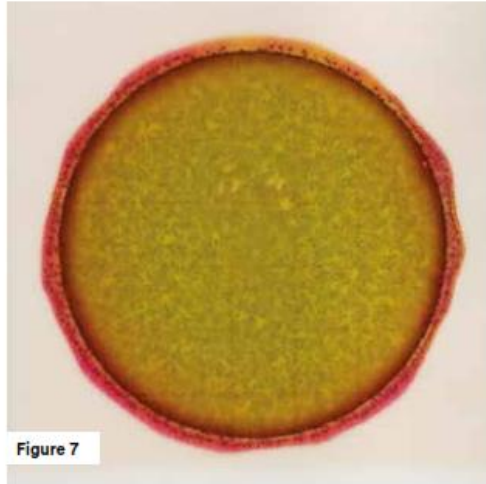


Figure 7

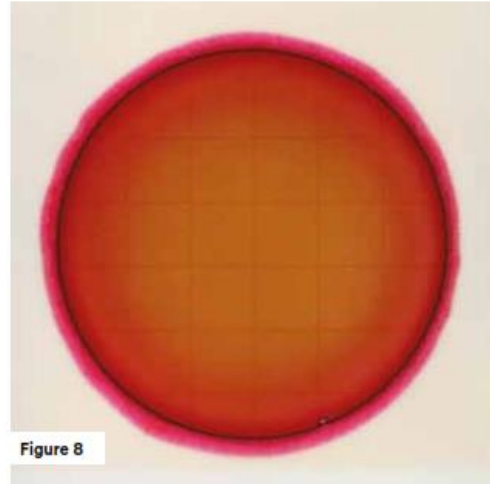


Figure 8

***E. coli* count = TNTC** (blue colonies with and without gas)  
**Total coliform count = TNTC**

The counting range for *E. coli* is less than or equal to 100 blue to blue-green colonies. Plates with colony counts TNTC may have one or more of the following characteristics: lightening of the gel color to yellow, many small, indistinct red or blue colonies and/or many gas bubbles. High concentrations of *E. coli* or coliforms may cause the outer edge of the growth area to turn pink to pink orange.

*For a more accurate count, further dilution of the sample may be necessary.*

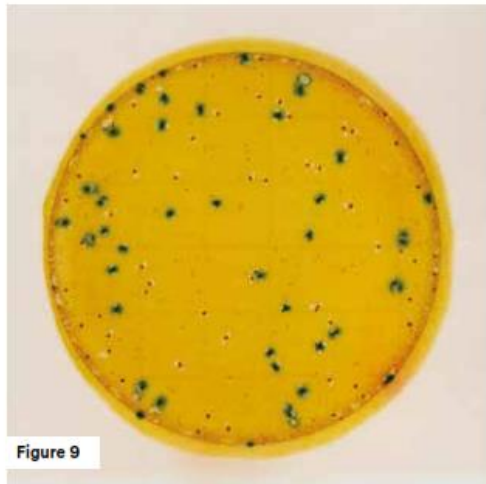


Figure 9

***E. coli* count = 41** (blue colonies with and without gas)  
**Total coliform count = TNTC** (red colonies with gas and blue colonies)  
**Total coliform count = TNTC** (red and blue colonies)

The counting range for *E. coli* on the 3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plate is less than or equal to 100 blue to blue-green colonies regardless of the number of total colonies. The countable range for total coliform may occur on a separate dilution.

*For a more accurate count, further dilution of the sample may be necessary.*

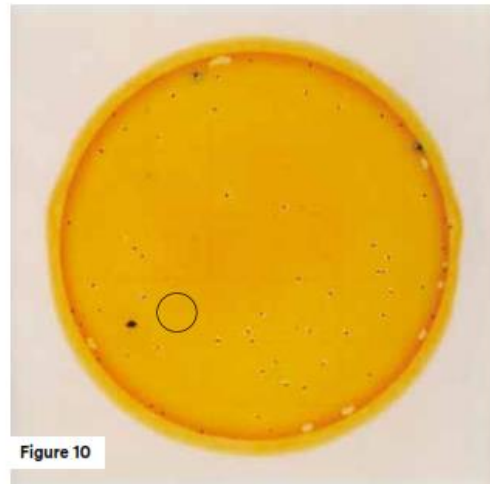


Figure 10

***E. coli* count = 2** (blue colonies with and without gas)  
**Total coliform count = 36** (red colonies with gas and blue colonies)  
**Total coliform count = 58** (red and blue colonies)

This figure shows the next serial dilution for the sample plated in Figure 9. The countable range for total coliforms on 3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plate is lower than or equal to 100 total colonies. Do not count tiny, pale pink colonies without gas (see circle). These colonies are non-coliform colonies and should not be counted.

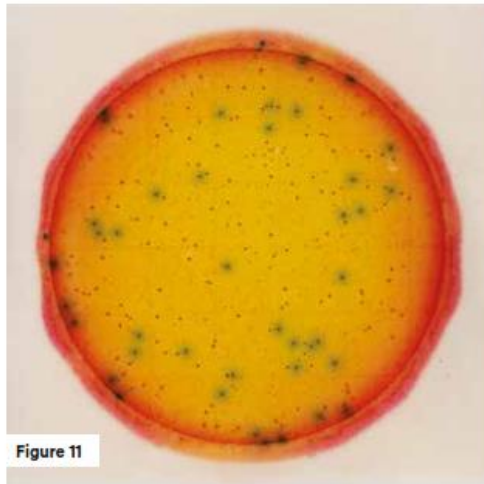


Figure 11

***E. coli* count = 42** (blue colonies with and without gas)  
**Total coliform count = TNTC** (red colonies with gas and blue colonies)  
**Total coliform count = TNTC** (red and blue colonies)

The counting range for *E. coli* on the 3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plate is less than or equal to 100 blue to blue-green colonies regardless of the number of total colonies. The countable range for total coliform may occur on a separate dilution.

For a more accurate count, further dilution of the sample may be necessary.

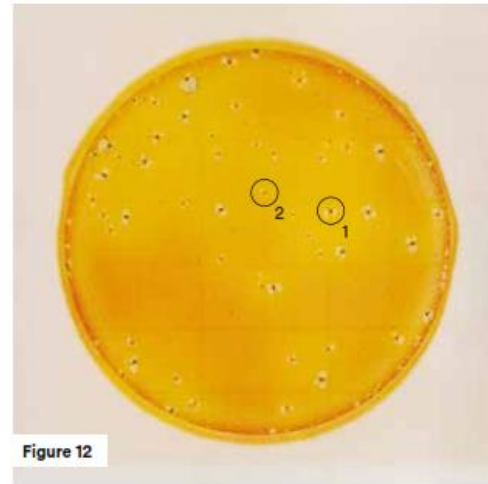


Figure 12

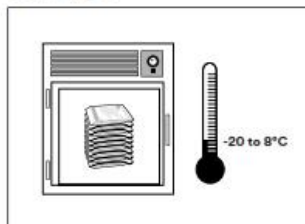
***E. coli* count = 21** (blue colonies with and without gas)  
**Total coliform count = 60** (red colonies with gas and blue colonies)  
**Total coliform count = 60** (red and blue colonies)

A 1:10 dilution of some food matrices, for example those containing fruit such as cherries and blueberries, may affect  $\beta$ -glucuronidase production by *E. coli* rendering them faint blue-green. Additional incubation and/or a 1:20 dilution will restore the appearance of the blue green color.

In this figure, *E. coli* colonies can be identified by their darkened colony color surrounded by a faint blue-green color (Circle 1). Compare this colony to a non-*E. coli* coliform colony which is bright red (Circle 2).

## Reminders for Use

### Storage

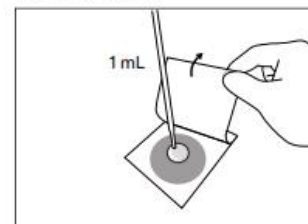


- 1 Store the unopened 3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plate pouches at frozen or refrigerated temperature equal to -20 to 8°C (-4 to 46°F). Use before expiration date on package. Just prior to use, all unopened pouches to come to room temperature before opening.

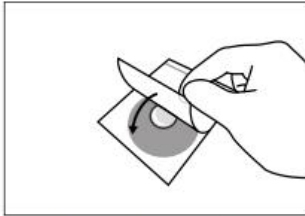


- 2 Seal by folding the end of the pouch over and applying adhesive tape. **To prevent exposure to moisture, do not refrigerate opened pouches.** Store resealed pouches in a cool, dry place for no longer than four weeks.

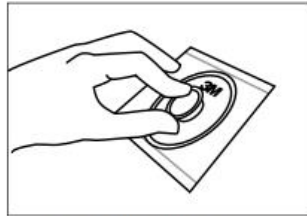
### Inoculation



- 3 Place the 3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plate on a level surface. Lift the top film and with the pipette perpendicular to the inoculation area, dispense 1mL of sample suspension onto the center of the bottom film.

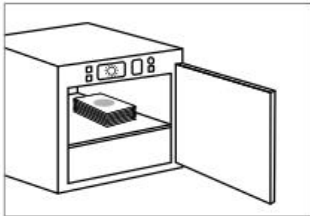


- 4** Roll the top film down onto the sample gently to prevent trapping air bubbles. Do not let the top film drop.



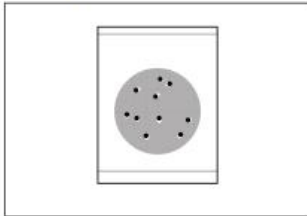
- 5** Place the 3M™ Petrifilm™ Flat Spreader on the center of the 3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plate. Press firmly on the center of the spreader to distribute the sample evenly. Do not twist or slide the spreader.

## Incubation



- 6** Incubate plates with clear side up in stacks of no more than 20 plates. It may be necessary to humidify the incubator to minimize moisture loss. **Please refer to the product instructions for third party validated methods.**

## Interpretation



- 7** 3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plates can be counted on a standard colony counter or other illuminated magnifier. Colonies may be isolated for further identification. Lift top film and pick the colony from the gel.

## Use Appropriate Sterile Diluents

Butterfield's phosphate-buffered dilution water, 0.1% peptone water, peptone salt diluent (Maximum Recovery Diluent), buffered peptone water, 0.85%-0.9% saline, phosphate buffered saline (PBS), distilled water or bisulfite-free letheen broth.

For optimal growth and recovery of microorganisms in acidic products (< pH 5), adjust the pH of the sample suspension to greater than pH 5.

**Do not use diluents containing citrate, bisulfate or thiosulfate with the 3M Petrifilm Rapid *E. coli*/Coliform Count Plates; they can inhibit growth.**

If citrate buffer is indicated in the standard procedure, substitute with Butterfield's phosphate-buffered dilution water, warmed to 40-45°C.

## Bubbles

The illustrations below show examples of various bubble patterns associated with gas producing colonies. All should be enumerated.



3M Food Safety offers a full line of products to accomplish a variety of your microbial testing needs. For more product information, visit us at [3M.com/foodsafety/Petrifilm](http://3M.com/foodsafety/Petrifilm) or call 1-800-328-6553.



3M Food Safety  
3M Center, Building 275-5W-05  
St. Paul, MN 55144-1000 USA

1-800-328-6553  
[3M.com/foodsafety](http://3M.com/foodsafety)

3M Canada  
Post Office Box 5757  
London, Ontario N6A 4T1  
Canada

1-800-364-3577

**User's Responsibilities:** 3M Petrifilm Plate performance has not been evaluated with all combinations of microbial flora, incubation conditions and food matrices. It is the user's responsibility to determine that any test methods and results meet the user's requirements. Should re-printing of this Interpretation Guide be necessary, user's print settings may impact picture and color quality.

For detailed CAUTIONS, DISCLAIMER OF WARRANTIES/LIMITED REMEDY and LIMITATION OF 3M LIABILITY, STORAGE AND DISPOSAL information and INSTRUCTIONS FOR USE, see Product's package insert.



3M and Petrifilm are trademarks of 3M. Used under license in Canada. AOAC is a registered trademark of AOAC INTERNATIONAL. Whirl-Pak is a registered trademark of Nasco. Please recycle. Printed in USA. © 3M 2018. All rights reserved. 70-2011-5132-4 (01-18)

Rapid *E. coli*/Coliform Count Plate

6

## ANEXO 3. Instrucciones de uso del Rapid E. coli /Coliform Count Plate - Petrifilm® 3M



EN (English)  

Issue Date: 2018-06

### Product Instructions

## Rapid *E. coli* / Coliform Count Plate

### Product Description and Intended Use

The 3M™ Petrifilm™ Rapid *E. coli* / Coliform Count (REC) Plate is a selective and differential sample-ready-culture-medium system which contains proprietary nutrients, a cold-water-soluble gelling agent, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glucuronide (BCIG) an indicator of glucuronidase activity, and a tetrazolium indicator that facilitates colony enumeration. The 3M Petrifilm REC Plate is used for the enumeration of *Escherichia coli* (*E. coli*) and coliforms in the food and beverage industries. The 3M Petrifilm REC Plate components are decontaminated though not sterilized. 3M Food Safety is certified to ISO (International Organization for Standardization) 9001 for design and manufacturing. The 3M Petrifilm REC Plate has not been evaluated with all possible food products, food processes, testing protocols or with all possible microorganism strains.

### Safety

The user should read, understand, and follow all safety information in the instructions for the 3M Petrifilm REC Plate. Retain the safety instructions for future reference.

▲ **WARNING:** Indicates a hazardous situation, which, if not avoided, could result in death or serious injury and/or property damage.

### ▲ WARNING

**Do not use this plate for the specific detection of *E. coli* O157. Because most *E. coli* O157 strains are atypical, for example they are glucuronidase negative, they will not produce a blue color, and therefore will be detected as coliforms on 3M Petrifilm REC Plates.**

#### To reduce the risks associated with exposure to biohazards and environmental contamination:

- After use, 3M Petrifilm REC Plates may contain microorganisms that may be a potential biohazard. Follow current industry standards and local regulations for disposal of biohazardous waste.

#### To reduce the risks associated with release of contaminated product:

- Follow all product storage instructions contained in the instructions for use.
- Do not use beyond the use by date.
- Do not use 3M Petrifilm REC Plates that show discoloration.
- Do not use diluents containing citrate, bisulfate or thiosulfate with the 3M Petrifilm REC Plate; they can inhibit growth.

#### To reduce the risks associated with bacterial infection and workplace contamination:

- Perform 3M Petrifilm REC Plate testing in a properly equipped laboratory under the control of a skilled microbiologist.
- The user must train its personnel in current proper testing techniques: for example, Good Laboratory Practices<sup>1</sup>, ISO 7218<sup>2</sup>, or ISO 17025<sup>3</sup>.

#### To reduce the risks associated with misinterpretation of results:

- 3M has not documented 3M Petrifilm REC Plates for use in industries other than food and beverage. For example, 3M has not documented 3M Petrifilm REC Plates for testing water, pharmaceuticals, or cosmetics.
- Do not use 3M Petrifilm REC Plates in the diagnosis of conditions in humans or animals.
- 3M Petrifilm REC Plates do not differentiate any one *E. coli* or coliform strain from another.
- A few strains of bacteria can produce β-glucuronidase such as *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* and *Klebsiella* and may produce blue to blue-green colonies on the 3M Petrifilm REC Plate.
- Foods with high sugar content may increase the potential for gas production from non-coliform *Enterobacteriaceae*.

Consult the Safety Data Sheet for additional information.

For information on documentation of product performance, visit our website at [www.3M.com/foodsafety](http://www.3M.com/foodsafety) or contact your local 3M representative or distributor.

### User Responsibility

Users are responsible for familiarizing themselves with product instructions and information. Visit our website at [www.3M.com/foodsafety](http://www.3M.com/foodsafety), or contact your local 3M representative or distributor for more information.

When selecting a test method, it is important to recognize that external factors such as sampling methods, testing protocols, sample preparation, handling, and laboratory technique may influence results. The food sample itself may influence results.

It is the user's responsibility in selecting any test method or product to evaluate a sufficient number of samples with the appropriate matrices and microbial challenges to satisfy the user that the chosen test method meets the user's criteria.

It is also the user's responsibility to determine that any test methods and results meet its customers' and suppliers' requirements.

As with any test method, results obtained from use of any 3M Food Safety product do not constitute a guarantee of the quality of the matrices or processes tested.

#### **Limitation of Warranties / Limited Remedy**

EXCEPT AS EXPRESSLY STATED IN A LIMITED WARRANTY SECTION OF INDIVIDUAL PRODUCT PACKAGING, 3M DISCLAIMS ALL EXPRESS AND IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, ANY WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR USE. If any 3M Food Safety Product is defective, 3M or its authorized distributor will, at its option, replace or refund the purchase price of the product. These are your exclusive remedies. You must promptly notify 3M within sixty days of discovery of any suspected defects in a product and return it to 3M. Please call Customer Service (1-800-328-1671 in the U.S.) or your official 3M Food Safety representative for a Returned Goods Authorization.

#### **Limitation of 3M Liability**

3M WILL NOT BE LIABLE FOR ANY LOSS OR DAMAGES, WHETHER DIRECT, INDIRECT, SPECIAL, INCIDENTAL OR CONSEQUENTIAL DAMAGES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO LOST PROFITS. In no event shall 3M's liability under any legal theory exceed the purchase price of the product alleged to be defective.

#### **Storage**

Store unopened 3M Petrifilm REC Plate pouches refrigerated or frozen (-20 to 8°C / -4 to 46°F). Just prior to use, allow unopened 3M Petrifilm REC Plate pouches to come to room temperature before opening (20-25°C (68-77°F) / <60% RH). Return unused 3M Petrifilm REC Plates to pouch. Seal by folding the end of the pouch over and applying adhesive tape.

**To prevent exposure to moisture, do not refrigerate opened pouches.** Store resealed 3M Petrifilm REC Plate pouches in a cool dry place for no longer than four weeks. It is recommended that resealed pouches of 3M Petrifilm REC Plates be stored in a freezer for no longer than four weeks if the laboratory temperature exceeds 25°C (77°F) and/or the laboratory is located in a region where the relative humidity exceeds 50% (with the exception of air-conditioned premises).

To store opened pouches in a freezer, place the 3M Petrifilm REC Plates in a sealable container. To remove the frozen 3M Petrifilm REC Plates for use, open the container, remove the plates that are needed and immediately return remaining plates to the freezer in the sealed container. The freezer that is used for open pouch storage must not have an automatic defrost cycle as this would repeatedly expose the 3M Petrifilm REC Plates to moisture which can damage the plates.

Do not use 3M Petrifilm REC Plates that show any visible discoloration. Use by date and batch code are noted on each pouch of 3M Petrifilm REC Plates. The batch code is also noted on individual 3M Petrifilm REC Plates. 3M Petrifilm REC Plates should not be used past their use by date.

#### **△ Disposal**

After use, 3M Petrifilm REC Plates may contain microorganisms that may be a potential biohazard. Follow current industry standards and local regulations for disposal of biohazardous waste.

#### **Instructions for Use**

Follow all instructions carefully. Failure to do so may lead to inaccurate results.

##### **Sample Preparation**

1. Use appropriate sterile diluents:

Butterfield's phosphate-buffered dilution water, 0.1% peptone water, peptone salt diluent (Maximum Recovery Diluent), buffered peptone water, 0.85%-0.9% saline, phosphate buffered saline (PBS), distilled water or bisulfite-free letheen broth.

**Do not use diluents containing citrate, bisulfite or thiosulfate with the 3M Petrifilm REC Plates; they can inhibit growth.** If citrate buffer is indicated in the standard procedure, substitute with Butterfield's phosphate-buffered dilution water, warmed to 40-45°C.

2. Blend or homogenize the sample.
3. For optimal growth and recovery of microorganisms in acidic products (< pH 5), adjust the pH of the sample suspension to greater than pH 5. For acidic products, adjust the pH with 1N NaOH.

**Plating**

1. Place the 3M Petrifilm REC Plate on a flat, level surface.
2. Lift the top film and with the pipette perpendicular to the inoculation area dispense 1 mL of sample suspension onto the center of bottom film.
3. Roll the top film down onto the sample to prevent trapping air bubbles.
4. Place the 3M™ Petrifilm™ Flat Spreader (6425) with the flat side down on the center of the plate. Press gently on the center of the spreader to distribute the sample evenly. Spread the inoculum over the entire 3M Petrifilm REC Plate growth area before the gel is formed. Do not slide the spreader across the film.
5. Remove the 3M Petrifilm Flat Spreader and leave the plate undisturbed for at least one minute to permit the gel to form.

**Incubation**

Incubate the 3M Petrifilm REC Plates in a horizontal position with the clear side up in stacks of no more than 20 plates. Several incubation times and temperatures can be used depending on the current local reference methods, some of which are listed in the "Specific Instructions for Validated Methods" section.

**Interpretation**

1. 3M Petrifilm REC Plates can be counted using a standard colony counter or other illuminated magnifier. Do not count colonies on the foam dam since they are removed from the selective influence of the medium. Do not count artifact bubbles that may be present.
2. Interpretation of *E. coli* colonies is as follows:  
Enumerate blue to blue-green colonies with and without gas, regardless of size or intensity of color, as *E. coli*.

**⚠ WARNING**

**Do not use this plate for the specific detection of *E. coli* O157. Because most *E. coli* O157 strains are atypical, for example they are glucuronidase negative, they will not produce a blue color, and therefore will be detected as coliforms on 3M Petrifilm REC Plates.**

3. The interpretation of non-*E. coli* coliform colonies on the 3M Petrifilm REC Plate varies by reference method. For example:
  - a. The United States Food and Drug Administration (FDA) Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria<sup>10</sup>, defines coliforms as Gram negative rods, which produce acid and gas from lactose during metabolic fermentation. Non-*E. coli* coliform colonies on the 3M Petrifilm REC Plate are red and closely associated (within one colony diameter) with entrapped gas. Colonies not associated with gas (a distance greater than one colony diameter between colony and gas bubble) are not counted as coliforms. The total coliform count consists of both the red colonies with gas and blue colonies with and without gas.
  - b. ISO defines coliforms by their ability to grow in method-specific, selective media. ISO 4832<sup>4</sup> enumerates typical coliform colonies on Violet Red Bile Lactose (VRBL) agar, with confirmation of atypical colonies. On the 3M Petrifilm REC Plate, non-*E. coli* coliforms are red colonies with and without gas production. The total coliform count is indicated by red colonies with or without gas production and blue colonies with and without gas production.
4. Countable Range:
  - a. The counting range for *E. coli* on the 3M Petrifilm REC Plate is lower than or equal to 100 blue to blue-green colonies with and without gas regardless of the number of total colonies.
  - b. The counting range for total coliforms on 3M Petrifilm REC Plate is lower than or equal to 100 colonies excluding tiny, pale pink colonies.
  - c. The countable range for *E. coli* or total coliform may occur on separate dilutions.

The circular growth area is approximately 30 cm<sup>2</sup>. Estimates can be made on 3M Petrifilm REC Plates containing greater than 100 colonies. Count the number of colonies in one or more representative squares and determine the average number per square. Multiply the average number by 30 to determine the estimated count per 3M Petrifilm REC Plate.

5. 3M Petrifilm REC Plates with colony counts too numerous to count (TNTC) may have one or more of the following characteristics: lightening of the gel color to yellow, many small, indistinct red or blue colonies and/or many gas bubbles. High concentrations of *E. coli* or coliforms may cause the outer edge of the growth area to turn pink to pink orange. When this occurs, record results as TNTC. For a more accurate count, further dilution of the sample may be necessary.



6. When necessary, colonies may be isolated for further identification. Lift the top film and pick the colony from the gel. Test using standard procedures.
7. If the 3M Petrifilm REC Plates cannot be counted within the incubation period, they may be stored for later enumeration by freezing in a sealable container at temperatures lower than or equal to negative 15°C (5°F) for no longer than one week.

**Specific Instructions for Validated Methods**

**AOAC® Performance Tested Methods<sup>SM</sup> Certificate #051801**

In an AOAC Research Institute *Performance Tested Methods* (PTM) study, the 3M Petrifilm REC Plate method was found to be equivalent to the average log counts of the United States FDA BAM Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria, ISO 4832: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony count technique, and ISO 16649: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of β-glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 2: colony count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide.

**Scope of the Validation:** Broad range of foods and select environmental surfaces.

**Incubation:**

**Dairy products:**

Incubate the 3M Petrifilm REC Plates 18-24 hours at 30 ± 1°C or 32 ± 1°C for coliforms and *E. coli* or 42 ± 1°C for *E. coli*.

**All other foods:**

Incubate the 3M Petrifilm REC Plates 18-24 hours at 35 ± 1°C or 37 ± 1°C for coliforms and *E. coli* or 42 ± 1°C for *E. coli*.



For further information refer to the “3M™ Petrifilm™ Rapid *E. coli* / Coliform Count Plate Interpretation Guide”. If you have questions about specific applications or procedures, please visit our website at [www.3M.com/foodsafety](http://www.3M.com/foodsafety) or contact your local 3M representative or distributor.

**References**

1. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
2. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
3. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
4. ISO 4832. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony count technique.
5. ISO 4831. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms – Most probable number technique.
6. NF V08-060. General guidance for the enumeration of fecal coliforms – Colony count technique (VRBL) at 44°C – Routine method.
7. FDA. Bacteriological Analytical Manual (BAM), Reagents Index for BAM found at: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm055791.htm>.
8. ISO 6887-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.
9. ISO 16649-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of β-glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 2: colony count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide.
10. FDA. Bacteriological Analytical Manual (BAM), 8<sup>th</sup> Edition, Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria online.

Refer to the current versions of the standard methods listed above.

**Explanation of Symbols**

[www.3M.com/foodsafety/symbols](http://www.3M.com/foodsafety/symbols)

AOAC is a registered trademark of AOAC INTERNATIONAL

Performance Tested Method is a service mark of AOAC INTERNATIONAL

## ANEXO 4. DETERMINACION DE CONCENTRACION DE OZONO RESIDUAL EN AGUA

### I. OBJETIVO

Determinar la concentración de Ozono Residual en el Agua.

### II. TERMINOLOGÍA

- DPD: dietil-para-fenil-diamina

### III. INSUMOS, MATERIALES Y EQUIPOS

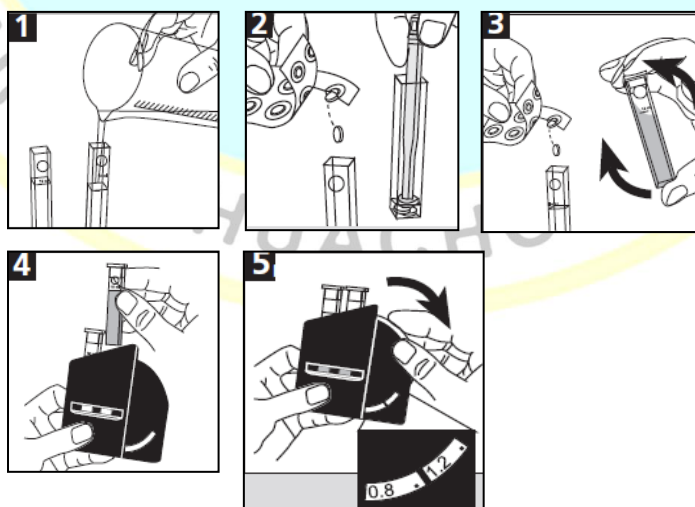
- CHECKIT® Disc ( 0 - 1,0 mg O<sub>3</sub>/L) - LOVIBOND
- Tabletas DPD No.4 - LOVIBOND

### IV. NORMAS DE SEGURIDAD

- Manipular los insumos químicos con precaución, evitando en todo momento el contacto directo de los productos con piel, mucosas y ojos.

### V. PROCEDIMIENTO

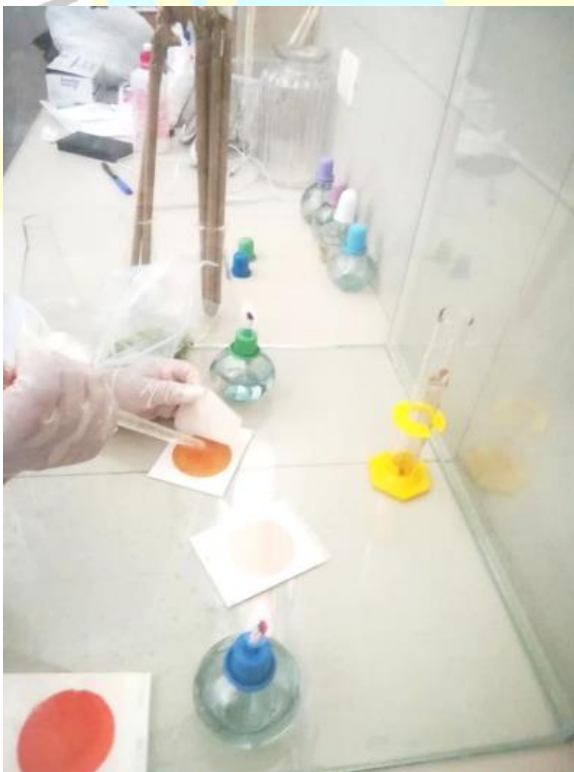
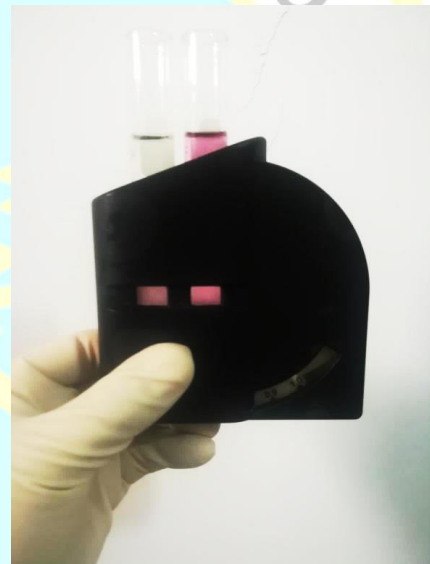
- Llenar ambas cubetas con la prueba hasta la marca de 10 ml.
- Colocar una cubeta como ensayo en blanco en el compartimento izquierdo del Comparador.
- Añadir a la segunda cubeta una tableta DPD No. 4 y cerrarla con su tapa.
- Agitar hasta la disolución total de la tableta.
- Colocar esta cubeta en el compartimento derecho.
- Una vez realizada la igualación del color producido en la cubeta con el CHECKIT® Disc, leer el resultado de mg/L de O<sub>3</sub>.



**ANEXO 5. INFORME DE ENSAYO DEL ANÁLISIS DE *E. coli* PARA LA MUESTRA A-002 CON EL TRATAMIENTO T9 CON AGUA OZONIZADA**

	<p><b>LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS</b>  <b>UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA</b></p> <p><i>Instituto de Certificación, Inspección y Ensayos</i></p>					
<p><b>INFORME DE ENSAYOS</b>  <b>N° 011251 - 2018</b></p>						
<p><b>SOLICITANTE</b> : CARO DEGOLLAR EDSON MAX  <b>DIRECCIÓN LEGAL</b> : CA. 5 DE SEPTIEMBRE N°128 A - HUARAL - LIMA  <b>PRODUCTO</b> : HORTALIZAS MINIMAMENTE PROCESADAS EN EL MERCADO MODELO DE HUARAL  <b>NÚMERO DE MUESTRAS IDENTIFICACIÓN/MTRA.</b> : Uno  <b>CANTIDAD RECIBIDA</b> : CÓDIGO: A002  <b>MARCA(S)</b> : TRATAMIENTO T9 CON AGUA OZONIZADA  <b>FORMA DE PRESENTACIÓN</b> : 350,1 g (+envase) de muestra proporcionada por el solicitante.  <b>SOLICITUD DE SERVICIO REFERENCIA</b> : S.M.  <b>FECHA DE RECEPCIÓN</b> : Envasado, la muestra ingresa en bolsa sellada a temperatura ambiente.  <b>ENSAYOS SOLICITADOS</b> : S/S N°EN-007113 -2018  <b>PERÍODO DE CUSTODIA</b> : PERSONAL  <b>RESULTADOS :</b>  <b>ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS :</b>  <b>ALCANCE :</b> N.A.</p>	<p><b>FECHA DE RECEPCIÓN</b> : 20/12/2018  <b>ENSAYOS SOLICITADOS</b> : MICROBIOLÓGICO  <b>PERÍODO DE CUSTODIA</b> : No aplica</p>					
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">ENSAYOS</th> <th style="width: 50%;">RESULTADO</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">1.- N. de E. coli (NMP/g)</td> <td style="text-align: center;">21</td> </tr> </tbody> </table>			ENSAYOS	RESULTADO	1.- N. de E. coli (NMP/g)	21
ENSAYOS	RESULTADO					
1.- N. de E. coli (NMP/g)	21					
<p><b>MÉTODOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO :</b>                  1.- ICMSF Vol. I Parte II Ed. II Pág. 131-134; 138-142 (Traducción Versión Original 1978) Reimpresión 2000 (Ed. Acribia) 1983</p>						
<p><b>FECHA DE EJECUCION DE ENSAYOS:</b> Del 20/12/2018 Al 31/01/2018.</p>						
<p><b>ADVERTENCIA :</b>                  1.- El muestreo, las condiciones de muestreo, tratamiento y transporte de la muestra hasta su ingreso a La Molina Calidad Total - Laboratorios son de responsabilidad del Solicitante.                  2.- Se prohíbe la reproducción parcial o total del presente Informe sin la autorización de La Molina Calidad Total - Laboratorios.                  3.- Válido sólo para la cantidad recibida. No es un Certificado de Conformidad ni Certificado del Sistema de Calidad de quien lo produce.                  4.- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL-DA</p>						
<p>La Molina, 31 de Diciembre de 2018</p>						
	<p><b>LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS-UNALM</b></p>  <p><b>Mg. Mg. Quím. Mary Flor Césare Coral</b>  <b>DIRECTORA TÉCNICA</b>  <b>C.Q.P. N° 635</b></p>					
<p>Pág 1/1</p>						

## ANEXO 6. VISTAS FOTOGRÁFICAS DEL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN



---

**[Dr. Fredesvindo, FERNÁNDEZ HERRERA]**  
**ASESOR**

---

**Dr. Danton Jorge, MIRANDA CABRERA**  
**PRESIDENTE**

---

**Dr. José Vicente, NUNJA GARCIA**  
**SECRETARIO**

---

**M(o). Guillermo, VASQUEZ CLAVO**  
**VOCAL**

