

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**CONTAMINACION MICROBIOLÓGICA POR *Escherichia coli* Y *Salmonella sp.* EN *Citrus sinensis* (naranja) Y *Solanum lycopersicum* (tomate) EN LAS CIUDADES DE PUNO Y JULIACA, 2018.**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**Bach. ERIKA FLORES ADUVIRI**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGIA**

**PUNO – PERÚ**

**2019**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

CONTAMINACION MICROBIOLÓGICA POR *Escherichia coli* Y *Salmonella sp.* EN  
*Citrus sinensis* (naranja) Y *Solanum lycopersicum* (tomate) EN LAS CIUDADES DE  
PUNO Y JULIACA, 2018.

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. ERIKA FLORES ADUVIRI



PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

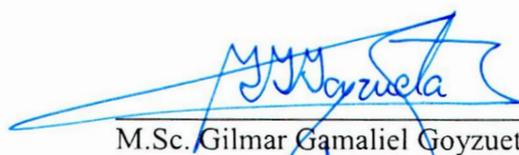
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

APROBADA POR:

PRESIDENTE:

  
M.Sc. Eva Laura Chauca de Meza.

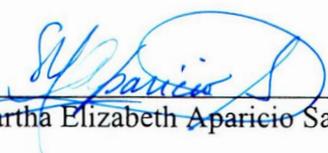
PRIMER MIEMBRO:

  
M.Sc. Gilmar Gamaliel Goyzueta Camacho

SEGUNDO MIEMBRO:

  
Mg. Dante Mamani Sairitupac

DIRECTOR / ASESOR:

  
Mg. Martha Elizabeth Aparicio Saavedra

Área : Ciencias Biomédicas

Tema : Salud Pública

Fecha de sustentación: 23 de Julio del 2019

## DEDICATORIA

### **A Dios**

Por ser mi fortaleza espiritual quía que ilumina mi camino para procurar ser cada día mejor ser humano

### **A mis padres**

Esta tesis está dedicada a la memoria de mi mamá Natividad Aduviri Chaiña, que siempre vivirá en mi corazón.

A mi papá Eulogio Flores Mamani, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy, es un orgullo y privilegio ser tu hija, son los mejores padres.

### **A mis hermanas**

Yaneth Flores Aduviri y Luz Karina Flores Aduviri, por estar siempre presentes, acompañándome y por todo el apoyo moral, que me brindan a lo largo de mi existencia

### **A mi sobrina**

Nicol Brida Flores Flores, por ser el motivo de no rendirme contra los obstáculos de la vida.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a mis amigas, por apoyarme cuando más los necesite, y estoy agradecida por haber encontrado unas amigas como ustedes, las quiero mucho.

## AGRADECIMIENTO

- ❖ Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi vida y la de toda mi familia.
- ❖ Agradezco a mis padres por todo el esfuerzo que realizaron para que hoy sea una profesional.
- ❖ A mis docentes de la Escuela Profesional de Biología, por transmitirme sus conocimientos durante mi formación profesional.
- ❖ A mi Directora de Tesis Blga. Mg. Martha Elizabeth Aparicio Saavedra, por su orientación, apoyo, colaboración profesional en mi proyecto de investigación.
- ❖ A los miembros del jurado calificador: M.Sc. Eva Laura Chauca de Meza, M.Sc. Gilmar Gamaliel Goyzueta Camacho y Mg. Dante Mamani Sairitupac. Por sus aportes a mi trabajo de investigación.
- ❖ Agradezco infinitamente al lic. Lorgio Palacios, el principal colaborador durante todo el proceso, quien, con su experiencia, conocimiento, enseñanza, permitió el desarrollo de esta investigación.
- ❖ Al señor Tebes, por su apoyo, por toda la disposición que tuvo conmigo en los análisis de laboratorio.
- ❖ Al señor Ordoñez, por su motivación constante durante todo el proceso de ejecución de mi proyecto de Investigación.
- ❖ Al señor Jacinto, por su colaboración con libros, tesis, guías, etc.
- ❖ Al doc. John Eduardo Zapana Quispe, por estar siempre apoyándome en todo el proceso de mi tesis.
- ❖ A mis amigos y amigas Lehidly, Liz Dina, Mariela, Danitza, Keiko, Anais, Vianey, etc. con todos los que compartí dentro y fuera de las aulas, que se convierten en colegas, gracias por todo su apoyo, alegría y diversión.

<b>INDICE</b>	<b>Pag.</b>
INDICE DE FIGURAS .....	7
INDICE DE CUADROS .....	7
ÍNDICE DE TABLAS .....	8
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS .....	9
RESUMEN .....	10
ABSTRACT.....	11
I. INTRODUCCION.....	12
1.1. OBJETIVOS DE ESTUDIO .....	13
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
2.1. Antecedentes de Investigación .....	14
2.2. Marco Teórico .....	17
2.2.1. Las Frutas .....	17
2.2.1.1. Frutas Cítricas: <i>Citrus sinensis</i> (naranja) .....	17
2.2.1.2. <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) .....	20
2.2.2. Transporte de frutas .....	22
2.2.3. Inocuidad de alimentos .....	23
2.2.4. Instituciones que regulan la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos.....	23
2.2.5. Factores ambientales que influyen en la contaminación de frutas .....	25
2.2.6. Enfermedades transmitidas por el alimento .....	26
2.2.7. Bacterias indicadoras de la calidad higiénica de los alimentos .....	26
2.2.7.1. <i>Escherichia coli</i> .....	26
2.2.7.2. <i>Salmonella sp.</i> .....	27
2.2.8. Criterio Microbiológico .....	29

III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
3.1. Metodología .....	30
3.1.1. Tipo de Investigación .....	30
3.1.2. Área de Estudio.....	30
3.1.3. Descripción de Equipos, Materiales e Insumos .....	31
3.1.4. Métodos de análisis:.....	32
3.1.5. Metodología para determinar la bacteria <i>Escherichia coli</i> en la fruta de <i>Citrus sinensis</i> (naranja). .....	32
3.1.6. Metodología para determinar presencia de la bacteria <i>Salmonella sp.</i> en la fruta de <i>Citrus sinensis</i> (naranja).....	35
3.1.7. Aplicación de la prueba bioestadística.....	37
3.1.8. Metodología para determinar la bacteria <i>Escherichia coli</i> en la fruta de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate). .....	38
3.1.9. Metodología para determinar la presencia de la bacteria <i>Salmonella sp.</i> en la fruta de <i>Solanum Lycopersicum</i> (tomate) .....	41
3.1.10. Variables que se analizara.....	42
3.1.11. Aplicación de la prueba bioestadística.....	43
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
V. CONCLUSIONES.....	55
VI. RECOMENDACIONES .....	56
VII. REFERENCIAS .....	57
ANEXOS .....	63

## INDICE DE FIGURAS

	Pag.
<b>Figura 1.</b> Naranja y tomate homogenizado para la evaluación de <i>Escherichia coli</i> , periodo abril-junio, Puno- 2018.....	71
<b>Figura 2.</b> Ensayo de presunción para <i>Escherichia coli</i> en caldo Lactosado, periodo abril-junio, Puno- 2018.....	71
<b>Figura 3.</b> Ensayo de confirmación de <i>Escherichia coli</i> en caldo verde brillante bilis lactosa, periodo abril-junio, Puno- 2018. ....	72
<b>Figura 4.</b> <i>Escherichia coli</i> en agar selectivo Eosina Azul de Metileno (EMB), periodo abril-junio, Puno- 2018.....	72
<b>Figura 5.</b> Prueba bioquímica para <i>Escherichia coli</i> en agar TSI, CS, LIA, Indol, periodo abril-junio, Puno- 2018.....	73
<b>Figura 6.</b> Pesado de las muestras de naranja y tomate, recopiladas en las zonas de estudio, periodo abril-junio, Puno- 2018.....	73
<b>Figura 7.</b> Triturado de las muestras en un mortero, periodo abril-junio, Puno- 2018 .....	74
<b>Figura 8.</b> Pre-enriquecimiento en caldo peptona de las muestras de tomate y naranja, para la evaluación de <i>Salmonella sp.</i> , periodo abril-junio, Puno- 2018. ....	74
<b>Figura 9.</b> Fase de enriquecimiento en agar tetracionato, para la evaluación de <i>Salmonella sp.</i> , periodo abril-junio, Puno- 2018.....	75
<b>Figura 10.</b> Version en placas de <i>Salmonella sp.</i> en agar SS. periodo abril-junio, Puno- 2018.....	75

## INDICE DE CUADROS

	Pag.
<b>Cuadro 1.</b> Valor nutricional de <i>Citrus sinensis</i> (naranja) .....	19
<b>Cuadro 2.</b> Valor nutricional de <i>Solanum lycopersicum</i> . (tomate) .....	22
<b>Cuadro 3.</b> Criterio microbiológico de calidad sanitaria de frutas y hortalizas frescas..	29

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
<b>Tabla 1.</b> Promedios de carga bacteriana (NMP/g) de <i>Escherichia coli</i> en <i>Citrus sinensis</i> (naranja), que se expenden en los mercados Unión y Dignidad de la ciudad de Puno y mercado internacional Túpac Amaru de la ciudad de Juliaca, 2018. ....	45
<b>Tabla 2.</b> Frecuencia de <i>Escherichia coli</i> en los puestos de venta de <i>Citrus sinensis</i> (naranja) en las ciudades de Puno y Juliaca, 2018. ....	47
<b>Tabla 3.</b> Frecuencia de la presencia de <i>Salmonella sp.</i> en <i>Citrus sinensis</i> (naranja) que se expenden en los mercados Unión y Dignidad de la ciudad de Puno y el mercado Internacional Túpac Amaru de la ciudad de Juliaca, 2018. ....	48
<b>Tabla 4.</b> Promedios de carga bacteriana (NMP/g) de <i>Escherichia coli</i> en <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate), que se expenden en los mercados Unión y Dignidad de la ciudad de Puno y el mercado Internacional Túpac Amaru de la ciudad de Juliaca, 2018. ....	50
<b>Tabla 5.</b> Frecuencia de <i>Escherichia coli</i> en <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) en los puestos de venta de las ciudades de Puno y Juliaca, 2018. ....	51
<b>Tabla 6.</b> Frecuencia de la presencia <i>Salmonella sp.</i> en <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate), que se expenden en los mercados Unión y Dignidad de la ciudad de Puno y el mercado Internacional Túpac Amaru de la ciudad de Juliaca, 2018. ....	53

## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

<b>°C</b>	: Grados centígrados
<b>COMPIAL</b>	: Comisión Multisectorial Permanente de Inocuidad alimentaria
<b>DIGESA</b>	: Dirección General de Salud Ambiental
<b>ETA</b>	: Enfermedades Transmitidas por Alimentos
<b>DE</b>	: Desviación Estándar
<b>FAO</b>	: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura
<b>HACCP</b>	: Análisis de Peligros y de los Puntos Críticos de Control
<b>g</b>	: Gramo
<b>gl</b>	: Grados de libertad
<b>LI</b>	: Límite Inferior
<b>LS</b>	: Limite Superior
<b>ml</b>	: Mililitros
<b>NMP</b>	: Número Más Probable
<b>OMS</b>	: Organización Mundial de la Salud
<b>P</b>	: Promedio
<b>PVJ</b>	: Puesto de Venta de Juliaca
<b>PVP</b>	: Puesto de Venta de Puno
<b>SENASA</b>	: Servicio Nacional de Sanidad Agraria
<b>t</b>	: Prueba Estadística de “t de student”
<b>UFC</b>	: Unidades Formadoras de Colonias
<b>UNICEF</b>	: Fondo Internacional de Emergencia de las Naciones Unidas para la Infancia.
<b>PNIA</b>	: Política nacional de inocuidad alimentaria

## RESUMEN

Los productos de consumo humano como las frutas en la región de Puno, presentan deficiencias en la cosecha, transporte, manejo, manipulación y comercialización de estos mismos, y son susceptibles a cualquier contaminación biológica como las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* que pueden producir enfermedades gastrointestinales. El objetivo fue determinar la contaminación microbiológica por *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* en frutas de *Citrus sinensis* (naranja) y *Solanum lycopersicum* (tomate) en la ciudad de Puno y Juliaca en el 2018. Se utilizó métodos estandarizados de los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos del Ministerio de Salud (DIGESA) y métodos de análisis microbiológico de alimentos, para el estudio se consideró 150 muestras naranja y 150 de tomate adquiridas al azar, de los mercados Unión y Dignidad (Puno) e Internacional Túpac Amaru (Juliaca). Las muestras se recolectaron en condiciones de esterilidad, se transportaron al laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas para el análisis respectivo. Para el análisis estadístico se consideró la prueba t de student, análisis de varianza, contraste de Tukey y Ji cuadrado, realizados en el programa *InfoStat*. Los resultados: la bacteria *Escherichia coli* en naranja mostró un promedio de 1483.59 NMP/g para Puno, 1484.66 NMP/g para Juliaca, siendo el 100% de las muestras contaminadas. En tomate resultó en promedio 1783.73 NMP/g para Puno y 2359.6 NMP/g para Juliaca, siendo el 86% de las muestras contaminadas con *Escherichia coli*. La presencia de *Salmonella sp. en Citrus sinensis* (naranja) en Puno y Juliaca fue del 70%, mientras que para *Solanum lycopersicum* (tomate) fue de 60%. Los resultados expresan que las frutas de *Citrus sinensis* (naranja) y *Solanum lycopersicum* (tomate) vendidos en los mercados de Puno y Juliaca, presentaron niveles superiores a los límites con respecto a la bacteria *Escherichia coli* según la Norma Sanitaria. Se concluye que la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* en naranja y tomate en las ciudades de Puno y Juliaca superan los límites permisibles de calidad de alimentos y presentando contaminación de origen fecal, constituyendo un riesgo para la salud del hombre.

**Palabras Clave:** contaminación, *Escherichia coli*, naranja, *Salmonella sp.*, tomate.

## ABSTRACT

Products for human consumption, such as fruits in the Puno region, have deficiencies in their harvest, transport, handling, handling and commercialization, and are susceptible to any biological contamination such as *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* They can cause gastrointestinal diseases. The objective was to determine the microbiological contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* in fruits of *Citrus sinensis* (orange) and *Solanum lycopersicum* (tomato) in the city of Puno and Juliaca in 2018. Standardized methods of the microbiological criteria of sanitary quality and food safety of the Ministry of Health (DIGESA) and methods were used of microbiological analysis of food, for the study 150 orange and 150 tomato samples were randomly acquired, from the Union and Dignity (Puno) and Túpac Amaru (Juliaca) markets. The samples were collected under sterile conditions, transported to the Microbiology of food laboratory of the Faculty of Biological Sciences for the respective analysis. For the statistical analysis, the student's t-test, analysis of variance, contrast of Tukey and Chi square, considered in the InfoStat program were considered. The results: *Escherichia coli* bacteria in orange showed an average of 1483.59 NMP / g for Puno, 1484.66 NMP / g for Juliaca, 100% of the samples being contaminated. In tomato, an average of 1783.73 NMP / g for Puno and 2359.6 NMP / g for Juliaca, 86% of the samples contaminated with *Escherichia coli*. The presence of *Salmonella sp.* in *Citrus sinensis* (orange) in Puno and Juliaca it was 70%, while for *Solanum lycopersicum* (tomato) it was 60%. The results express that the fruits of *Citrus sinensis* (orange) and *Solanum lycopersicum* (tomato) sold in the markets of Puno and Juliaca, presented levels above the limits with respect to the *Escherichia coli* bacteria according to the Sanitary Standard. It is concluded that the presence of *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* in orange and tomato in the cities of Puno and Juliaca they exceed the permissible limits of food quality and presenting contamination of fecal origin, constituting a risk to the health of man.

**Keywords:** contamination, *Escherichia coli*, orange, *Salmonella sp.*, Tomato.

## I. INTRODUCCION

La alimentación es vital para la existencia de cualquier ser vivo, debido a que proporciona elementos que permiten reponer aquellos que hemos perdido a través de las actividades que desarrollamos día a día, sin embargo, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en todo el mundo se ha incrementado los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos asociadas al consumo de frutas contaminadas por bacterias.

*Citrus sinensis* (naranja) es una fruta que presenta vitamina C, dado a sus propiedades antioxidantes, su gran influencia en el proceso de cicatrización, además de mejorar el sistema inmunológico frente a los resfriados y contraer gripes, evitando la bronquitis, alergia, fiebre, neumonía y resfriados, por esta razón el departamento de Puno presenta gran demanda social en los meses de abril, mayo y junio debido a las bajas temperaturas que se presentan, sin embargo; podemos observar que no se venden en las condiciones adecuadas, los expendedores no presentan la indumentaria requerida para garantizar la inocuidad de este producto, la inadecuada manipulación de la fruta y dinero al mismo tiempo contamina el producto expendido, también el polvo que corre por las mañanas y tardes tanto en la ciudad de Puno y Juliaca lleva consigo partículas que pueden contaminar las frutas.

*Solanum lycopersicum* (tomate), de igual manera, es uno de los ingredientes más importantes en la gastronomía, tanto en mermeladas, salsas, ensaladas, tomate relleno, sopas, segundos, etc. El tomate es la principal fuente dietética del antioxidante licopeno, son gran fuente de fibra, vitamina C, potasio, y según recientes investigaciones que demostraron que el consumo de tomate reduce el riesgo de desarrollar patología cardiovascular y ciertos tipos de cáncer, por esta razón presenta gran demanda a nivel mundial, en la ciudad de Puno y Juliaca, el tomate es un producto esencial en la canasta familiar, no obstante; una serie de prácticas en torno a su producción, cosecha y comercialización, la manipulación hace que este tipo de alimentos se convierta en un vehículo potencial de microorganismos patógenos que pueden afectar la salud de la población, a esto se suma, los animales domésticos (perros) abandonados, circulen constantemente por los mercados y que sean portadores de patógenos y de más microorganismos que alteren la calidad del producto expendido.

La inocuidad de los alimentos es fundamental en la salud pública de todos los países, en setiembre del 2006, una epidemia causada por *E. coli* O157:H7 fue asociada al consumo de espinaca, esta crisis alimentaria afecto a 26 estados de Estados Unidos y Canadá, causando 205 infecciones y tres muertes. Este evento produjo la retirada más de 42000 bolsas de espinaca (CDC, 2006). La industria tomatera en Estados Unidos y México tuvo pérdidas superiores a 200 millones de dólares debido a la crisis alimentaria. Una de las epidemias más grandes fue la ocurrida en Alemania y Francia en el 2011, este brote provocó más de 3500 casos de diarrea hemorrágica causada por *E. coli* serotipo O104:04 y 44 personas perdieron la vida (Askar *et al.*, 2011). En la región Puno los productos de consumo humano no son los más adecuados, ni en el transporte, manejo, manipulación y comercialización; por lo que es importante la identificación de bacterias que se encuentran en los productos de consumo humano como las frutas de naranja y tomate, lo que ocasionan problemas en la salud pública, mayormente a menores de edad y adultos mayores, según los reportes del Ministerio de Salud del año 2017, los riesgos probables de la ciudad de Puno son 143788 y 283818 casos notificados en la ciudad de Juliaca de enfermedades diarreicas agudas.

## 1.1.OBJETIVOS DE ESTUDIO

### Objetivo General

Determinar la contaminación microbiológica por *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* en frutas de *Citrus sinensis* (naranja) y *Solanum lycopersicum* (tomate) en la ciudad de Puno y Juliaca – 2018.

### Objetivos Específicos

- Determinar la carga bacteriana de *Escherichia coli* y la presencia de *Salmonella sp.* en *Citrus sinensis* (naranja), expendidos en los mercados Unión y Dignidad de Puno y el Mercado Internacional Túpac Amaru en Juliaca.
- Determinar la carga bacteriana de *Escherichia coli* y la presencia de *Salmonella sp.* en *Solanum lycopersicum* (tomate), expendidos en los mercados Unión y Dignidad de Puno y el Mercado Internacional Túpac Amaru en Juliaca.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Antecedentes de Investigación

La calidad de los alimentos ha sido analizada por varios investigadores de distintos países explicando la presencia de microorganismos patógenos en alimentos como verduras, hortalizas, jugos de frutas, frutas de consumo directo, etc., y las consecuencias que trae al consumir un alimento contaminado afectando al sistema digestivo, dado que puede desarrollar enfermedades gastrointestinales perjudicando la calidad de vida de las personas que lo consumen.

A nivel internacional, Calderón *et al.* (2017) investigaron la seguridad microbiológica de los jugos de naranja expendidos en los alrededores de la Universidad Politécnica Salesiana- sede Quito en Ecuador, donde comprobaron que el 40% de los jugos expendidos no son aptos para el consumo humano, porque sobrepasan los límites permisibles de coliformes totales según la Normativa Técnica Ecuatoriana; asimismo Escobar y Rodrigues (2016) evaluaron los jugos comercializados en los alrededores del campus central de la Universidad de El Salvador en Argentina, encontrando que el 100% de las muestras presentaron *Escherichia coli*, el 87.50% presentaron *Salmonella spp.*, estos porcentaje de muestras exceden los límites establecidos por el Reglamento Técnico Centroamericano; y posteriormente Valensuela *et al.* (2016) encontraron que el 11.11% de las muestras analizadas del sistema productivo de tomate en la región lagunera de Durango en México presentaron *Salmonella spp.*

Piedra *et al.* (2016) determinaron el estado de inocuidad del sistema productivo de tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*) en relación a la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 en México, realizando 3 muestreos, el primero presentó un 91.3 %, el segundo 72.73 % y el tercero 42.11 % de bacterias presentes como *E. coli* y *Salmonella spp.*; de igual forma Ocaña *et al.*, (2015) en su investigación, Calidad microbiológica del tomate (*Solanum lycopersicum*) producido bajo condiciones de invernáculo en 5 municipios del estado de México, reportó en los municipios de Coatepec Harinas 134,85 UFC/ml y Texcaltitlán 210,142 UFC/ml de coliformes fecales, sobrepasando el límite permitido; también Rodríguez *et al.*, (2015) evaluaron la contaminación microbiológica de lechuga en la provincia de Quillacollo en Cochabamba, Bolivia; en las áreas de cultivo, las parcelas analizadas presentaron contaminación bacteriana en un promedio de Coliformes

fecales de  $3 \times 10^4$  UFC/gr. en otoño y  $1.9 \times 10^7$  UFC/gr en Invierno, Bayona (2012) en su investigación Prevalencia de *Salmonella* y enteroparásitos en alimentos y manipuladores de alimentos de ventas ambulantes y restaurantes en un sector del norte de Bogotá, reporto que el 25% de los alimentos ambulantes y el 7.5 % de los alimentos de venta establecida de ensalada de frutas, yogurth con cereal arepa rellena, pincho de carne y chorizo frito, fueron positivos para *Salmonella spp.*

Zambrano (2011), en su estudio Control de microorganismos patógenos y deteriorativos en jugos de naranja (*Citrus sinensis L.*) y mango (*Mangifera indica*), estudio la actividad microbiana de plantas como Ginseng, *Ginkgo biloba*, extracto de semillas y cáscaras de uvas roja y Aloe vera, determinándose actividad antimicrobiana en todos los compuestos empleados, *E. coli* O157:H7 resultó ser más resistente al tratamiento, observándose una reducción total de la población a los 7 días, en tanto, Avila y Fonseca (2008) evaluó la calidad microbiológica en jugos preparados en hogares de bienestar en Bogotá, el municipio de Villapinzon tuvo 58.3% aceptable, Gachacipa 41.6%, Choconta con 25%, Suesca 16% y Sesquile con ninguna muestra aceptable de coliformes totales y Olvera (2007) estudio la frecuencia y comportamiento de *Salmonella*, y microorganismos indicadores de higiene en jugo de zanahoria en México, los resultados mostraron que el 23% de todos los jugos presentaron contaminación fecal, y mala calidad microbiológica respecto a *E.coli*.

En el Perú, Galarza (2018) evaluó alimentos sin tratamiento térmico (jugos de fruta, sandía y piña en rodajas) en la vía pública del cercado de Lima, reportando la presencia al 100% de coliformes totales, con un 30% fuera del rango permisible y el 70% dentro del límite máximo permitido por la Norma Técnica Sanitaria, en cuanto a Velasquez (2017) evaluó alimentos sin tratamiento térmico (ensalada) en el servicio de alimentación del batallón de la policía Militar 503 en Chorrillos, reportando mayores a 1100 nmp/g en *Escherichia coli* y ausencia en cuanto a *Salmonella sp.*

Alvarez (2011) reportó que el 100 % de los alimentos evaluados en los kioscos escolares en Cusco no presentaron *Escherichia coli* y 5 instituciones mostraron *Salmonella* de las 13 evaluadas, además Rivera *et al.* (2009) en su trabajo de investigación, Contaminación Fecal en Hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, determino el nivel de coliformes fecales y la frecuencia de *Escherichia coli* en 85 muestras de

hortalizas, el 40% presentó coliformes fecales en número más probable por gramo (NMP/g) e importante frecuencia de *E. coli* en perejil y lechuga.

Muñoz (2005) en su investigación Frecuencia de enterobacterias en verduras frescas de consumo crudo expandidas en cuatro mercados de Lima Metropolitana, reportó que el 18.9% y 56.7% del total de verduras, el 22.2% y 64.4% de verduras provenientes de los mercados la Parada y Ceres, presentaron niveles de colifecales superiores a lo establecido, además, el 2.2% de verduras del mercado Caquetá presentó niveles de *E. coli* superiores a lo establecido por la ICMSF y el MINSA, respecto a *Salmonella spp.*, el 10% de las verduras presentó contaminación, resaltando la col en el mercado Ramón Castilla, presentó el mayor porcentaje (20%).

Barco (2001) determinó la presencia de *Escherichia coli* en jugos surtidos reportó el 6%, jugo de papaya 13% y jugo de piña 0%, en centros de abasto de Lima, también Quispe y Sánchez (2001) evaluaron la calidad microbiológica y sanitaria de los puestos de venta ambulancia de ensaladas del distrito de Comas reportando el 64% de coliformes fecales.

A nivel local, Farfan (2010) realizó la investigación sobre las Condiciones sanitarias y la presencia de *Escherichia coli* en lechugas (*Lactuca sativa*) de emparedados, expandidas en los 18 kioscos de la Universidad Nacional del Altiplano- Puno, reportando como resultado, 14 aptos para el consumo y 04 no aptos para el consumo humano, ya que superan los límites permisibles para el consumo, referente a las condiciones sanitarias, 5 kioscos obtuvieron más de 75 puntos considerado como aceptable y 13 kioscos se encontró en proceso de mejorar.

## 2.2. Marco Teórico

### 2.2.1. Las Frutas

La fruta es el elemento básico en toda canasta familiar, constituyen uno de los alimentos naturales más importantes, ricos en vitaminas y minerales (INEI, 2009). El contenido en su interior de las frutas están semillas o cuescos (guayaba, maracuyá, manzana, papaya, piña, uva, mango, melón y sandía, entre otros), también se incluyen a las frutas cítricas (naranja, pomelo, limón y lima); se excluyen de esta clasificación los frutos rodeados de una cascara seca (nueces, avellanas, castañas y la palta), existen algunos alimentos culinariamente clasificados como verduras, pero que botánicamente son frutas como pepino, pimentón, calabaza y el tomate (FAO, 2011). En el Perú, el plátano es la fruta con mayor consumo promedio per cápita anual con 26 kilos 400 gramos al año o 2 kilos 200 gramos al mes, seguido de la naranja y manzana entre otras (INEI, 2009). La OMS recomienda un consumo de 400 gr/día, y estudios muestran el enorme impacto potencial del aumento de la ingesta de frutas y verduras como medida de reducción de la incidencia de numerosas enfermedades no transmisibles que provocan aproximadamente 2.8 millones de muertes cada año (FAO, 2011).

#### 2.2.1.1. Frutas Cítricas: *Citrus sinensis* (naranja)

Es uno de los árboles frutales más cultivados del mundo originario del sur de China y el nordeste de la India, considerado un híbrido con habito de crecimiento abierto, con tamaño medio a grande; presenta hojas elípticas grandes a media, mientras que la flor es de tamaño mediano, con pétalos blancos y anteras amarillas, exceptuando el grupo Navel que presenta anteras blancas o amarillo pálido (Ancillo y Medina, 2014). El fruto es una baya denominada hesperidio de forma esférica, redonda achatada u ovoide, llena de pequeñas vesículas de pulpa ahusadas pedunculadas (endocarpo) que son como “lagrimitas” o sacos de jugo, cubiertas por un tejido blanco esponjoso (mesocarpo o albedo) y una cáscara (exocarpo o flavedo) con numerosas glándulas oleíferas muy desarrolladas que se notan en la superficie de la fruta como puntos redondos, oscuros y hundidos. La pulpa del fruto está formada por los carpelos o gajos con sus numerosas vesículas llenas de jugo, que contienen una glándula de aceite y cromatóforos que les conceden un color a las naranjas (amarillento o anaranjado). Los carpelos o gajos están separados por una película blanquecina transparente, en el interior de los gajos se

encuentran las semillas de forma elipsoidal, en algunos casos aplanadas con un extremo terminado en un pico irregular, las semillas pueden ser numerosas o estar prácticamente ausentes en algunos híbridos (FAO, 2007).

#### 2.2.1.1.1. Clasificación taxonómica de *Citrus sinensis*

<b>Reino</b>	:Plantae
<b>Division</b>	:Traqueofitas
<b>Clase</b>	:Dicotiledoneas
<b>Sub Clase</b>	:Arquiclamideas
<b>Orden</b>	:Geraniales
<b>Sub orden</b>	:Geraninas
<b>Familia</b>	:Rutaceae
<b>Genero</b>	: <i>Citrus</i>
<b>Especie</b>	: <i>Citrus sinensis</i>
<b>NV</b>	: <i>naranja</i>

Swingle y Reece (1967)

#### 2.2.1.1.2. Clasificación de *Citrus sinensis* (naranja) por categorías

La calidad de naranja se clasifica en tres categorías, considerando forma, aspecto exterior, coloración, entre otros. La categoría extra se refiere a las naranjas de calidad superior, tanto su forma, aspecto exterior, desarrollo y coloración deberán ser característicos de la variedad y/o tipo comercial; no presentan defectos, salvo defectos superficiales muy leves, siempre y cuando no afecten al aspecto general del producto, calidad, estado de conservación y presentación en el envase; de manera similar la categoría I indica buena calidad y características de la variedad y/o tipo comercial, permitiendo defectos leves en la coloración, forma, en la piel del fruto sea de origen mecánico (rozaduras, daños ocasionados por la manipulación, etc), siempre y cuando no afecten la calidad del producto. Muy por el contrario, la Categoría II no pueden clasificarse en las categorías superiores, pero satisfacen los requisitos mínimos. Podrán permitir defectos de forma, coloración, piel rugosa, alteraciones superficiales sin afectación a la pulpa, sin embargo deben conservar sus características esenciales en lo que respecta a su calidad, estado de conservación y presentación. CODEX STAN 245-2004, (2011).

### 2.2.1.1.3. Características de los cítricos.

El análisis fisicoquímico de la fruta (*Citrus sinensis*) determina un pH que varía entre valores de 2 para limones y otros frutos ácidos, 5 para mandarinas y naranjas; valores de hasta 9 se han encontrado en los cultivares “Valencia” y Washington navel” (Arevalo, 2013). Dentro de las propiedades físicas, el color, (aunque para el caso de los cítricos no es un parámetro de madurez) se puede considerar de calidad puesto que los consumidores de este tipo de fruta esperan el color característico, siendo éste el naranja para la variedad de cítrico. Por otro lado, el color de la fruta también es uno de los criterios para la clasificación a nivel comercial, los consumidores por lo general, son reacios a la hora de comprar fruta verde a excepción de las limas y los limones (Ladaniya, 2008).

### 2.2.1.1.4. Valor nutritivo, uso y aprovechamiento de cítricos

Los cítricos están constituidos principalmente de 80 a 85 % de agua y 12 a 15 % de sólidos totales. Prácticamente no contienen almidón y su contenido de proteínas y grasa es muy bajo. Contienen aproximadamente de 5 a 7 % de ácido cítrico dependiendo de la especie. Son una excelente fuente de vitamina C, tanto que un vaso de jugo de naranja por lo general contiene la cantidad diaria requerida por el organismo humano (FAO, 2007). El principal uso es el consumo, sea en fresco o en zumo preparado, algunos subproductos obtenidos de la pulpa y corteza, son empleados en la elaboración de forrajes para animales. También se rescata el aceite esencial de las glándulas de la corteza. (Ancillo y Medina, 2014).

**Cuadro 1.** Valor nutricional de *Citrus sinensis* (naranja)

Valor Nutricional	<i>Citrus sinensis</i>
Humedad %	88.80
Proteínas %	0.81
Grasa %	0.04
Cenizas %	0.40
Fibra dietética %	1.06
Carbohidratos %	8.89

Potasio (K) mg	181.00
Calcio (Ca) mg	61.00
Fosforo (P) mg	16.00
Hierro (Fe) mg	3.10
Vitamina A ug	12.00
B Caroteno ug	0.03
Vitamina C mg	48.40

Fuente: *Composición del fruto de los cítricos (contenido en 100 g de porción comestible).* FAO/INFOODS. *Tabla de composición de Alimentos de América Latina y Tablas de composición de alimentos.* Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Subirán. México.

### 2.2.1.2. *Solanum lycopersicum* (tomate)

El tomate es una de las más comercializada a nivel mundial (Zambrano, 2011) es una planta herbácea perteneciente a la familia de las solanáceas, el cual desde el momento de la siembra hasta el momento de recogerlos dura entre 120 a 140 días (ciclo corto), de 140 a 160 días (ciclos medio) y 170 días (ciclo largo). El tomate puede cultivarse durante todo el año, teniendo en consideración que las heladas y el calor excesivo pueden dificultar el desarrollo de la planta, sin embargo para evitar los repentinos cambios ambientales, es necesario la adopción de nuevas tecnologías, como el cultivo en invernadero, el uso de mallas plásticas que intercepten más del 50 % de luz solar, y mejorar el sistema de riego, además la temperatura optima de crecimiento y desarrollo es entre 18 a 30 °C durante el día y de 15 a 20 °C durante la noche y las temperaturas superiores a estas afectan la fructificación de la planta, y por consiguiente un deficiente desarrollo de la planta en general y del sistema radicular en particular (HORTOINFO, 2017).

#### 2.2.1.2.1. Clasificación taxonómica de *Solanum lycopersicum* (tomate)

<b>Reino</b>	:Plantae
<b>Sub reino</b>	:Tracheobionta
<b>Division</b>	:Magnoliophyta
<b>Clase</b>	:Magnoliopsida
<b>Sub clase</b>	:Asteridae
<b>Orden:</b>	:Solanales
<b>Familia</b>	:Solanaceae
<b>Género</b>	: <i>Solanum</i>
<b>Especie</b>	: <i>Solanum lycopersicum</i>
<b>NV</b>	:tomate

Semillaria (2015)

#### **2.2.1.2.2. Clasificación de *Solanum lycopersicum* (tomate) por categorías**

Las calidades de los tomates se clasifican en tres categorías, teniendo en consideración el tamaño, superficies, aspecto general. La categoría Extra considera tomates de calidad superior, pulpa firme, forma, aspecto y desarrollo deberán ser característicos de la variedad. Uniformidad en el tamaño, además de estar exentos de dorso verde u otros defectos, salvo defectos superficiales muy leves siempre y cuando no afecten al aspecto general del producto, en la categoría I los tomates deberán ser de buena calidad, deben tener la pulpa suficientemente firme, su forma, aspecto y desarrollo deben ser característicos de la variedad, uniformes en tamaño y estar libres de grietas; sin embargo, deben permitirse algunos defectos leves (forma, desarrollo, coloración), siempre y cuando no afecten al aspecto general del producto; la categoría II incluye a los tomates que deben ser suficientemente firmes (pero podrán ser ligeramente menos firmes que los clasificados en la Categoría I) y no deberán presentar grietas sin cicatrizar (grietas cicatrizadas superficiales que no excedan de 3 cm de longitud para los tomates redondos); sin embargo, se permite algunos defectos que no afecten seriamente al fruto, siempre y cuando los tomates conserven sus características esenciales y su calidad (CODEX STAN 245-2004, (2011).

#### **2.2.1.2.3. Características de *Solanum lycopersicum* (tomate)**

Según el análisis fisicoquímico el pH del zumo del tomate normalmente está en un rango 4.2 a 4.4, si el pH es superior, pueden presentar problemas (Diez, 1995), a diferencia de los cítricos el color es muy importante, debe ser color rojo intenso y uniforme, el color verde de los tomates se debe a la presencia de clorofila y muestra que aún no está maduro, el fruto del tomate adquiere una coloración roja, debido a la rápida acumulación de licopeno, el  $\beta$ -caroteno contribuye de manera importante en el color del fruto en sus primeras etapas de maduración, alcanzando su valor máximo poco antes del total desarrollo del color (Chamarro, 1995).

#### **2.2.1.2.4. Valor nutritivo, uso y aprovechamiento de *Solanum lycopersicum* (tomate)**

El tomate, es rico en licopeno, es la fruta de mayor consumo a nivel mundial, desde la década de los noventa, varios estudios epidemiológicos han mostrado que el consumo de tomate puede prevenir el desarrollo de eventos cardiovasculares (infarto agudo de

miocardio y enfermedad cerebrovascular) y ciertos tipos de cánceres. Respecto a los mecanismos protectores de enfermedades cardiovasculares se ha observado que el tomate presenta actividades antiplaquetaria, protectora del endotelio, antioxidante y antiaterogénica. Por su parte, entre los mecanismos por los cuales puede prevenir el cáncer, se han descrito las siguientes actividades: antioxidante, activación de apoptosis, disminución de la proliferación celular y disminución de la angiogénesis y metástasis. (Palomino *et al.*, 2010).

Según el Miniterio de Salud (2009) en las Tablas Peruanas de Composición de Alimentos.

**Cuadro 2.** Valor nutricional de *Solanum lycopersicum* (tomate).

Valor nutricional	Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )
Energía Kcal	19
Agua g	94.2
Proteína g	0.8
Grasa total g	0.2
Carbohidratos totales g	4.3
Carbohidratos disponibles g	3.1
Fibra cruda g	0.8
Fibra dietaría g	1.2
Cenizas g	0.5

Fuente: Miniterio de Salud (2009) en las Tablas Peruanas de Composición de Alimentos.

### 2.2.2. Transporte de frutas

El transporte de las frutas se debe realizar en vehículos abiertos o cerrados, ventilados, refrigerados, que muestren condiciones de higiene que los protejan de contaminación y olores extraños asegurando su conservación, el mantenimiento, calidad, identidad y la inocuidad del producto. El vehículo debe contar con seguro de carga, ser fácilmente lavable en su interior y que dicho lavado se realice antes de cada carga para mantener permanentemente en buen estado de funcionamiento y uso. La habilitación del vehículo según el tipo del transporte debe ser otorgada por la autoridad competente, quien debe verificar puertas laterales a cada lado a fin de facilitar el control de los productos. Se tiene que considerar en especial el transporte refrigerado, dado que el producto deberá

transportarse en condiciones adecuadas de temperatura, humedad y sistemas de ventilación de y tal forma que asegure la conservación de los productos (FAO, 2013).

### **2.2.3. Inocuidad de alimentos**

Todas las personas tienen derecho a ingerir alimentos sanos y libres de toda contaminación microbiológica (FAO y OMS, 1999), la insalubridad de los alimentos ha representado un problema de salud para el ser humano desde los albores de la historia, y muchos de los problemas actuales en esta materia no son nuevos. Aunque los gobiernos de todo el mundo se están esforzando al máximo por aumentar la salubridad del suministro de alimentos, la existencia de enfermedades de transmisión alimentaria sigue siendo un problema de salud significativo tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo (OMS, 2007). Las enfermedades de transmisión alimentaria son provocados por patógenos presentes en los alimentos y pueden incluso ser fatales; perjudicando al comercio y turismo por eso las instalaciones alimentarias deben estar sólidamente construidas con materiales duraderos, fáciles de mantener, limpiar y desinfectar; las paredes y los tabiques deben tener una superficie lisa (materiales impermeables que no tengan efectos tóxicos) hasta una altura apropiada para los procedimientos que realicen los expendedores. Los suelos deben estar contruidos de manera que el desagüe y la limpieza sean adecuados, asimismo los techos deben estar contruidos y acabados de forma que reduzcan al mínimo la acumulación de suciedad, condensación, y el desprendimiento de partículas. Los puestos de venta móviles y los vehículos de venta ambulante, deben estar ubicadas de manera que se evite la contaminación de los alimentos y el anidamiento de plagas, para controlar de manera adecuada cualquier peligro para la higiene de los alimentos (FAO y OMS, 1999).

### **2.2.4. Instituciones que regulan la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos**

Las instituciones que regulan la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos son varias a nivel mundial, nacional y local. Las HACCP son un sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control, que tiene fundamentos científicos y carácter sistemático, permite identificar peligros específicos y medidas para su control con el fin de garantizar la inocuidad de alimentos, también es un instrumento para evaluar los peligros para establecer sistemas de control en el punto establecido, se aplica a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde el productor primario hasta el consumidor final, y su aplicación se basa en pruebas científicas de peligros para la salud humana (Opineda, 2011) para

evitar los problemas causados al consumidor (Carro y Gonzalez, 2013) y mejorar la inocuidad de los alimentos y así facilitar la inspección por parte de las autoridades competentes para promover el comercio internacional al aumentar la confianza en la inocuidad de los alimentos (Opineda, 2011).

A nivel nacional, la inocuidad de los alimentos se considera una responsabilidad compartida entre el Gobierno, la Industria y sus consumidores, el Gobierno crea las condiciones y el marco jurídico a través de la ejecución de Normas y Reglamentos que sirven para el establecimiento de una infraestructura eficaz de control de la inocuidad de los alimentos que los fabricantes tienen que cumplir, a fin de asegurar la salud de los consumidores. En el Perú existen 3 autoridades competentes en materia de inocuidad de alimentos: SENASA, DIGESA y el SANIPES, cuyos roles se encuentran definidos en el Decreto Legislativo N°1062-2008 referente a la Ley de Inocuidad de Alimentos (INACAL, 2014).

El Servicio Nacional de Sanidad Agraria, creado por Decreto Ley N° 25902, en adelante SENASA, con autonomía técnica, administrativa, económica y financiera, es la autoridad nacional en materia de sanidad agraria, semillas y producción orgánica. Dentro de sus objetivos esta velar la calidad sanitaria y contribuir a la inocuidad agroalimentaria (SENASA, 2005), dentro de sus funciones es garantizar la inocuidad de los alimentos agropecuarios de producción y procesamiento con el fin de proteger la salud de las personas, con un enfoque preventivo e integral a lo largo de toda la cadena agroalimentaria realizando supervisiones e inspecciones a establecimientos como empacadoras, mercados, supermercados, almacenes, etc.(SENASA, 2015).

DIGESA (Dirección General de Salud Ambiental), es el órgano técnico normativo en los aspectos relacionados al saneamiento básico, salud ocupacional, alimentación, zoonosis higiene protección del ambiente, con el objetivo de establecer las normas y coordinación de la vigilancia sanitaria de los alimentos, zoonosis y la supervisión de las actividades de prevención y control de los agentes patógenos en la protección de la salud de los consumidores y la salud pública (MINISTERIO DE SALUD, 2013). Según el Decreto Legislativo N° 1062 El Peruano del 28 de junio del 2008, fue creado la ley de Inocuidad de los Alimentos, con el fin de proteger la vida y la salud de las personas, reconocer y asegurar los derechos de los consumidores y así garantizar que los alimentos consumidos no causaran daño al consumidor (COMPIAL, 2015).

El Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI) promulgo: “Al 2021, Perú tiene un agro prospero, competitivo e insertado al mercado nacional e internacional, a través de la productividad y calidad de sus productos agroalimentarios”, priorizando estrategias de acción, gestionando con la Autoridad Nacional del Agua (ANA) responsable del funcionamiento de dicho sistema (MINAGRI, 2017) e involucrar a todos los actores en la cadena alimentaria del campo o mar a la mesa (PNIA, 2016).

### **2.2.5. Factores ambientales que influyen en la contaminación de frutas**

El deterioro de las frutas, influyen una serie de factores ambientales: temperatura, humedad y sequedad, el aire y más particularmente el oxígeno y la luz y junto a todas ellas, evidentemente el tiempo, puesto que todas las causas de la degradación de los alimentos progresan con el tiempo.

La escala moderada de temperatura en la que se manejan los alimentos es de 10°C a 38°C, las frutas se conservan mejor en temperaturas bajas, el calor excesivo desnaturaliza las proteínas, destruye las vitaminas y reseca los alimentos al eliminar la humedad, el frio no controlado también deteriora las frutas que se han congelado. En las frutas la humedad que se produce es debido a la respiración de los mismos, también interviene en el desarrollo de los microorganismos, la cantidad más pequeña de condensación superficial es suficiente para permitir la proliferación de bacterias. Los efectos que el oxígeno tiene sobre el desarrollo de los microorganismos, el aire y el oxígeno ejerce efectos destructores sobre las vitaminas a y C, sobre los olores, sabores y otros componentes de los alimentos. La luz es responsable de la destrucción de algunas vitaminas (Casp y Abril, 1999).

Los factores ambientales tienen un efecto directo sobre la salud humana que pueden surgir tanto de fuentes naturales y antropogénicas como biológicos, químicos y físicos. Dentro de los efectos biológicos están presentes los virus, bacterias, parásitos, etc.; las rutas de exposición como agua, aire y suelo también son fuentes de contaminación microbiológica en alimentos. Los microorganismos patógenos que pueden estar presentes en el medio ambiente, según donde se encuentren, pueden ingresar al cuerpo humano por vía oral, respiratoria o por contacto (FAO, 2010). Las contaminaciones microbiológicas por el medio hídrico son por la pobre higiene personal, alimentos (frutas) y la carencia de agua potable. Las diarreas agudas son una de las “6 asesinas” de la infancia declaradas por la OMS y UNICEF en la mayoría de las veces debido al consumo de alimentos o agua en mal estado, contaminados por distintos gérmenes (Garcia *et al.*, 2002). El terreno agrícola

y el terreno que ha sido utilizado para actividades distintas de la agricultura puede estar contaminado con organismos patógenos o sustancias químicas tóxicas. Cuando el terreno ha sido utilizado para deshacerse de las basuras o como lugar de gestión de los desechos, puede contener materia orgánica descompuesta y, quizá, materia fecal. Dependiendo del contenido de las basuras, la cantidad de microbios en el suelo puede ser extremadamente elevada y éste puede también contener productos químicos peligrosos o contaminantes tóxicos (FDA, 2002).

### **2.2.6. Enfermedades transmitidas por el alimento**

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades, estima en E.E.U.U. 76 millones de casos al año, con 5.000 muertos en países en desarrollo, pronosticando una mortalidad de 2 millones de niños a causa de enfermedades diarreicas (causa viral o bacteriana) por alimentos y agua contaminada. Estas enfermedades son causadas por microorganismos (toxinas), la mayoría se manifiestan clínicamente como cuadros gastrointestinales. Los productos alimentarios más relacionados son las carnes, productos derivados no refrigerados, huevos, productos de aves de corral, ensaladas, tomates, frutas, leche no pasteurizada. También se han descrito brotes asociados a espinacas y comida rápida en restaurantes que han provocado muchas muertes, la transmisión más frecuente es fecal-oral (Massoc, 2008).

### **2.2.7. Bacterias indicadoras de la calidad higiénica de los alimentos**

#### ***2.2.7.1. Escherichia coli***

La bacteria pertenece a la Familia Enterobacteriaceae están constituidas por bacilos Gram negativos no esporulados, que fermentan y oxidan la glucosa, carecen de indofenol oxidasa, reducen los nitratos a nitritos y se hallan ampliamente distribuidos por la naturaleza; muchas de sus especies tienen como hábitat el intestino del hombre y los animales, mientras que en otras pueden parasitar a plantas o tener vida saprofítica. Pueden ser móviles por medio de flagelos peritricos, o pueden carecer de estos y ser inmóviles. (Llop *et al*, 2001). La exposición a las bacterias a través de la contaminación fecal del agua y de los alimentos de manera directa o por contaminación cruzada durante el crecimiento y cultivo (hortalizas, frutas), se puede producir una contaminación adicional durante la manipulación poscosecha, transporte, elaboración y manipulación no higiénica de alimentos durante su preparación, los individuos con síntomas de la enfermedad,

pueden liberar entre 106 a 109 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces. Los factores que contribuyen a la persistencia de la *E. coli* en los sistemas alimentarios incluyen el control inadecuado de los parámetros de procesamiento como la temperatura de cocción, valor del pH, actividad del agua y almacenamiento a altas temperaturas que permiten el crecimiento de estas bacterias (FAO, 2012).

### **Infecciones intestinales**

Las infecciones intestinales están producidas por 6 clases de *Escherichia coli* que en la actualidad se consideran como patógenas entéricas, estas son: *E. coli enteropatogena* (ECEP), *E. coli enterotoxigenica* (ECET), *E. coli enteroinvasiva* (ECEI), *E. coli enterohemorrágica* (ECEH), *E. coli enteroagregativa* (ECEA), *E. coli difusamente adherente* (ECDA) y las producidas por *Salmonella*, pueden presentar síntomas de dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarreas, deshidratación, desequilibrio electrolítico y fiebre (Canese, 2012), los datos clínicos de la enfermedad puede aparecer en forma de brotes, la incubación de microorganismos dura de 2 a 3 días hasta 2 semanas, la infección puede ser inaparente y pueden ser portadores del microorganismo; puede presentarse como colitis hemorrágica, comenzando con una diarrea acuosa y después presentarse la sangre en las heces, la fiebre está casi siempre ausente y puede estar acompañada de vómitos o no (Harvey *et al*, 2008), así también, la epidemiología puede ser de persona a persona, por alimentos contaminados como la carne, la leche y el agua no tratada, se ha descrito este microorganismo como causa de enfermedad en Canadá, Estados Unidos de Norteamérica, Reino Unido, Argentina y Cuba, entre otros. El estado de portador se puede observar, principalmente, en niños con periodos de excreción de aproximadamente 30 días después de la enfermedad, a cualquier edad puede contraer una infección (Llop *et al*, 2001).

#### **2.2.7.2. *Salmonella sp.***

Los miembros del genero *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se los encuentra como comensales y como patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y en los animales (Lopardo *et al.*, 2016). Es una de las enterobacterias que afecta la salud del hombre; el primer organismo descrito en este género fue la *S. typhi*. otros serotipos han sido descritos dentro de este género, hasta llegar

en la actualidad a más de 2300 serotipos, son bacilos Gram-negativos, de 0,7-1,5 x 2,0-5µm, generalmente móviles por flagelos peritricos (*excepto S. Gallinarum*), anaerobios facultativos, no esporulados (Caffer *et al.*, 2008). En los medios de aislamiento primario, ya sean diferenciales o selectivos, que contienen como sustrato de diferenciación de lactosa, las colonias de *Salmonella* se observan cómo no fermentadoras de este carbohidrato (Llop *et al*, 2001). La salmonelosis se trata de la infección bacteriana de origen alimentario que se presenta con mayor frecuencia y desde hace algunos años es la enfermedad bacteriana transmitida por alimentos que se presenta con mayor frecuencia (Frazier y Westhoff, 1993).

Los cuadros clínicos son producidos por la mayoría de los serotipos de *Salmonella* entérica, la mayoría de la salmonelosis son de origen animal, los cuadros más comunes son las de enterocolitis no complicadas, donde después de haber ingerido agua, alimentos contaminados o por medio de manos contaminadas entra *Salmonella* en el hospedero susceptible y después de 8 a 48 horas de incubación aparecen los síntomas como náuseas, vómitos, cólicos, diarreas y fiebre. En los neonatos, inmunodeprimidos o pacientes con otra enfermedad de base, pueden darse cuadros graves que incluso, lleven al paciente a la muerte, en la mayoría de los países, *Salmonella* es una de las principales causas de intoxicación alimentaria (Murray, 2016). La fuente más frecuente de los humanos de adquirir la salmonelosis, es el medio de la ingestión de alimentos y aguas contaminadas (Llop *et al*, 2001), se transmiten por vía fecal y oral y existen portadores crónicos, los niños y los ancianos son especialmente sensibles a las infecciones por *Salmonella* (Harvey *et al*, 2008).

**2.2.8. Criterio Microbiológico**

Las frutas deben cumplir con los siguientes Criterios propuesto por la “Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano” según la RESOLUCIÓN MINISTERIAL N° 591- 2008/MINSA.

**Cuadro 3.** Criterio microbiológico de calidad sanitaria de frutas y hortalizas frescas.

Frutas y Hortalizas frescas. (sin ningún tratamiento)						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	C	Limite por g.	
					M	M
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia/25g.	.....

*Categoría:* grado de riesgo que presentan los microorganismos en relación a las condiciones previsibles de manipulación y consumo del alimento.  
*Clase:* presenta el grado de peligro y el riesgo para la salud.  
*c* = número máximo permitido de unidades rechazables en un plan de muestreo de dos clases.  
*n* = número de unidades de muestra seleccionadas al azar de un lote, de un lote que se analizan para satisfacer los requerimientos de un determinado plan de muestreo.  
*m*=límite de microorganismo que separa la calidad aceptable de la rechazable.  
*M*=los valores de recuentos microbianos superiores a “M” son inaceptables, el alimento representa un riesgo para la salud.

Fuente: Resolución Ministerial N° 591- 2008/MINSA.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Metodología

##### 3.1.1. Tipo de Investigación

El estudio es de tipo descriptivo, analítico y transversal.

##### 3.1.2. Área de Estudio

El trabajo de investigación se realizó en las ciudades de Puno y Juliaca. La ciudad de Puno está ubicada en el altiplano a una altura de 3 848 m sobre el nivel del mar, a orillas del lago Titicaca, las coordenadas ubicadas son 15° 50' 22.67" latitud sur y 70° 1' 17.5" de longitud Oeste del Meridiano de Greenwich, cuenta con 256 000 habitantes. La ciudad de Juliaca se encuentra ubicada en la provincia de San Román, que pertenece a la región Puno, según las coordenadas, su ubicación es de 15°29'24" de Latitud Sur y 70°08'00" de Longitud Oeste del Meridiano de Greenwich, cuenta con 300300 habitantes, como puntos de muestreo se tuvieron los mercados de Unión y Dignidad de la ciudad de Puno y el mercado Internacional Túpac Amaru en la ciudad de Juliaca. La recolección de muestras se realizó en los meses de abril - junio del año 2018, cada 7 días. La muestra recolectada se transportó en cadena de frío (cooler) al laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano- Puno, para su procesamiento respectivo.

##### a. Muestra:

- ✓ 150 muestras de *Citrus sinensis* (naranja): 25 muestras de la ciudad de Juliaca y 25 muestras de la ciudad de Puno, 5 por cada puesto de venta con 3 repeticiones.

Zona de muestreo		N° de muestra	N° de repetición	Total	Total de muestra analizada
Mercado	Puesto de venta				
Mercado Unión y Dignidad	PV1	5	3	15	75
	PV2	5	3	15	
	PV3	5	3	15	
	PV4	5	3	15	
	PV5	5	3	15	
Mercado Internacional al Túpac Amaru	PV1	5	3	15	75
	PV2	5	3	15	
	PV3	5	3	15	
	PV4	5	3	15	
	PV5	5	3	15	
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>50</b>	<b>30</b>		<b>150</b>

Elaboración propia

- ✓ 150 muestras Tomates (*Solanum lycopersicum*): 25 muestras de la ciudad de Juliaca y 25 muestras de la ciudad de Puno.

Zona de muestreo		N° de muestra	N° de repetición	Total	Total de muestra analizada
Mercado	Puesto de venta				
Mercado Unión y Dignidad	PV1	5	3	15	75
	PV2	5	3	15	
	PV3	5	3	15	
	PV4	5	3	15	
	PV5	5	3	15	
Mercado Internacion al Túpac Amaru	PV1	5	3	15	75
	PV2	5	3	15	
	PV3	5	3	15	
	PV4	5	3	15	
	PV5	5	3	15	
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>50</b>	<b>30</b>		<b>150</b>

Elaboración propia

### 3.1.3. Descripción de Equipos, Materiales e Insumos

Para la evaluación de la bacteria de *Escherichia coli* y presencia de *Salmonella sp.* se utilizó un Autoclave marca MAGEFESA ESPAÑOL para la esterilización a calor húmedo de los distintos materiales (placas Petri, tubos de ensayo, matraz de Erlenmeyer de 50, 100 y 200 ml, probeta de 50,100 y 200 ml, etc). Para el cultivo de muestras (naranja y tomate) se utilizó incubadora a 37°C marca MEMMERT, para pesar se utilizó una balanza digital, mechero Bunsen, cocinilla eléctrica.

Los materiales utilizados fueron: matraces de 250 y 500 ml, pipeta, placa petri, tubos de ensayo, campanas de Durham, mechero de alcohol, frascos de vidrio de boca ancha, mortero, asa de colle, gradilla y otros materiales como papel kraff, algodón, guantes, barbijo, bolsas de polietileno, cooler, caja de tecnopor.

Los medios de cultivo utilizados para la evaluación son:

- Para *Escherichia coli*, Solución reguladora de Peptona, Caldo Lactosado, Caldo Verde Brillante Bilis y Lactosa (CLVBB), agar Eosin Azul de Metileno (EMB), medios Bioquímicos; Agar Lisina Iron (LIA), Agar Triple Sugar Iron (TSI), Agar Citrato Simmons (CS), Indol, reactivo de Kovac.
- Para *Salmonella sp.* caldo Peptona, caldo Tetrionato, agar Salmonella Shiguella (SS), medios Bioquímicos; Agar Lisina Iron (LIA), Agar Triple Sugar Iron (TSI), Agar Citrato Simmons (CS), Indol, reactivo de Kovac.

### 3.1.4. Métodos de análisis:

La metodología está basada en:

- “Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano” según la RESOLUCIÓN MINISTERIAL N° 591- 2008/MINSA.
- Manual de Análisis microbiológico de Alimentos- Dirección General de Salud Ambiental 2001- Perú.
- Métodos de Análisis Microbiológico de los Alimentos (Laura, 2017).

### 3.1.5. Metodología para determinar la bacteria *Escherichia coli* en la fruta de *Citrus sinensis* (naranja).

**a. Técnica:** Número más probable (NMP/g)

**b. Fundamento:** Este método consiste en un ensayo de presunción en caldo lactosado, seguido de otro de confirmación de los tubos de ensayo que han producido gas, para el cual se utilizó caldo verde brillante bilis y lactosa, incubando cada tubo durante 24 horas a 37°C. para comprobar la presencia de coliformes fecales se incubó sobre medio de Levine (Eosina, Azul de Metileno: EMB) de los tubos que dieron positivos para caldo lactosado y produjeron gas (Laura, 2017).

**c. Procedimiento:**

#### **Homogenización de la muestra (naranja)**

Se pesó 10 gr de la muestra, luego esta se trituro en un mortero, luego se procede a vaciar la muestra triturada en un matraz, al que se le agregó 90 ml de solución reguladora de peptona. Por este método se obtuvo la dilución 1:10

#### **Dilución de la fruta *Citrus sinensis* (naranja)**

Agitando el alimento homogenizado de la dilución 1:10, se obtuvo 1.0 ml con una pipeta estéril y se vertió en un tubo que contiene 9 ml de solución reguladora de peptona; se mezcló cuidadosamente, luego aspiramos con una pipeta y esta correspondió a la segunda dilución (1:100). Con la pipeta se extrajo 1 ml de la segunda dilución se vertió en un tubo, así obteniendo la tercera dilución (1:1000) de igual manera se homogenizo y con una pipeta se volvió a tomar 1 ml de la tercera dilución y se vertió en un tubo, así obteniendo la cuarta dilución (1:10000).

#### d. Ensayo de presunción

**Inoculación:** Se inoculó en cada uno de los tres tubos que contienen caldo lactosado (con tubos de Durham invertidos) 1,0 ml de muestra homogenizo (1:10). Se repitió la operación inoculando la segunda dilución (1:100) en tres tubos siguientes con caldo lactosado, la misma operación se repitió para las demás diluciones, utilizando siempre para cada dilución una nueva pipeta esterilizada.

**Incubación:** Los tubos de caldo lactosado inoculados se incubaron durante 24 a 48 horas, a 37°C.

#### e. Lectura de los tubos enriquecidos

**Test presuntivo:** Se interpretaron aquellos tubos en los que ha fermentado la lactosa y hayan producido gas al cabo de 24 horas, volviendo a realizar la lectura y anotando como positivos a los tubos que han producido gas.

**Test de confirmación:** Los tubos con caldo lactosado que han producido gas y fermentado la lactosa, se tomó un inculo con el asa de platino en aro y debidamente estéril, se inoculo en otro tubo con contenido de caldo verde brillante bilis lactosa con campanas de Durham invertido y luego se pasó a incubar durante 48 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo, se realizó la lectura; la formación de gas confirma la presencia de bacterias coliformes totales (*E. coli*), anotamos el número de tubos con reacción positiva, los resultados obtenidos se contrasto en la tabla del número más probable.

**Cálculos (NMP): Enumeración de bacterias coliformes en Alimentos:** La lectura de los tubos positivos confirmados para coliformes se realizaron en la tabla del número más probable (NMP), cuyo índice de confianza es de 95% de probabilidad (**Anexo E**).

Para el aislamiento de *Escherichia coli* del cultivo anterior en Caldo Verde Brillante bilis Lactosa (CVBBL), se obtuvo la muestra con el asa de kolle y se sembró en el agar selectivo Eosin Azul de Metileno (EMB), luego se incubó a T° de 37°C durante 24 a 48 horas. Transcurrido el tiempo se realizó la lectura reconociendo las colonias que presentan coloración verdosa con brillo metálico lo cual indica presencia de *E. coli*, para confirmar se realiza las pruebas bioquímicas.

Para obtener el NMP de *Escherichia coli* por gramo se utilizó la siguiente formula.

NMP de la tabla / 100 x la dilución intermedia

### Identificación bioquímica en medios diferenciales

Se eligió cinco colonias típicas de *Escherichia coli*, y se sembró en estrías sobre los tubos en agar nutriente, luego pasamos a incubar a 37°C, las colonias aisladas en agar nutriente, se inocularon en los medios diferenciales siguientes:

**Agar Triple Azucarado (TSI):** Con el aza de platino en punta se carga la colonia y se realiza una puntura en el fondo del medio y estrías sobre la superficie inclinada del agar, se incubó durante 24- 48 horas a 37°C. los cambios en el medio se interpretaron de la forma siguiente: el medio está compuesto por tres azucares glucosa, lactosa y sacarosa, para poner en evidencia la producción de hidrogeno sulfato. El color original es rojo ladrillo ph 7.4. La producción de hidrógeno sulfatos se manifestó por el color negro en el medio y se simbolizo de acuerdo a su grosella por la letra K.

- **Extremo:** color amarillo significa glucosa fermentada; rojo o sin cambio indica glucosa sin fermentar; negro significa formación de sulfuro de hidrogeno; burbujas indica gas que se forma de la glucosa. La lectura positiva es A/A.
- **Superficie inclinada:** color amarillo indica Lactosa o sacarosa fermentadas o ambas; rojo o sin variación indica Lactosa o sacarosa, o ambas, no fermentadas.

**Citrato de Simmons:** Se inoculó en un tubo que contenía el medio citrato y se incubo durante 48 horas a 37°C, luego se examinó para comprobar el desarrollo del microorganismo y cambio de color de medio de verde a un color azul e indica la utilización de citrato como fuente de carbono.

**Descarboxilacion de la Lisina (LIA):** la inoculación de las colonias se realizó mediante 2 punturas al fondo y estrías en la superficie del medio inclinado y se incuba durante 24 horas a 37°C. si toma un color purpura después de la proliferación, la reacción es positiva y se lee LIA (+).

**Reacción en Indol:** La colonia se inoculó en caldo peptona, luego se incubo por 48 horas a 37°C, transcurrido el tiempo, se agregó 1 a 2 gotas de reactivo de Kovac y se observó

la reacción, cuando hay producción de Indol en la superficie del medio se forma un anillo rojizo y se califica como una reacción positiva.

### **3.1.6. Metodología para determinar presencia de la bacteria *Salmonella* sp. en la fruta de *Citrus sinensis* (naranja).**

- a. **Fundamento:** El método se basa, por consiguiente, en permitir un pequeño número de *Salmonellas* normales o afectadas, se desarrollen primeramente en un medio líquido no selectivo a 37°C (Pre-enriquecimiento). En este medio y a esta temperatura se desarrolla también otras bacterias, por lo que procede a hacer un subcultivo del medio pre-enriquecido a un medio selectivo líquido (Enriquecido) que se incuba a temperatura de 42 a 43°C, este último es inoculado en un medio sólido, selectivo y diferencial que se examina después de la incubación a 37°C para observar colonias que, por sus características, puedan considerarse como *Salmonellas* (Laura, 2017).
- b. **Procedimiento:** La muestra se recolecto en los Mercados de Unión y Dignidad (Puno) y mercado Internacional Túpac Amaru (Juliaca), se recolecto un recipiente estéril y debidamente rotulado, posteriormente se trasladó al laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas.

#### **c. Fase de pre-enriquecimiento**

Para el enriquecimiento previo no selectivo de bacterias patógenas a partir de la muestra de fruta de *Citrus sinensis* (naranja), se vertió 25 g en un matraz esterilizado y se mezcló con 225 ml de solución de peptona, después se procedió a incubar durante 24 horas a 37°C, con la finalidad de revitalizar a las *Salmonellas* dañadas por las diferentes condiciones.

#### **d. Fase de enriquecimiento**

Para esta fase de enriquecimiento selectivo es para favorecer el crecimiento de las *Salmonellas* en un ambiente que pueda tener un gran número de bacterias diferentes, para esto, se vertió 10 ml de cultivo pre-enriquecido en un volumen de 100 ml de caldo tetrionato, previamente calentado a una temperatura de 43°C y se incubó durante 48 horas.

### **Versión en placas**

Después de pasar 24 o 48 horas de la fase de enriquecimiento, se sembró por estrías con un asa de siembra en la superficie de las placas Petri con un contenido de agar *Salmonella Shigella* (SS), luego se incubó durante 24 horas a 37°C. Transcurrido las 24 horas, se evaluó las placas petri sembradas, identificando las colonias típicas (incoloras, transparentes, con centro negro).

### **Identificación bioquímica en medios diferenciales**

Luego elegimos cinco colonias típicas de *Salmonella sp.*, y se sembró en estrías sobre los tubos en agar nutriente, luego pasamos a incubar a 37°C, las colonias aisladas en agar nutriente, se inoculan en los medios diferenciales siguientes:

**Agar triple azúcar hierro (TSI):** seguidamente con un asa se carga una colonia y se realizó una puntura en el fondo del medio y estrías sobre la superficie inclinada del agar, después se incubó durante 24 a 48 horas a 37°C. generalmente la *Salmonella* produce típicamente en la parte inclinada una reacción alcalina (roja) y en la columna del medio una reacción ácida (amarillo), con o sin producción de H<sub>2</sub>S (oscurecimiento del agar).

**Agar lisina hierro (LIA):** de manera similar se inoculó la colonia y realizamos punturas 3 veces, luego sembramos en estrías en el cultivo inclinado, después pasamos a incubar durante 24 horas a 37°C. la *Salmonella* produce típicamente una reacción alcalina (púrpura) en la columna del medio en el tubo, considerar una reacción ácida (negativa) solo cuando la columna presente un color amarillo distintivo. La mayoría de los cultivos de *Salmonella* producen H<sub>2</sub>S en agar LIA.

**Medio de Indol:** se inoculó la colonia en el medio para Indol y se incubó durante 24 horas a 37°C. Se añadió 1 ml del reactivo de Kovac. La presencia de un anillo rojo indica una reacción positiva

### **Operacionalización de variables**

a) Variables independientes

Puesto de Venta de *Citrus sinensis* (naranja)

b) Variables dependientes

Presencia de la bacteria en NMP/g *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*

### 3.1.7. Aplicación de la prueba bioestadística

Se evaluó la carga bacteriana de *Escherichia coli* y la presencia de *Salmonella sp.* en la fruta de *citrus sinensis* (naranja), Considerando para el análisis estadístico que las variables son similares, se realizó mediante los siguientes análisis estadísticos:

**Análisis de “t de student”:** En esta prueba se evaluó que la media de la población estudiada (NMP/g de *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*) es igual a un valor específico ( $\mu_0 = \text{limite permisible}$ ), se realizó la siguiente formula:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s / \sqrt{n}}$$

- $t$ : prueba t para muestra única
- $\bar{x}$ : Media muestral
- $\mu_0$ : Valor especificado (limite permisible)
- $s$ : Desviación estándar
- $n$ : Tamaño de la muestra (naranja)

**Análisis de varianza:** La prueba estadística se analizó que las medias de dos o más poblaciones son iguales, evalúa la importancia de uno o más factores al comparar las medias de la variable de distintos grupos.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}$$

- $Y_{ij}$ : Variable objeto de estudio (NMP/g)
- $\mu$ : Constante que indica la respuesta media de cada nivel
- $\tau_j$ : Efecto diferencial de nivel “j”. Recoge información de cada grupo o tratamiento. Es el objetivo del análisis.
- $\varepsilon_{ij}$ : termino error, considerando como variable aleatoria.

**Contraste de Tukey:** Utilizado para probar todas las diferencias entre medias de tratamientos. La única exigencia es que el número de repeticiones sea constante en todos los tratamientos.

$$W = q_{(t, glee, \alpha)} x \sqrt{\frac{CMee}{r}}$$

- $q$ : Amplitud total estudentizada. Valor encontrado en tabla
- $\alpha$ : Nivel de significancia
- $t$ : numero de tratamientos y/ grupos
- $glee$ : grados de libertad del error experimental

- $CMee$ : cuadrado medio del error experimental
- $r$ : numero de repeticiones de las medias de los tratamientos

Chi cuadrado Pearson:

$$X_c^2 = \frac{\sum_{i=1}^c (O_i - E_i)^2}{E_i}$$

- $X_c^2$ : chi cuadrado calculado
- $O_i$ : frecuencia observada de la i-esima columna
- $E_i$ : frecuencia esperada de la i-esima columna

### 3.1.8. Metodología para determinar la bacteria *Escherichia coli* en la fruta de *Solanum lycopersicum* (tomate).

- Técnica:** Número más probable (NMP/g)
- Fundamento:** Este método consiste en un ensayo de presunción en caldo lactosado, seguido de otro de confirmación de los tubos de ensayo que han producido gas, para el cual se utiliza caldo verde brillante bilis y lactosa, incubando cada tubo durante 24 horas a 37°C. para comprobar la presencia de coliformes fecales se incubó sobre Medio de Levine (Eosina, Azul de Metileno EMB) de los tubos que dieron positivos para caldo lactosado y produjeron gas (Laura, 2017).
- Procedimiento:**

#### Homogenización de la muestra (tomate)

Se pesó 10 gr de la muestra, luego esta se trituró en un mortero, luego se procedió a vaciar la muestra triturada en un matraz, al que se le agrega 90 ml de solución reguladora de peptona. Por este método se obtiene la dilución 1:10

#### Dilución de la fruta *Solanum lycopersicum* (tomate)

Agitando el alimento homogenizado de la dilución 1:10, se obtuvo 1.0 ml con una pipeta estéril y se vertió en un tubo que contiene 9 ml de solución reguladora de peptona; se mezcló cuidadosamente, aspirando con una pipeta y esta correspondió a la segunda dilución (1:100). Con la pipeta se obtuvo 1 ml de la segunda dilución se vertió en un tubo, así obteniendo la tercera dilución (1:1000) de igual manera se homogenizó y con una pipeta se volvió a tomar 1 ml de la tercera dilución y se vertió en un tubo, así obteniendo la cuarta dilución (1:10000).

#### d. Ensayo de presunción

**Inoculación:** Se inoculó en cada uno de los tres tubos que contienen caldo lactosado (con tubos de Durham invertidos) 1,0 ml de la fruta (tomate) y diluido (1:10). Se repitió la operación inoculando la segunda dilución (1:100) en tres tubos siguientes con caldo lactosado, la misma operación se repitió para las demás diluciones, utilizando siempre para cada dilución una nueva pipeta esterilizada.

**Incubación:** Los tubos de caldo lactosado inoculados se incubaron durante 24 a 48 horas, a 37°C.

#### e. Lectura de los tubos enriquecidos

**Test presuntivo:** Se interpretaron aquellos tubos en los que ha fermentado la lactosa y hayan producido gas al cabo de 24 horas, volviendo a realizar la lectura y anotando como positivos a los tubos que han producido gas.

**Test de confirmación:** Los tubos con caldo lactosado que han producido gas y fermentado la lactosa, se tomó un inóculo con el asa de platino en aro y debidamente estéril, se inoculó en otro tubo con contenido de caldo verde brillante bilis lactosa con campanas de Durham invertido y luego se pasó a incubar durante 48 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo, se realizó la lectura; la formación de gas confirma la presencia de bacterias coliformes totales (*E. coli*), anotamos el número de tubos con reacción positiva, los resultados obtenidos se contrastó en la tabla del número más probable.

**Cálculos (NMP): Enumeración de bacterias coliformes en Alimentos:** La lectura de los tubos positivos confirmados para coliformes se realizaron en la tabla del número más probable (NMP), cuyo índice de confianza es de 95% de probabilidad (**Anexo E**).

Para el aislamiento de *Escherichia coli* el cultivo anterior en Caldo Verde Brillante Bilis Lactosa (CVBBL), se obtiene la muestra con el asa de kolle y se siembra en el agar selectivo Eosin Azul de Metileno (EMB), luego se incubó a una T° de 37°C durante 24 a 48 horas. Transcurrido el tiempo se realizó la lectura reconociendo las colonias que presenten coloración verdosa con brillo metálico lo cual indica presencia de *E. coli*, para confirmar se realizó las pruebas bioquímicas.

Para obtener el NMP de *Escherichia coli* por gramo se utilizó la siguiente fórmula.

NMP de la tabla / 100 x la dilución intermedia

### Identificación bioquímica en medios diferenciales

Elegimos cinco colonias típicas de *Escherichia coli*, y se sembró en estrías sobre los tubos en agar nutriente, luego pasamos a incubar a 37°C, las colonias aisladas en agar nutriente, se inocularon en los medios diferenciales siguientes:

**Agar Triple Azucarado (TSI):** con el aza de platino en punta se carga la colonia y se realiza una puntura en el fondo del medio y estrías sobre la superficie inclinada del agar, se incubó durante 24- 48 horas a 37°C. el cambio en el medio se interpretó de la forma siguiente: el medio está compuesto por tres azúcares glucosa, lactosa y sacarosa, para poner en evidencia la producción de hidrogeno sulfato. El color original es rojo ladrillo ph 7.4. La producción de hidrógenos sulfatos se manifestó por el color negro en el medio y se simboliza de acuerdo a su grosella por la letra K.

- **Extremo:** color amarillo significa glucosa fermentada; rojo o sin cambio indica glucosa sin fermentar; negro significa formación de sulfuro de hidrogeno; burbujas indica gas que se forma de la glucosa. La lectura positiva es A/A.
- **Superficie inclinada:** color amarillo indica Lactosa o sacarosa fermentadas o ambas; rojo o sin variación indica Lactosa o sacarosa, o ambas, no fermentadas.

**Citrato de Simmons:** Se inoculó en un tubo que contenía el medio citrato y se incubó durante 48 horas a 37°C, luego se examinó para comprobar el desarrollo del microorganismo y cambio de color de medio de verde a un color azul e indica la utilización de citrato como fuente de carbono.

**Descarboxilacion de la Lisina (LIA):** la inoculación de las colonias se realizó mediante 2 punturas al fondo y estrías en la superficie del medio inclinado y se incubó durante 24 horas a 37°C. si toma un color purpura después de la proliferación, la reacción es positiva y se lee LIA (+).

**Reacción en Indol:** La colonia se inoculo en caldo peptona, luego se incubo por 48 horas a 37°C, luego se agregó 1 a 2 gotas de reactivo de Kovac y se observó la reacción; cuando hay producción de Indol en la superficie del medio se forma un anillo rojizo y se califica como una reacción positiva.

### 3.1.9. Metodología para determinar la presencia de la bacteria *Salmonella sp.* en la fruta de *Solanum Lycopersicum* (tomate)

- a. **Fundamento:** El método se basa, por consiguiente, en permitir un pequeño número de *Salmonellas* normales o afectadas, se desarrollen primeramente en un medio líquido no selectivo a 37°C (Pre-enriquecimiento). En este medio y a esta temperatura se desarrolla también otras bacterias, por lo que procede a hacer un subcultivo del medio pre-enriquecido a un medio selectivo líquido (Enriquecido) que se incuba a temperatura de 42 a 43°C, este último es inoculado en un medio sólido, selectivo y diferencial que se examina después de la incubación a 37°C para observar colonias que, por sus características, puedan considerarse como *Salmonellas* (Laura, 2017).
- b. **Procedimiento:** La muestra se recolectó en los Mercados de Unión y Dignidad (Puno) y mercado Internacional Túpac Amaru (Juliaca), se recolectó un recipiente estéril y debidamente rotulado, posteriormente se trasladó al laboratorio de Microbiología de Alimento de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA- Puno para su respectivo análisis.

#### Fase de pre-enriquecimiento

Para el enriquecimiento previo no selectivo de bacterias patógenas a partir de la muestra de la fruta de *Solanum lycopersicum* (tomate), se vertió 25 g en un matraz esterilizado y se mezcló con 225 ml de solución de peptona, después se procedió a incubar durante 24 horas a 37°C, con la finalidad de revitalizar a las *Salmonellas* dañadas por las diferentes condiciones.

#### Fase de enriquecimiento

Para esta fase de enriquecimiento selectivo es para favorecer el crecimiento de las *Salmonellas* en un ambiente que pueda tener un gran número de bacterias diferentes, para esto, se vertió 10 ml de cultivo pre-enriquecido en un volumen de 100 ml de caldo tetracionato, previamente calentado a una temperatura de 43°C y se incubó durante 48 horas.

#### Versión en placas

Después de pasar 24 o 48 horas de la fase de enriquecimiento, se sembró por estrías con un asa de siembra en la superficie de las placas Petri con un contenido de agar *Salmonella*

Shigella (SS), luego se incubó durante 24 horas a 37°C. Transcurrido las 24 horas, se evaluó las placas petri sembradas, identificando las colonias típicas (incoloras, transparentes, con centro negro).

### Identificación bioquímica en medios diferenciales

Luego elegimos cinco colonias típicas de *Salmonella sp.*, y se sembró en estrías sobre los tubos en agar nutriente, luego pasamos a incubar a 37°C, las colonias aisladas en agar nutriente, se inoculan en los medios diferenciales siguientes:

**Agar triple azúcar hierro (TSI):** seguidamente con un asa se carga una colonia y se realizó una puntura en el fondo del medio y estrías sobre la superficie inclinada del agar, después se incubó durante 24 a 48 horas a 37°C. generalmente la *Salmonella* produce típicamente en la parte inclinada una reacción alcalina (roja) y en la columna del medio una reacción ácida (amarillo), con o sin producción de H<sub>2</sub>S (oscurecimiento del agar).

**Agar lisina hierro (LIA):** de manera similar se inocula la colonia y realizamos punturas 3 veces, luego sembramos en estrías en el cultivo inclinado, después pasamos a incubar durante 24 horas a 37°C. la *Salmonella* produce típicamente una reacción alcalina (púrpura) en la columna del medio en el tubo, considerar una reacción ácida (negativa) solo cuando la columna presente un color amarillo distintivo. La mayoría de los cultivos de *Salmonella* producen H<sub>2</sub>S en agar LIA.

**Medio de Indol:** se inocula la colonia en el medio para indol y se incubó durante 24 horas a 37°C. Se añadió 1 ml del reactivo de Kovac. La formación de un anillo rojo indica una reacción positiva.

#### 3.1.10. Variables que se analizará

#### Operacionalización de variables

a) Variables independientes

Puesto de Venta de *Solanum lycopersicum* (tomate)

b) Variables dependientes

Presencia de la bacteria de *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*

### 3.1.11. Aplicación de la prueba bioestadística

Se evaluó la carga bacteriana de *Escherichia coli* en frutas de *Solanum Lycopersicum* (tomate), además la presencia de *Salmonella sp.* en la misma fruta. Considerando para el análisis estadístico que las variables son similares, se realizó mediante los siguientes análisis estadísticos:

**Análisis de “t de student”:** En esta prueba se evaluó que la media de la población estudiada (NMP/g de *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*) es igual a un valor específico ( $\mu_0 = \text{limite permisible}$ ), se realizó la siguiente fórmula:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s / \sqrt{n}}$$

- $t$ : prueba t para muestra única
- $\bar{x}$ : Media muestral
- $\mu_0$ : Valor especificado (limite permisible)
- $s$ : Desviación estándar
- $n$ : Tamaño de la muestra (tomate)

**Análisis de varianza:** la prueba estadística se analizó las medias de dos o más poblaciones son iguales, evalúa la importancia de uno o más factores al comparar las medias de la variable de distintos grupos.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}$$

- $Y_{ij}$ : Variable objeto de estudio (NMP/g)
- $\mu$ : Constante que indica la respuesta media de cada nivel
- $\tau_j$ : Efecto diferencial de nivel “j”. Recoge información de cada grupo o tratamiento. Es el objetivo del análisis.
- $\varepsilon_{ij}$ : termino error, considerando como variable aleatoria.

**Contraste de Tukey:** Utilizado para probar todas las diferencias entre medias de tratamientos. La única exigencia es que el número de repeticiones sea constante en todos los tratamientos.

$$W = q_{(t, glee, \alpha)} \times \sqrt{\frac{CMee}{r}}$$

- $q$ : Amplitud total estudentizada. Valor encontrado en tabla
- $\alpha$ : Nivel de significancia
- $t$ : numero de tratamientos y/ grupos

- *glee*: grados de libertad del error experimental
- *CMee*: cuadrado medio del error experimental
- *r*: numero de repeticiones de las medias de los tratamientos

**Chi cuadrado Pearson:**

$$X_c^2 = \frac{\sum_{i=1}^c (O_i - E_i)^2}{E_i}$$

- $X_c^2$ : chi cuadrado calculado
- $O_i$ : frecuencia observada de la i-esima columna
- $E_i$ : frecuencia esperada de la i-esima columna

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1. Determinación de la carga bacteriana de *Escherichia coli* y la presencia de *Salmonella sp.* en *Citrus sinensis* (naranja) en las ciudades de Puno y Juliaca - 2018.

Los resultados del análisis de la carga bacteriana de *Escherichia coli* en *Citrus sinensis* (naranja) en NMP/g, expendidos en el mercado Unión y Dignidad, muestran los promedio de 3 repeticiones por puesto de venta; para el Puesto de Venta en Puno (PVP)1 presentó 2013.33, el PVP2: 1033.33, el PVP3: 1518.00, el PVP4: 1483.33y el PVP5: 1370.00 NMP/g de *Escherichia coli* en la muestra de *Citrus sinensis* (naranja) (ANEXO C.1); de manera similar se observa en el mercado Internacional Túpac Amaru de la ciudad de Juliaca, el Puesto de Venta (PVJ)1 presentó la carga bacteriana de 1309.33, PVJ2:1568.67, PVJ3: 2090.67, PVJ4: 1323.33 y el PVJ5: 1131.33 NMP/g. de *Escherichia coli* por gramo de muestra (tabla 1).

**Tabla 1.** Promedios de carga bacteriana (NMP/g) de *Escherichia coli* en *Citrus sinensis* (naranja), que se expenden en los mercados Unión y Dignidad de la ciudad de Puno y mercado internacional Túpac Amaru de la ciudad de Juliaca, 2018.

Puesto de Venta	Mercados	
	Mercado Unión y Dignidad – Puno	Mercado Internacional Túpac Amaru – Juliaca
	$\bar{X}$ NMP/g	$\bar{X}$ NMP/g
PV1	2013.33	1309.33
PV2	1033.33	1568.67
PV3	1518.00	2090.67
PV4	1483.33	1323.33
PV5	1370.00	1131.33
<b>Promedio</b>	<b>1483.59</b>	<b>1484.66</b>

Fuente: Elaboración propia

La prueba estadística de *t de student* demostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), corroborado por el contraste de Tukey (Alfa=0,05 DMS=111.83418,  $gl = 140$ ) demostrando, la mayor carga bacteriana de *Escherichia coli* se da en el PVJ3 y la menor en el PVP2 de ambos mercados, ningún puesto de venta estuvo dentro del límite permisible (*Escherichia coli*:  $10^2 - 10^3$ ) que establece la “Norma Sanitaria de criterios

microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano”.

Una de las razones que la *Citrus sinensis* (naranja) esté contaminada por *Escherichia coli* podría ser por la cercanía de los servicios higiénicos que no garantiza una adecuada higiene y que está ubicado muy próximos a los puestos de venta de frutas en el mercado Unión y Dignidad, según la FAO y OMS (1999) los establecimientos deben ubicarse en una zona que garantice la inocuidad de los alimentos, donde las instalaciones alimentarias deben estar sólidamente construidas con materiales duraderos, fáciles de mantener, limpiar y desinfectar; las paredes y los tabiques deben tener una superficie lisa hasta una altura adecuada. Se hace énfasis que los pisos deben estar construido de manera concreta y que asegure su estabilidad del establecimiento y la limpieza sea adecuada y constante, sin embargo, los mercados evaluados no cuentan con las normas que indican la Organización Mundial de Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Zambrano (2011) en el estudio, Control de microorganismos patógenos y deteriorativos en jugos de naranja (*Citrus sinensis L.*) y mango (*Mangifera indica*), determinó que la bacteria *E. coli* O157:H7 es oportunista y se adapta a diferentes condiciones ambientales, la exposición de las bacterias en los alimentos puede ser durante el crecimiento y cultivo de fruta (cosecha, transporte, etc.), también se puede producir durante la preparación de los alimentos.

Al consumir *Citrus sinensis* (naranja) contaminada por *Escherichia coli* y superando ampliamente el límite permisible, puede causar enfermedades gastrointestinales como colitis hemorrágica, comenzando con una diarrea acuosa tal como lo menciona Harvey *et al* (2008). De acuerdo con los resultados mostrados en la presente investigación, se observó que los vendedores manipulan el dinero y los productos (naranja) al mismo tiempo, sin considerar que los productos no se encuentran bien ubicados dado que para su venta se encuentran en mantas de sacos o en los mismos cajones de madera, sin tener en cuenta los factores que pudieran alterar el producto, además.

Los resultados obtenidos de la carga bacteriana de *Escherichia coli* en *Citrus sinensis* (naranja), muestra la frecuencia entre los mercados Unión y Dignidad de la ciudad de Puno y mercado internacional Túpac Amaru de la ciudad de Juliaca 2018 (tabla 2).

**Tabla 2.** Frecuencia de *Escherichia coli* en los puestos de venta de *Citrus sinensis* (naranja) en las ciudades de Puno y Juliaca, 2018.

Puesto de Venta	Aceptable		Rechazable		Total	
	N	%	n	%	n	%
PVP1	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVP2	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVP3	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVP4	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVP5	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVJ1	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVJ2	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVJ3	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVJ4	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVJ5	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
<b>Total</b>	0	0.00%	150	100.00%	150	100.00%

Fuente: Elaboración propia

Chi Cuadrado Pearson  $p < 0,0001$

La tabla 2 muestra que, el 100 % de los puestos de venta de las ciudades de Puno y Juliaca presentan carga bacteriana de *Escherichia coli* en *Citrus sinensis* (naranja).

Calderón *et al.* (2017) reportó que el 40% de los jugos de naranja presenta coliformes totales y no son aptos para el consumo humano porque sobrepasan los límites permisibles establecidos en la Normativa Técnica Ecuatoriana, mientras que Escobar y Rodrigues (2016), encontró que el 100% de las muestras evaluadas presentan *Escherichia coli* en jugos, tales resultados concuerdan con la presente investigación mostrando que el 100 % presenta carga bacteriana y sobrepasan los límites permisibles.

Olvera (2007), reporta que el 23% de todos los jugos de zanahoria expendidos en México presentaron contaminación fecal, y mala calidad microbiológica respecto a *E.coli*. representando un riesgo para la salud de los consumidores, resultados similares a esta investigación donde el análisis microbiológico de las muestras de *Citrus sinensis*

(naranja) en los mercados Unión y Dignidad de la ciudad de Puno y el mercado internacional Túpac Amaru de Juliaca, mostró que el 100% de las muestras analizadas presenta carga bacteriana de *Escherichia coli*, superando los límites permisibles, esto probablemente debido a que en la ciudad de Puno y Juliaca existe un déficit de manipulación de las frutas tal como lo menciona Escobar y Rodríguez (2016), que no existe una debida manipulación de los productos expendidos, ya que en su mayoría no utilizan la indumentaria adecuada, como guantes, gorro para el cabello, tanto para la venta de frutas ni a la hora de preparar los jugos, además, portan joyas como anillos, relojes, aretes; estos pueden ser medios de contaminación ya que pueden acumular suciedad y restos de alimentos.

**Tabla 3.** Frecuencia de la presencia de *Salmonella sp.* en *Citrus sinensis* (naranja) que se expenden en los mercados Unión y Dignidad de la ciudad de Puno y el mercado Internacional Túpac Amaru de la ciudad de Juliaca, 2018.

Puesto de venta	Presencia		Ausencia		Total	
	N	%	n	%	n	%
PVP1	15	10.00%	0	0.00%	15	10.00%
PVP2	15	10.00%	0	0.00%	15	10.00%
PVP3	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVP4	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVP5	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVJ1	15	10.00%	0	0.00%	15	10.00%
PVJ2	15	10.00%	0	0.00%	15	10.00%
PVJ3	15	10.00%	0	0.00%	15	10.00%
PVJ4	15	10.00%	0	0.00%	15	10.00%
PVJ5	15	10.00%	0	0.00%	15	10.00%
<b>Total</b>	105	70.00%	45	30.00%	150	100.00%

Fuente: Elaboración propia.

Chi Cuadrado Pearson  $p < 0,0001$

En el mercado Unión y Dignidad resultaron 2 (20.00%) puestos de venta con la presencia *Salmonella sp.* y 5 (50.00%) puestos de venta en el mercado Internacional Túpac Amaru

en Juliaca; estando dentro del límite permisible solo 3 (30.00%) puestos de venta de Puno (*Salmonella sp* = ausente).

Escobar y Rodrigues (2016), reportó el 87.50% presentan *Salmonella spp.* en jugos evaluados en Argentina; resultados similares a esta investigación, el 70.00% de las muestras analizadas en los mercados de Puno y Juliaca presentan la bacteria de *Salmonella sp.* esto probablemente a que las frutas son contaminadas por factores ambientales como el agua, aire y suelo que también son fuentes de contaminación microbiológica en frutas tal como refiere Garcia *et al.*,(2002), las contaminaciones microbiológicas por el medio hídrico son por la pobre higiene en alimentos (frutas) y la carencia de agua potable como consecuencia de ello se presentan enfermedades gastrointestinales como las diarreas agudas que son una de las “6 asesinas” de la infancia declaradas por la OMS y UNICEF en la mayoría de las veces debido al consumo de alimentos contaminados por distintas bacterias.

Bayona (2012) en sus resultados, destaca el 25% de los alimentos ambulantes y el 7.5 % de los alimentos de venta establecida (ensalada de frutas, yogurth con cereal, arepa rellena, pincho de carne y chorizo frito) fueron positivos para *Salmonella spp.* reportando una cantidad menor en relación con los resultados obtenidos en esta investigación.

FDA, (2002) menciona que otra vía de contaminación microbiológica es la contaminación de los suelos, el terreno que ha sido utilizado para actividades distintas de la agricultura puede estar contaminado con organismos patógenos o sustancias químicas tóxicas. Cuando el terreno ha sido utilizado para deshacerse de las basuras o como lugar de gestión de los desechos, puede contener materia orgánica descompuesta y, quizá, materia fecal. Dependiendo del contenido de las basuras, la cantidad de microorganismos en el suelo puede ser extremadamente elevada, contaminando así los cultivos de las frutas, hortalizas, verduras, etc.

#### 4.2. Determinación de la carga bacteriana de *Escherichia coli* y la presencia de *Salmonella sp.* en *Solanum lycopersicum* (tomate) en las ciudades de Puno y Juliaca, de la Región de Puno - 2018.

Los resultados de los promedio con 3 repeticiones por puesto de venta, de la carga bacteriana de *Escherichia coli* en *Solanum lycopersicum* (tomate) en NMP/g. de muestra, los puestos de venta evaluados en el mercado Unión y Dignidad, el Puesto de Venta Puno (PVP)1 presentaron 2138.00, el PVP2: 1638.67, el PVP3: 3510.67, el PVP4: 1348.00 g. de muestra (ANEXO C.3); en la ciudad de Juliaca el PVJ1:1561.33, PVJ2: 1006.67, PVJ3: 1618.67, PVJ4: 4505.33 y PVJ5: 3106.00 NMP/g de *Escherichia coli* en *Solanum lycopersicum* (tabla 5).

**Tabla 4.** Promedios de carga bacteriana (NMP/g) de *Escherichia coli* en *Solanum lycopersicum* (tomate), que se expenden en los mercados Unión y Dignidad de la ciudad de Puno y el mercado Internacional Túpac Amaru de la ciudad de Juliaca, 2018.

Puesto de Venta (PV)	Mercados	
	Mercado Unión y Dignidad – Puno	Mercado Internacional Túpac Amaru – Juliaca
	$\bar{X}$ NMP/g	$\bar{X}$ NMP/g
PV1	2138.00	1561.33
PV2	1680.67	1006.67
PV3	3510.67	1618.67
PV4	1348.00	4505.33
PV5	241.33	3106.00
<b>Promedio</b>	<b>1783.73</b>	<b>2359.6</b>

Fuente: Elaboración propia

La prueba estadística de *t de student* ( $p < 0.05$ ), corroborado por el contraste de Tukey (Alfa=0,05 DMS=169.57693; gl: 140) demostrando, la mayor carga bacteriana de *Escherichia coli* se da en el PVJ4 y la menor en el PVP5 de ambos mercados, se observa que 4 puestos de venta del mercado Unión y Dignidad sobrepasan los límites permisibles establecidos, ( $10^2 - 10^3$ ), sin embargo, el PVP5 presento 241.33 NMP/g, estando dentro del límite permisible propuesto.

Solo un puesto de venta estuvo dentro de los limites, una de las razones podría ser que realiza una adecuada manipulación de sus productos expendidos, el mercado

Internacional Túpac Amaru, la contaminación puede ser por varios factores, el piso no cumple con las condiciones adecuadas ya que no realizan una desinfección constante, además los expendedores no utilizan la indumentaria requerida para garantizar la inocuidad de los productos (tomate). La alta carga bacteriana en los puestos de venta talvez se da por no existe instituciones que supervisen (SENASA, DIGESA) constantemente sin embargo, Alvarez (2011) reportó que el 100 % de los alimentos evaluados en los kioscos escolares en Cusco no presentaron *Escherichia coli*, muy contraria a la investigación realizada, podría ser que los kioscos están en supervisión constante por parte de sus autoridades.

Los resultados obtenidos de la presencia de *Escherichia coli* en *Solanum lycopersicum* (tomate), muestra la frecuencia entre los mercados Unión y Dignidad de la ciudad de Puno y mercado internacional Túpac Amaru de la ciudad de Juliaca 2018. Tabla 5

**Tabla 5.** Frecuencia de *Escherichia coli* en *Solanum lycopersicum* (tomate) en los puestos de venta de las ciudades de Puno y Juliaca, 2018.

Puesto de venta	Aceptable		Rechazable		Total	
	n	%	n	%	N	%
PVP1	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVP2	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVP3	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVP4	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVP5	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVJ1	15	10.00%	0	0.00%	15	10.00%
PVJ2	6	4.00%	9	6.00%	15	10.00%
PVJ3	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVJ4	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVJ5	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
<b>Total</b>	21	14.00%	129	86.00%	150	100.00%

Fuente: Elaboración propia

Chi Cuadrado Pearson  $p < 0,0001$

La tabla 5 muestra los resultados de la frecuencia de la carga bacteriana de *Escherichia coli* en *Solanum lycopersicum* (tomate), el mercado Unión y Dignidad los 5 (50.00%) puestos de venta se rechaza por que superan los límites, en cuanto, al mercado

Internacional Túpac Amaru 2 (20.00%) puestos de venta son aceptables y 3 (30.00%) de igual manera no están dentro del límite permisible.

Piedra *et al.* (2016) obtuvo en sus resultados *Escherichia coli* O157:H7 y otras bacterias en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) evaluados en México, haciendo énfasis que los puntos críticos de contaminación son los trabajadores, el agua de riego, suelo. Ocaña *et al.* (2015) en su investigación, de los 5 municipios evaluados el tomate (*Solanum lycopersicum*) en el estado de México obtuvo, las ciudades de Coatepec Harinas y Texcaltitlán sobrepasaron el límite de la norma, también menciona que los productos hortícolas puede contaminarse por la presencia de heces de humanos y animales domésticos que los agricultores crían, siendo un peligro de brotes de enfermedades y un riesgo para la salud pública.

Rivera *et al.* (2009) evaluó las hortalizas en los mercados de Cajamarca, determino la frecuencia de *Escherichia coli* en perejil y lechuga, mencionando que el estiércol de bovino utilizado como fertilizante puede aumentar los niveles de contaminación por microorganismos patógenos, relacionados a los resultados de Rivera *et al.* (2009), Muñoz (2005) reportó el 2.2% de verduras del mercado Caquetá presentó niveles de *E. coli* superiores a lo establecido por la ICMSF y el MINSA, recomendando realizar un efectivo lavado y desinfección de las verduras frescas para consumo crudo, evitando la transmisión de microorganismos patógenos y Supervisar el desarrollo de adecuadas prácticas de manipulación y expendio de verduras, especialmente de consumo crudo, en los centros de abasto, resultados similares a esta investigación en donde el 86% de las muestras analizadas de *Solanum lycopersicum* (tomate) de las ciudades de Puno y Juliaca superan los límites permisibles establecidos; solo el 14% muestra una cantidad aceptable, esto probablemente que, la expendedora organizó y manipuló con más cuidado sus productos de venta, con respecto a los demás expendedores. La contaminación del tomate puede estar en cualquier etapa de desde la siembra hasta la distribución a los hogares.

La entidad supervisora SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria) dentro de sus funciones debe realizar inspecciones a establecimientos como mercados dedicados al procesamiento primario para garantizar la calidad de los productos. Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran un déficit en cumpliendo sus funciones, en la evaluación microbiológica realizada de *Solanum lycopersicum* (tomate) y *Citrus sinensis* (naranja) en los mercados de Puno y Juliaca muestra superior a los límites establecidos

en cuanto a *Escherichia coli*, cifras notablemente altas, dado que pueden desarrollar enfermedades gastrointestinales dependiendo del estado inmunológico de las personas que consumen estos productos.

**Tabla 6.** Frecuencia de la presencia *Salmonella sp.* en *Solanum lycopersicum* (tomate), que se expenden en los mercados Unión y Dignidad de la ciudad de Puno y el mercado Internacional Túpac Amaru de la ciudad de Juliaca, 2018.

Puesto de venta	Presencia		Ausencia		Total	
	n	%	n	%	n	%
PVP1	15	10.00%	0	0.00%	15	10.00%
PVP2	15	10.00%	0	0.00%	15	10.00%
PVP3	15	10.00%	0	0.00%	15	10.00%
PVP4	15	10.00%	0	0.00%	15	10.00%
PVP5	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVJ1	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVJ2	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVJ3	0	0.00%	15	10.00%	15	10.00%
PVJ4	15	10.00%	0	0.00%	15	10.00%
PVJ5	15	10.00%	0	0.00%	15	10.00%
<b>Total</b>	90	60.00%	60	40.00%	150	100.00%

Fuente: Elaboración propia

Chi Cuadrado Pearson  $p < 0,0001$

Los resultados de frecuencia de *Salmonella sp.* en *Solanum lycopersicum* (tomate), resultó, el mercado Unión y Dignidad 4 (40.00%) puestos de venta presentaron este patógeno y 2 (20.00%) puestos de venta del mercado Internacional Túpac Amaru en Juliaca.

Estos resultados probablemente se deban a que los puestos de venta del mercado Unión y Dignidad estén muy cerca a los servicios higiénicos (2 baños) y la población que recurre no realiza un lavado adecuado de las manos, portando así la bacteria y entrando en contacto directo con los productos (tomate), en cambio el mercado Internacional Túpac Amaru no se encuentra cerca de ningún sanitario (baño) resultando así que solo 2 puesto de venta presentaron esta bacteria que sería contaminada por otros factores ambientales,

de manera similar Alvarez (2011) reportó que 5 instituciones mostraron *Salmonella* de las 13 evaluadas en kioscos en el departamento de Cusco.

Las contaminaciones microbiológicas de los alimentos podrían ser reducidos y controlados si las autoridades responsables de proteger la salud pública, enfatizarían en el control y monitoreo de las ETA (Enfermedades Transmitidas por los Alimentos) para minimizar los riesgos de contraer enfermedades gastrointestinales.

Valensuela *et al.* (2016) obtuvo un porcentaje de 11.11% de *Salmonella spp.* en *Solanum lycopersicum* (tomate), también menciona que, el lugar de cultivo de los tomates, viven sapos y que estos podrían ser medios de contaminación al producto con sus heces de este animal. Muñoz (2005) reportó, el 10% de las verduras presentó contaminación, resaltando la col en el mercado Ramón Castilla, presentando el mayor porcentaje (20%) respecto a *Salmonella spp.* recomienda realizar un efectivo lavado y desinfección de las verduras frescas para consumo crudo, evitando la transmisión de microorganismos patógenos y supervisar el desarrollo de adecuadas prácticas de manipulación y expendio de verduras, especialmente de consumo crudo, en los centros de abasto, resultados diferentes en relación a la presente trabajo de investigación en el cual existe mayor en porcentaje (60%) de puestos de venta de tomate que presentan la bacteria *Salmonella sp.* en *Solanum lycopersicum* (tomate), esto probablemente a que en los puestos de venta no existe medidas básicas de bioseguridad que garanticen la inocuidad de las frutas. Los servicios higiénicos próximos a los puestos de venta, pueden ser una fuente de contaminación fecal, esto además de las sobrecargas en el servicio de desagüe, en donde los buzones próximos a los mercados colapsan en épocas de lluvia siendo focos infecciosos para los puestos de venta tanto para los ambulantes, centros de expendio, restaurantes, y otros tipos de expendedores de alimentos.

## V. CONCLUSIONES

- La investigación realizada entre los meses de abril – junio del 2018, concluimos que, las frutas de *Citrus sinensis* (naranja) evaluadas en los mercados Unión y Dignidad de Puno y mercado Internacional Túpac Amaru de Juliaca superan en 100.00% los límites establecidos (*limite permisible* = $10^2$ - $10^3$ ) de *Escherichia coli*, existiendo una contaminación microbiológica, con respecto a *Salmonella sp.* presenta, en Puno 2 (20.00%) y Juliaca 5 (50.00%) y el 30.00% ausente este patógeno.
- Con respecto a la fruta de *Solanum lycopersicum* (tomate), en la evaluación de *Escherichia coli* en los mercados Unión y Dignidad de Puno (50.00%) y mercado Internacional Túpac Amaru de Juliaca (36.00%), superan los límites establecidos (*limite permisible* = $10^2$ - $10^3$ ), de igual manera existe una contaminación microbiológica por esta bacteria, similarmente se manifestó con la presencia de *Salmonella sp.* en Puno (40.00%) y Juliaca (20.00%) superando el límite (*ausente*) respecto a esta bacteria.

## VI. RECOMENDACIONES

- Continuar el estudio, proponiendo identificar los serotipos de *Escherichia coli*, serovariedades de *Salmonella* y plantear alternativas de solución para disminuir la contaminación microbiológica en frutas.
- Incentivar y difundir por parte de las instituciones competentes sobre la importancia que tiene el consumo de productos frescos como las frutas y verduras en condiciones sanitarias idóneas para no ocasionar problemas en la salud en la población.
- Promover y capacitar por parte de las instituciones competentes, sobre buenas prácticas de manipulación (BPM) a los productores, expendedores y consumidores de productos agropecuarios.
- Estudiar la presencia de pesticidas y metales pesados para determinar la contaminación química.

## VII. REFERENCIAS

- Administracion de Drogas y Alimentos - FDA. (2002). *Mejorando La Seguridad Y Calidad De Frutas Y Hortalizas Frescas : Manual De Formación Para Instructores* (1.<sup>a</sup> ed.). Prince george. Recuperado a partir de [http://jifsan.umd.edu/docs/gaps/es/Manunal %25 20 completo.pdf](http://jifsan.umd.edu/docs/gaps/es/Manunal%20completo.pdf)
- Alvarez Luza Eufrazio David. (2011). *Determinacion del cumplimiento de las normas de higiene y de la calidad sanitaria en alimentos preparados y expendidos en kioscos escolares de colegios nacionales del distrito de Wanchaq- Cusco*. Universidad Nacional San Antonio Abad Del Cusco.
- Ancillo, G., & Medina, A. (2014). *Los cítricos* (universita).
- Askar, M., Faver, M. S., Frank, C., Bernard, H., Gilsdorf, A., Fruth, A., ... Werber, D. (2011). Update on the ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome due to shiga toxin- producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O104. Alemania: Mayo.
- Avila, P. G. T., & Fonseca, M. M. M. (2008). *Calidad Microbiologica de jugos preparados en hogares de bienestar familiar en la zona de Cundinamarca*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Barco, B. C. M. (2001). «*Aplicacion del sistema de analisis de riesgos y control de puntos criticos (HACCP) sobre la evaluacion higienico sanitaria de cuatro centros de abasto de Lima Metropolitana*». Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Calderón, R., Jácome, J. D., Reyes, M., Rojas, D., & Cando, L. J. R. (2017). Universidad Politécnica Salesiana -Sede Quito , Campus “ El Girón ”, 25(1), 14.
- Canese Arquimedes y Canese Andres. (2012). *Manual de microbiologia y parasitologia medica*. (general diaz, Ed.) (7.<sup>a</sup> ed.). España.
- Carro Paz, Roberto y Gonzalez Gomez, D. (2013). NORMAS HACCP Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control. *Universidad Nacional de Mar del Plata*, 1(1), 16.

- Casp, V. A., & Abril, R. J. (1999). *Proceso de Conservacion de Alimentos* (Mundi-Pre). Madrid. España.
- CDC, C. for D. C. and P. (2006). Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 Infections associated with consumption of fresh spinach- United states, September 2006. (Morbidity, pp. 1045-1046).
- Chamarro J. (1995). *Anatomia Y Fisiologia De La Planta In: Nuez, F. ed. El cultivo del tomate*. Madrid.
- CODEX STAN 245-2004. (2011). CODEX STAN 245 Página 1 de 6.
- COMPIAL. (2015). *Comision Multisectorial Permanente De Inocuidad Alimentaria* (1.<sup>a</sup> ed.). Peru.
- Diez, M. J. (1995). *Tipos De Variedades. In: Nuez. Ed. El Cultivo Del Tomate*. Madrid.
- Escobar Ruiz Enrique Javier, R. C. K. A. (2016). *Calidad Microbiologica De Jugos Naturales Comercializados En Los Alrededores Del Campus Central De La Universidad De El Salvador*.
- Esquivel Valensuela Berenice, Gallegos robles, M. Á., Vázquez vázquez, C., Salazar sosa, E., García hernández, J. L., Orona castillo, I., & Idilio trejo Escareño. (2016). DETECCIÓN DE *Salmonella spp* . EN TOMATE MEDIANTE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS, 1(1), 162-166.
- FAO y OMS. (1999). *La Comision Del Codex Alimentarius Y El Programa Conjunto/ OMS Sobre Normas Alimentarias*.
- FAO. (2007). Manual de manejo postcosecha de frutas Tropicales (Papaya, piña, plátano, cítricos). *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)*, 1, 50.
- FAO. (2010). *Saneamiento Rural Y Salud / Guía Para Acciones A Nivel Local COMO*. Recuperado a partir de [www.fao.org/3/Edocrep](http://www.fao.org/3/Edocrep)
- FAO. (2011). *de la huerta a la mesa- promocion del consumo de frutas y vegetales a partir de huertas familiares*. Chile.

- FAO. (2012). *Prevencion De La E. coli En Los Alimentos*, 1(1), 0-16.
- FAO. (2013). *El Cultivo De Tomate Con Buenas Prácticas Agrícolas En La Agricultura Urbana Y Periurbana*.
- Farfan Japura Fany Yesenia. (2010). *Condiciones Sanitarias Y Presencia De Escherichia Coli En Lechugas (Lactuca sativa) De Emparedados, Expendidas En Los Kioskos De La Universidad Nacional Del Altiplano Puno- Peru, 2010*. Universidad Nacional del Altiplano.
- Frazier, W. C., & D.C. Westhoff. (1993). *Microbiología de los alimentos*. (S. A. Z. Acibia, Ed.) (4 edición). España.
- Galarza, S. Katherine E. (2018). “ *Evaluación Microbiológica De Alimentos Adquiridos En La Vía Pública Del Cercado De Lima Entre Mayo 2017 Y Junio 2018* ”. Universidad Norbert Wiener.
- Garcia, J. A. O., Tortajada, J. F. I., M, A. O. M., Andreu, J. A. L., Conesa, A. C., Castell, J. Ga. i.I. Navarro Vasquez. (2002). Contaminantes medio-ambientales en la alimentación. *II Conferencia Mundial sobre la Alimentación*, 1(1), 69-76.
- Grados. (1982). *Guia para el Aislamiento y Vigilancia de Salmonella y Shiguella*.
- HORTOINFO. (2017). <http://www.hortoinfo.es/index.php/informes/cultivos/5897-inf-tomate-2017>.
- INACAL, Instituto Nacional de Calidad (2014). *infraestructura de la calidad en el Peru*.
- INEI. (2009). *Encuesta Nacional De Presupuestos Familiares 2008-2009.*, 32.
- Ivan Palomino, Rodrigo Moore Carrasco, Gilda Carrasco, Pablo Villalobos, L. G. (2010). El consumo de tomates previene el desarrollo de Enfermedades Cardiovasculares y Cáncer : Antecedentes epidemiológicos y mecanismos de acción, 28, 121-129.
- Ladaniya. (2008). *Citrus fruit: biology, techonology and evaluation*. San Diego: Elsevier.
- Laura Chauca de Meza Eva. (2017). *Metodo de Analisis Microbiologico de los Alimentos*. (Mayvar Impresores, Ed.) (1 edición). Puno.

- Llop Hernandez, A., Valdez-Dapena Vivanco, M., & Luis, Z. S. J. (2001). *Microbiología y Parasitología Médicas*. (Ciencias Medicas, Ed.) (1.<sup>a</sup> ed.). La habana: Casanovas, Niurka.
- Lopardo, H. A., & Silvia C. Predari. (2016). *Manual de microbiologia de la asociacion Argentina de microbiologia*. (Horacio A. Lopardo, Ed.) (1.<sup>a</sup> ed.). Argentina.
- Margarita Aux. Arevalo Martin. (2013). *Determinaciones Cuantitativas en Naranja Mediante Tecnologias NIRS*. Universidad Publica de Navarra- España.
- Maria Ines Caffer, R. T. y N. B. (2008). Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de *Salmonella spp.*, 1, 76.
- Martin A. Bayona R. (2012). *Prevalencia De Salmonella Y Enteroparásitos En Alimentos Y Manipuladores De Alimentos De Ventas Ambulantes Y Restaurantes En Un Sector Del Norte De Bogotá*, Colombia. *Universidad de Ciencias aplicadas y Ambientales.*, 15(2), 267-274.
- Massoc, A. (2008). Enfermedades Asociadas A Los Alimentos. *REVISTA*, 25(5), 395-397.
- MINAGRI. (2017). Plan Estrategico Institucional Actualizado PEI 2016-2018. Peru.
- MINISTERIO DE SALUD. (2013). Normativa Sanitaria De Alimentos. Peru.
- Miniterio de Salud. (2009). *Tablas peruanas de composición de alimentos* (8.<sup>a</sup> ed.). Mg. Carolina Tarqui Mamani.
- Murray, Rosenthal, & Pfaller. (2016). *Medical Microbiology*. (Elsevier, Ed.) (8 edicion). Philadelphia.
- Olvera, C. D. F. (2007). *Frecuencia Y Comportamiento De Salmonella, Y Microorganismos Indicadores De Higiene En Jugo De Zanahoria*. Universidad Autonoma del Estado de Hidalgo.
- OMS. (2007). *Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos*. (Oranizacion Mundial de la Salud, Ed.) (1.<sup>a</sup> ed., Vol. 1). Ginebra.
- Opineda. (2011). Principios y recomendaciones para la aplicación del sistema de analisis

de peligros y puntos críticos de control. *Guía de aplicación del sistema de APPCC*, 1(1), 1-14.

Piedra Vargas J.J., Gallegos Robles M.A., Salazar Sosa E., Vazquez C., Garcia Hernandez J.L., Trejo Escareño H.I., O. C. I. (2016). *Estado De Inocuidad Del Sistema Productivo De Tomate ( Lycopersicum esculentum Mill) En Relación A La Presencia De Escherichia coli O157:H7*, 1(1), 190-196.

PNIA. (2016). *Política nacional de inocuidad alimentaria* (1.<sup>a</sup> ed.). peru.

Quispe, M. J., & Sánchez, P. V. (2001). *Evaluación Microbiológica Y Sanitaria De Puestos De Venta Ambulatoria De Alimentos Del Distrito De Comas , Lima - Perú. Rev Med Exp*, 18, 27-32.

Richard Harvey, Pamela, C., & Fisher, B. (2008). *Microbiología*. (C. P. Harvey Richar, Ed.) (2.<sup>a</sup> ed.). España.

Rivera-jacinto, M., Rodríguez-ulloa, C., & López-orbegoso, J. (2009). Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca , Perú  
FECAL CONTAMINATION IN GREEN VEGETABLES THAT ARE SOLD IN  
MARKETS OF CAJAMARCA CITY , PERU. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2009; 26(1): 45-48. Rivera-Jacinto, 26(1), 45-48.

RL, O. J., Gutiérrez-ibáñez, A. T., Sánchez-pale, J. R., Cerda, A. L., & Puebla, I. R. (2015). Calidad microbiológica del tomate ( Solanum lycopersicum L .) producido bajo condiciones de invernáculo en 5 Municipios del Estado de México. *internacional de botanica experimental*, 45-50.

Rodriguez, Q. M., Zapata, S. M. E., Solano, M. M. A., Lozano, B. D., Torrico, F., & Cruz, T. M. (2015). Evaluación de la contaminación microbiológica de la lechuga (Lactuca sativa) en la cadena alimentaria, provincia de Quillacoll, Cochabamba, Bolivia. *Gac Med Bol*, 38(2), 31-36.

Semillaria. (2015). Clasificación taxonomica de tomate (en línea) s.p. Recuperado 15 de julio de 2019, a partir de <http://semillaria.es/index.php/cultivos-ok/29-cultivos/94-taxonomia>

SENASA, Servicio Nacional de Sanidad Agraria (2005). Reglamento De Organizacion Y Funciones- SENASA. *Ministerio de Agricultura*, 1(1), 1-21.

SENASA, Servicio Nacional de Sanidad Agraria (2015). MEMORIA 2015, SENASA PERU. *MEMORIA INSTITUCIONAL*, 1(1), 1-61.

Silvia Melina Muñoz Javier. (2005). *Frecuencia de enterobacterias en verduras frescas de consumo crudo expandidas en cuatro mercados de Lima Metropolitana Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

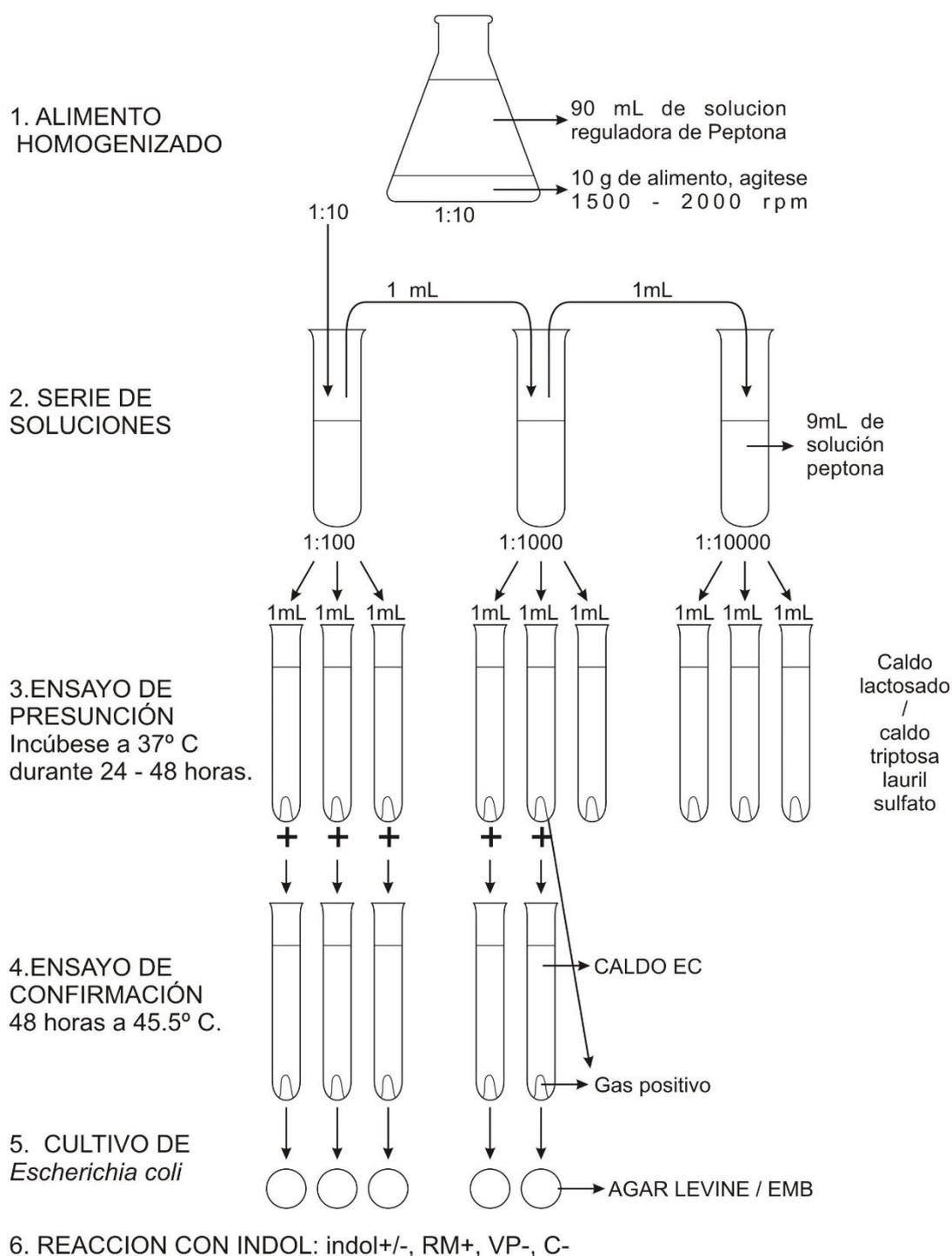
Swingle, W. T., & Reece, P. C. (1967). *The botany of citrus and its wild relatives. In the citrus industry*. (ed. W. Rether et al., Ed.) (vol. 1). University of California. Division of Agricultural Sciencies.

Velasquez, C. M. J. (2017). *Estudio Microbiologico de los Alimentos Preparados en el Servicio del Batallon de la Policia Militar N° 503, Chorrillos*. Universidad Cesar Vallejo.

Zambrano, A. (2011). *Control de microorganismos patogenos y deteriorativos en jugos de naranja (Citrus sinensis l.) y mango(Mangifera indica l.)usando compuestos antimicrobianos de orgigen de plantas Presentado ante la ilustre Universidad de Venezuela*. Universidad Central de Venezuela.

**ANEXOS**

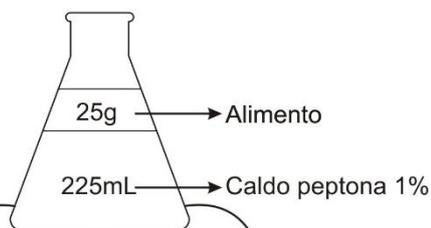
**Anexo A: NUMERO MAS PROBABLE DE *Escherichia coli* (NMP)**



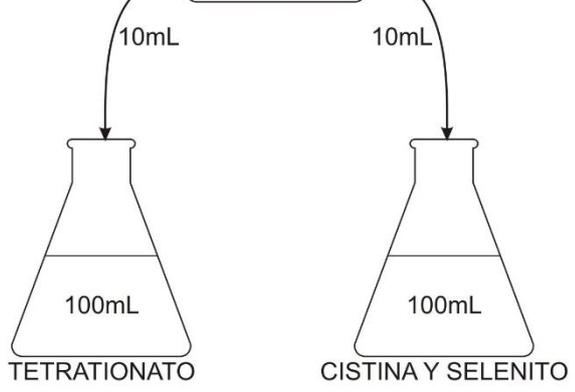
Fuente: Laura, (2017).

Anexo B: INVESTIGACION DE *Salmonella*

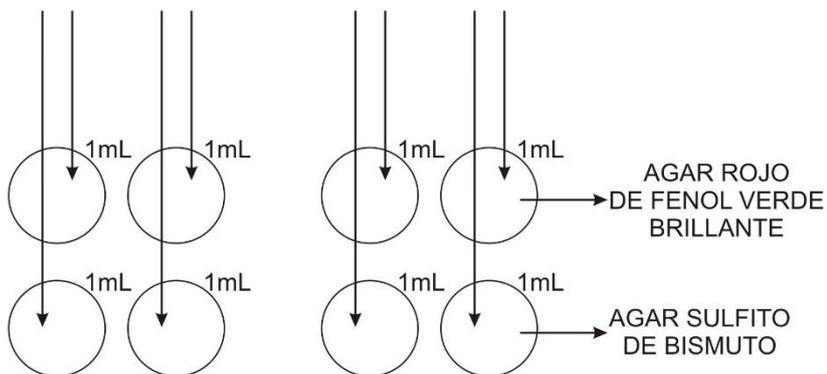
1. PREENRIQUECIDO  
incubacion a 37°C  
durante 24 horas.



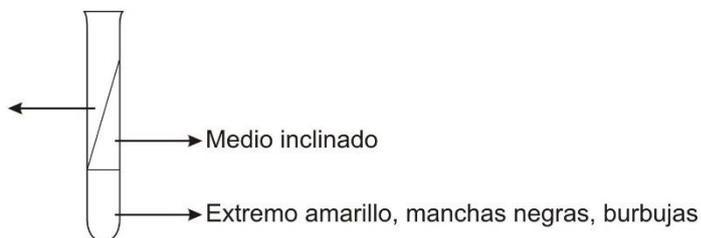
2. ENRIQUECIDO  
Incubacion de 42 - 43°C  
durante 48 h.



3. VERSION EN PLACAS  
Incubar a 37°C  
durante 24 - 48 h.



4. EXAMEN  
Sobre agar TSI.



4. CONFIRMACION

- A. BIOQUÍMICA
- B. SEROLOGÍA

Fuente: Laura, (2017).

Anexo C: Análisis estadístico de T de Student

Anexo C.1. Análisis estadístico de T de Student para *Escherichia coli* en *Citrus sinensis* (naranja).

Prueba de t	Puesto de Venta									
	Puno-Mercado Unión y dignidad					Juliaca – Mercado Internacional Túpac Amaru				
	PVP1	PVP2	PVP3	PVP4	PVP5	PVJ1	PVJ2	PVJ3	PVJ4	PVJ5
<b>Promedio</b>										
( $\bar{x}$ )	2013.33	1033.33	1518.00	1483.33	1370.00	1309.33	1568.67	2090.67	1323.33	1131.33
<b>DE</b>	126.98	61.95	34.68	78.71	78.19	203.24	126.65	26.04	37.35	19.95
<b>LI</b>	1943.01	999.03	1498.79	1439.75	1326.70	1196.78	1498.53	2076.25	1302.65	1120.28
<b>LS</b>	2083.65	1067.64	1537.21	1526.92	1413.30	1421.88	1638.80	2105.09	1344.02	1142.38
<b>T</b>	61.41	64.60	169.52	72.99	67.86	24.95	47.97	310.95	137.21	219.61
<b>P</b>	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
<b>Limite por gramo(LP):</b>	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$
<b><math>10^2 - 10^3</math></b>										

Anexo C.2. Análisis estadístico de T de Student para *Salmonella sp.* en *Citrus sinensis* (naranja).

Prueba de t	Puesto de Venta									
	Puno-Mercado Unión y dignidad					Juliaca – Mercado Internacional Túpac Amaru				
	PVP1	PVP2	PVP3	PVP4	PVP5	PVJ1	PVJ2	PVJ3	PVJ4	PVJ5
<b>Promedio(<math>\bar{x}</math>)</b>	38.80	31.60	00.00	00.00	00.00	31.33	40.60	78.87	25.13	14.13
<b>DE</b>	2.96	4.64	00.00	00.00	00.00	3.02	3.74	2.07	1.51	2.75
<b>LI</b>	37.16	29.03	00.00	00.00	00.00	29.66	38.53	77.72	24.30	12.61
<b>LS</b>	40.44	34.17	00.00	00.00	00.00	33.00	42.67	80.01	25.97	15.66
<b>T</b>	50.82	26.37	00.00	00.00	00.00	40.24	42.07	147.88	64.65	19.92
<b>P</b>	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
<b>Limite por</b>										
<b>gramo(LP):</b>	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} = LP$	$\bar{x} = LP$	$\bar{x} = LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$
<b>Ausente</b>										

Anexo C.3. Análisis estadístico de T de Student para *Escherichia coli* en *Solanum lycopersicum* (tomate)

Prueba de t	Puesto de Venta									
	Puno-Mercado Unión y dignidad					Juliaica – Mercado Internacional Túpac Amaru				
	PVP1	PVP2	PVP3	PVP4	PVP5	PVJ1	PVJ2	PVJ3	PVJ4	PVJ5
<b>Promedio</b> ( $\bar{x}$ )	2138.00	1680.67	3510.67	1348.00	241.33	1561.33	1006.67	1618.67	4505.33	3106.00
<b>DE</b>	164.02	59.46	195.61	101.29	26.42	72.00	65.97	217.35	232.22	155.37
<b>LI</b>	2047.17	1647.74	3402.34	1291.91	226.70	1521.46	970.13	1498.30	4376.73	3019.96
<b>LS</b>	2228.83	1713.59	3618.99	1404.09	255.97	1601.20	1043.20	1739.03	4633.93	3192.04
<b>T</b>	50.48	109.48	69.51	51.54	35.38	83.99	59.10	28.84	75.14	77.42
<b>P</b>	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
<b>Limite por</b>										
<b>gramo(LP):</b>	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} < LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$
<b><math>10^2 - 10^3</math></b>										

Anexo C.4. Análisis estadístico de T de Student para *Salmonella sp.* en *Solanum lycopersicum* (tomate).

Prueba de t	Puesto de Venta									
	Puno-Mercado Unión y dignidad					Juliaca – Mercado Internacional Túpac Amaru				
	PVP1	PVP2	PVP3	PVP4	PVP5	PVJ1	PVJ2	PVJ3	PVJ4	PVJ5
<b>Promedio(<math>\bar{x}</math>)</b>	29.53	42.33	82.87	30.33	00.00	00.00	00.00	00.00	29.93	24.67
<b>DE</b>	3.64	5.09	4.49	5.04	00.00	00.00	00.00	00.00	3.10	8.39
<b>LI</b>	27.52	39.51	80.38	27.54	00.00	00.00	00.00	00.00	28.21	20.02
<b>LS</b>	31.55	45.15	85.35	33.12	00.00	00.00	00.00	00.00	31.65	29.31
<b>T</b>	31.40	32.18	71.54	23.32	00.00	00.00	00.00	00.00	37.34	11.39
<b>P</b>	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
<b>Limite por</b>										
<b>gramo(LP):</b>	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} = LP$	$\bar{x} = LP$	$\bar{x} = LP$	$\bar{x} = LP$	$\bar{x} > LP$	$\bar{x} > LP$
<b>Ausente</b>										$\bar{x} > LP$

Anexo D: Matriz de consistencia

TITULO: CONTAMINACION MICROBIOLÓGICA POR <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella sp.</i> EN <i>Citrus sinensis</i> (naranja) Y <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) EN LAS CIUDADES DE PUNO Y JULIACA, 2018.					
PROBLEMA	OBJETIVO	VARIABLES	INDICADORES	METODOS	PRUEBA ESTADÍSTICA
¿Las bacterias de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella sp.</i> presente en muestras de <i>Citrus sinensis</i> (naranja) y <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) en las ciudades de Puno y Juliaca, 2018, superan los límites permisibles?	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Determinar la carga bacteriana de <i>Escherichia coli</i> y la presencia de <i>Salmonella sp.</i> en <i>Citrus sinensis</i> (naranja), expendidos en los mercados Unión y Dignidad de Puno y el Mercado Internacional Túpac Amaru en Juliaca.</li> <li>- Determinar la carga bacteriana de <i>Escherichia coli</i> y la presencia de <i>Salmonella sp.</i> en <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate), expendidos en los mercados Unión y Dignidad de Puno y el Mercado Internacional Túpac Amaru en Juliaca.</li> </ul>	<i>Escherichia coli</i>	<p><i>Escherichia coli</i>: NMP/g de muestra de y <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) superior a límite permisible (<math>10^2</math>-<math>10^3</math>).</p> <p><i>Salmonella sp.</i>: NMP/g de muestra de <i>Citrus sinensis</i> (naranja) y <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) superior al límite permisible (ausente).</p>	<p>La metodología se basó en la "Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano" según la RESOLUCION MINISTERIAL N° 591- 2008/MINSA</p> <p>Métodos de Análisis Microbiológico de los Alimentos (Laura, 2017).</p>	<p>T de student</p> <p>Análisis de varianza</p> <p>Contraste de Tukey</p> <p>Chi cuadrado de Pearson</p>

Anexo E: Índice del Numero Más Probable (NMP) y límites de confianza cuando se realizan 3 tubos.

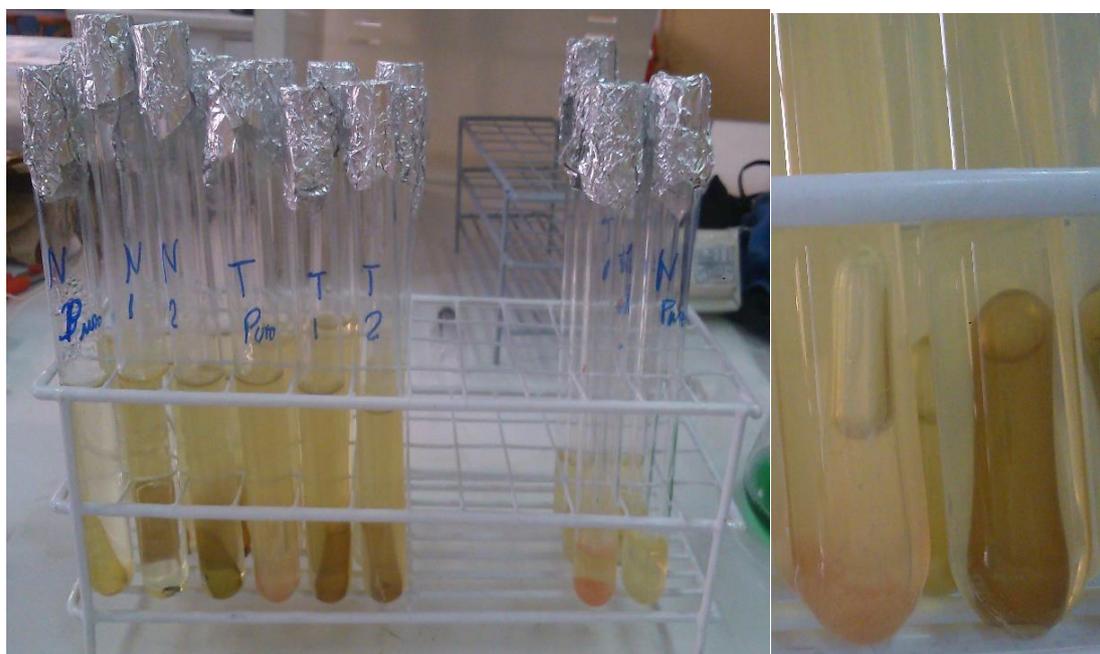
Número de tubos positivos		NMP por gramo o mL		Índice de confianza 95%	
0	1:100	1:1000	1:10	Inferior	Superior
0	0	0	<3	<0.5	9
0	0	1	3	<0.5	13
1	1	0	3	<0.5	20
1	0	0	4	1	21
1	0	1	7	1	23
1	1	0	7	3	36
1	1	1	11	3	36
2	2	0	11	1	36
2	0	0	9	3	37
2	0	1	14	3	44
2	1	0	15	7	51
2	1	1	20	4	60
2	2	0	21	10	100
3	2	1	28	4	120
3	0	0	23	7	130
3	0	1	30	15	380
3	0	2	64	7	210
3	1	0	43	14	230
3	1	1	55	30	380
3	1	2	100	15	380
3	2	0	95	30	440
3	2	1	150	25	470
3	2	2	210	36	1300
3	3	0	240	71	2400
3	3	1	460	150	4800
3	3	2	1100		
3	3	3	>2400		

Fuente: Laura, (2017)

## Anexo F: Galería de Fotografías



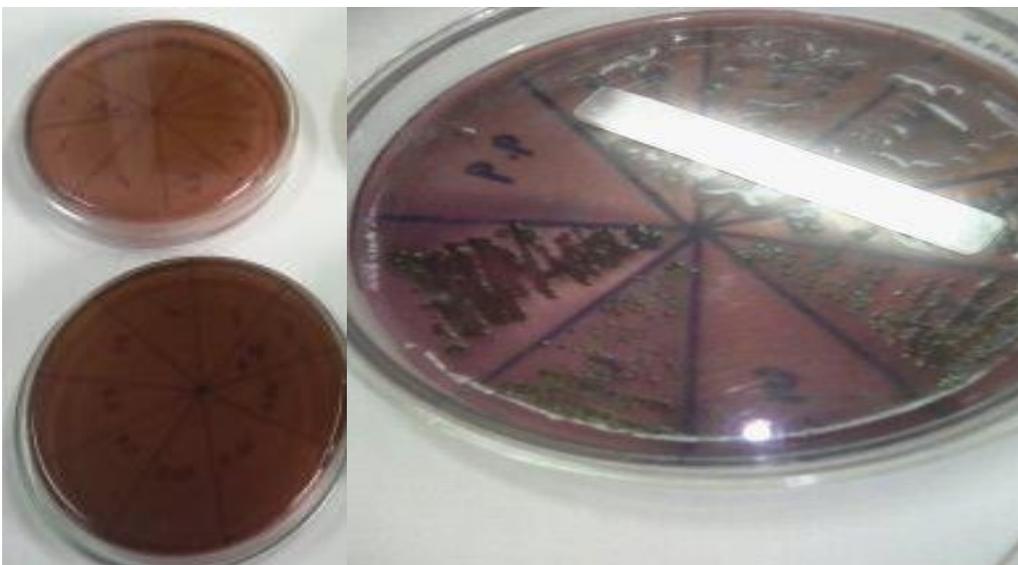
**Figura 1.** Naranja y tomate homogenizado para la evaluación de *Escherichia coli*, periodo abril-junio, Puno- 2018.



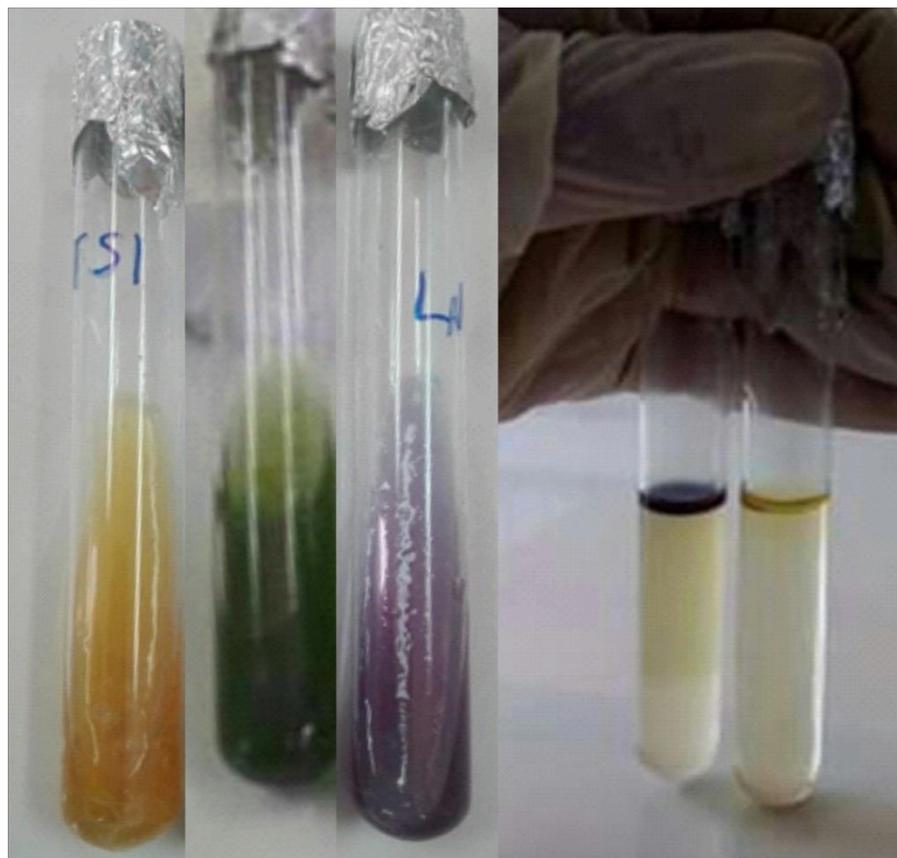
**Figura 2.** Ensayo de presunción para *Escherichia coli* en caldo Lactosado, periodo abril-junio, Puno- 2018.



**Figura 3.** Ensayo de confirmación de *Escherichia coli* en caldo verde brillante bilis lactosa, periodo abril-junio, Puno- 2018.



**Figura 4.** *Escherichia coli* en agar selectivo Eosina Azul de Metileno (EMB), periodo abril-junio, Puno- 2018.



**Figura 5.** Prueba bioquímica para *Escherichia coli* en agar TSI, CS, LIA, Indol, periodo abril-junio, Puno- 2018.



**Figura 6.** Pesado de las muestras de naranja y tomate, recopiladas en las zonas de estudio, periodo abril-junio, Puno- 2018.



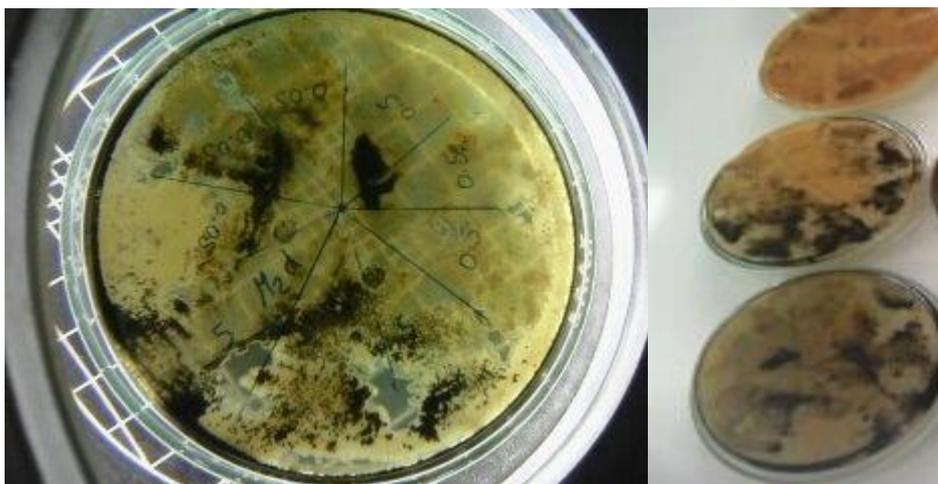
**Figura 7.** Triturado de las muestras en un mortero, periodo abril-junio, Puno- 2018



**Figura 8.** Pre-enriquecimiento en caldo peptona de las muestras de tomate y naranja, para la evaluación de *Salmonella sp.*, periodo abril-junio, Puno- 2018.



**Figura 9.** Fase de enriquecimiento en agar tetratonato, para la evaluación de *Salmonella sp.*, periodo abril-junio, Puno- 2018.



**Figura 10.** Versión en placas de *Salmonella sp.* en agar SS. periodo abril-junio, Puno- 2018.

Anexo G: reacciones bioquímicas de Enterobacteriaceae en TSI-LIA

GRUPO I: HIDROGENO SULFURADO (H <sub>2</sub> S) POSITIVO				GRUPO II: HIDROGENO SULFURADO (H <sub>2</sub> S) NEGATIVO				
ANAEROGENICOS (GAS NEGATIVO)				ANAEROGENICOS (GAS NEGATIVO)				
TSI	GAS	H <sub>2</sub> S	INDOL	ENTEROBACTERIA	TSI	GAS	INDOL	ENTEROBACTERIA
K/A	-	± 0	-	Salmonella typhi *	K/A	-	-o+	Shigella
AEROGENICOS (GAS POSITIVO)								
TSI	GAS	H <sub>2</sub> S	INDOL	ENTEROBACTERIA	A/A 0	-	+	Escherichia
K/A	2+	-4+	-	Salmonella *	K/A	-	-	Enterobacter
K/A ó A/A	2+	-4+	-	Arizona	K/A	-	+	Serratia
K/A ó A/A	2+	-4+	-	Citrobacter	K/A	-	+	Providencia
K/A ó A/A	2+	4+	-ó+	Proteus *	A/A	-	-o+	Yersinia
K/A	2+	4+	+	Edwardsiella	K/A	-	-	
AEROGENICOS (GAS POSITIVO)								
TSI	GAS	H <sub>2</sub> S	INDOL	ENTEROBACTERIA	TSI	GAS	INDOL	ENTEROBACTERIA
A/A 0	2+	-	+	Escherichia	A/A 0	2+	+	Escherichia
K/A	4+	-	-o+	Klebsiella	K/A	4+	-	Enterobacter
A/A 0	3+	-	-	Serratia	K/A	2+	-	Serratia
K/A	(+)	-	+	Proteus (*)	K/A	+	-	Paratyphy A (*)

K=ALCALINO  
 A=ACIDO  
 R=ROJO  
 N=NEUTRO  
 \*=ENTEROPATOGENOS IMPORTANTES  
 (\*)=VER TEXTO

Grados (1982). Guía para el Aislamiento y Vigilancia de Salmonella y Shigella.





UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO PUNO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS



## CONSTANCIA

LA JEFE DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO (UNA) PUNO

**HACE CONSTAR:**

Que la Srta. **BACHILLER ERIKA FLORES ADUVIRI**, egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas, ha realizado su trabajo de investigación motivo de tesis, intitulado: **CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA POR *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* EN *Citrus sinensis* (Naranja) y *Solanum lycopersicum* (Tomate)**, ejecutando el trabajo experimental en el laboratorio de Microbiología de Alimentos durante los meses Abril, Mayo y Junio del año 2018; desempeñándose con responsabilidad, dedicación y puntualidad.

Se expide el presente a solicitud de la interesada y para los fines convenientes.

Puno, 10 de Setiembre del 2019.

Doc. **Dr. EVA LAURA CHAUCA**  
Principal D.E. FCCBB-UNA  
COLBIOP N° 905  
JEFE DE LABORATORIO