

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Trabajo final de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

**Evaluación de la calidad microbiológica del repollo cosechado en tres altitudes de una finca, así como la eficacia de los procesos de desinfección postcosecha del repollo entero y mínimamente procesado en un Centro Agrícola de Costa Rica**

Monserrat Soto Carballo

Carnet: B67046

San José, Costa Rica

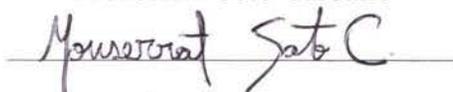
2023

## TRIBUNAL EXAMINADOR

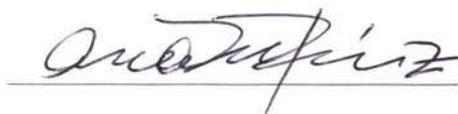
Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Elaborado por:

Montserrat Soto Carballo

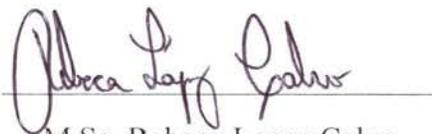


Aprobado por:



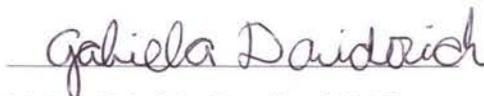
Ph.D. Ana Mercedes Pérez Carvajal

Presidente del Tribunal



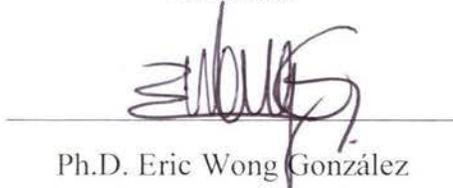
M.Sc. Rebeca Lopez Calvo

Profesor Designado



M.Sc. Gabriela Davidovich Young

Directora



Ph.D. Eric Wong González

Asesor



M.Sc. Ruth De la Asunción Romero

Asesora

## **DEDICATORIA**

A Dios, mi familia y mis amigos por apoyarme en cada paso de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente estudio fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por medio del fondo para Trabajos Finales de Graduación del año 2021, en el marco del proyecto de investigación 735-B8-040 Evaluación de prácticas de siembra, cosecha y postcosecha en Costa Rica y su influencia sobre la calidad microbiológica de hortalizas. Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación por el apoyo para poder realizar este proyecto.

Seguidamente quisiera agradecer a todas las personas que de una u otra forma hicieron este proyecto posible. A la profesora Gabriela, el profesor Eric y la profesora Ruth por ser mis mentores en esta tesis y siempre guiarme de la mejor manera. Gracias a la profesora Marcy por sus consejos.

Muchísimas gracias, Henry, Luis, Vanny, Laura y Randall por toda su ayuda y amable disposición. Gracias a todos los miembros del Centro Agrícola y a don Carlos por su colaboración y amable atención.

Gracias a todos mis amigos por siempre impulsarme a seguir adelante y ser mi mayores alentadores. Siempre tendrán un espacio especial en mi vida.

Gracias a Dios y a mi familia por permitirme llegar hasta acá.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

TRIBUNAL EXAMINADOR.....	ii
DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	v
ÍNDICE DE CUADROS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN .....	xi
1. JUSTIFICACIÓN.....	- 1 -
2. OBJETIVOS.....	- 6 -
3. MARCO TEÓRICO .....	- 7 -
3.1 GENERALIDADES DEL REPOLLO.....	- 7 -
3.1.1 Microorganismos en el repollo a nivel de cosecha y postcosecha.....	- 7 -
3.2 CULTIVO DEL REPOLLO .....	- 9 -
3.2.1 Las buenas prácticas agrícolas y el cultivo en laderas .....	- 10 -
3.3 COSECHA DEL REPOLLO .....	- 12 -
3.4 MANEJO POSTCOSECHA DEL REPOLLO .....	- 13 -
3.4.1 Lavado y desinfección de producto fresco .....	- 14 -
3.4.2 Enfermedades de transmisión alimentaria en productos frescos .....	- 16 -
3.5. DESINFECTANTES DE PRODUCTO FRESCO .....	- 17 -
3.5.1. El cloro como desinfectante .....	- 18 -
3.5.2 El peróxido de hidrógeno como desinfectante .....	- 19 -
3.5.3 El ácido peracético como desinfectante.....	- 19 -
3.5.4 Proceso de validación de una desinfección .....	- 20 -
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	- 23 -
4.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO .....	- 23 -

4.2 COMPARACIÓN DE LA CALIDAD DEL REPOLLO RECIÉN COSECHADO, SEGÚN LOS RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO EN TRES ZONAS DE DISTINTA ALTITUD DE LA FINCA ESTUDIADA .....	- 23 -
4.2.1 Entrevista con el proveedor .....	- 23 -
4.2.2 Muestreo de repollos recién cosechados .....	- 24 -
4.2.3 Análisis microbiológicos .....	- 25 -
4.2.4 Diseño experimental y análisis estadístico .....	- 27 -
4.3 EVALUACIÓN DE LA REDUCCIÓN DEL INDICADOR MICROBIOLÓGICO SELECCIONADO EN EL REPOLLO, ANTES Y DESPUÉS DE CADA UNA DE LAS ETAPAS DE DESINFECCIÓN .....	- 28 -
4.3.1 Selección de un microorganismo indicador .....	- 28 -
4.3.2 Descripción de las etapas de desinfección del repollo y recolección de datos.-	- 28 -
4.3.3. Muestreo de repollos sometidos a diferentes procesos de desinfección.....	- 29 -
4.3.4. Análisis microbiológicos .....	- 31 -
4.3.5. Diseño experimental y análisis estadístico .....	- 31 -
4.4 COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE TRES DESINFECTANTES DISTINTOS DURANTE TRES TIEMPOS DE CONTACTO, POR MEDIO DE LA REDUCCIÓN EN EL RECuento DE <i>E. coli</i> INOCULADO EN EL REPOLLO .....	- 32 -
4.4.1 Muestreo de repollos para valorar la efectividad de 3 agentes desinfectantes	- 32 -
4.4.2 Descripción de los tratamientos de desinfección evaluados.....	- 32 -
4.4.3. Inoculación y análisis microbiológicos .....	- 34 -
4.4.4 Diseño experimental y análisis estadístico .....	- 35 -
5. RESULTADOS y DISCUSIÓN .....	- 37 -
5.1 COMPARACIÓN DE LA CALIDAD DEL REPOLLO RECIÉN COSECHADO EN TRES ZONAS DE DISTINTA ALTITUD DE LA FINCA ESTUDIADA. ....	- 37 -
5.2 EVALUACIÓN DE LA REDUCCIÓN DEL RECuento TOTAL AEROBIO ANTES Y DESPUÉS DE CADA UNA DE LAS ETAPAS DE DESINFECCIÓN PARA COMPROBAR SU EFECTIVIDAD. ....	- 44 -
5.3 COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE 3 DESINFECTANTES DISTINTOS DURANTE 3 TIEMPOS DE CONTACTO, POR MEDIO DE LA REDUCCIÓN DE <i>E. coli</i> INOCULADO EN EL REPOLLO.....	- 55 -
6. CONCLUSIONES .....	- 61 -
7. RECOMENDACIONES.....	- 63 -

8. BIBLIOGRAFÍA .....	- 65 -
9. ANEXOS .....	- 79 -
9.1 ANEXO I. ....	- 79 -
9.2 ANEXO II. ....	- 81 -

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro I.</b> Condiciones en las que se realiza cada uno de los procesos de desinfección durante la cadena de obtención del repollo mínimamente procesado del Centro Agrícola estudiado. ....	- 29 -
<b>Cuadro II.</b> Diseño experimental para el análisis de la reducción de la carga microbiológica alcanzada en el recuento de <i>E. coli</i> . para comparar la eficacia del agua potable (tratamiento control), del peróxido de hidrógeno a 50 ppm, del cloro a 200 ppm y del ácido peracético a 80 ppm durante tres tiempos de contacto.....	- 33 -
<b>Cuadro III.</b> Resultados obtenidos del recuento total aerobio, recuento de mohos y levaduras y recuento de coliformes totales y <i>E. coli</i> , así como la presencia / ausencia de <i>L. monocytogenes</i> en repollos de tres altitudes distintas de una finca.....	- 37 -
<b>Cuadro IV.</b> Carga microbiológica inicial y final del repollo en cada uno de los procesos de desinfección realizados en la cadena de producción y su respectiva reducción microbiológica alcanzada.....	- 44 -
<b>Cuadro V.</b> Reducción microbiológica alcanzada después de someter muestras de repollo inoculadas con <i>E. coli</i> a tratamientos desinfectantes con cloro, ácido peracético, peróxido de hidrógeno y agua por 3 tiempos de contacto distintos.....	- 56 -
<b>Cuadro VI.</b> Instrumento de evaluación de las buenas prácticas agrícolas en la finca proveedora de repollo visitada, basado en los manuales de “Buenas Prácticas Agropecuarias” (MAG, 2008), “USDA Good Agricultural Practices Good Handling Practices: Auditory Verification Checklist” (USDA, 2019) y “Standards for the Growing, Harvesting, Packing, and Holding of Produce for Human Consumption” (FDA, 2015).....	- 79 -
<b>Cuadro VII.</b> Instrumento de evaluación de las buenas prácticas agrícolas postcosecha y buenas prácticas de manufactura en la planta empacadora de la finca proveedora de repollo y la planta del Centro Agrícola visitadas, basado en los principios de “Buenas Prácticas Agropecuarias” (MAG, 2008), “USDA Good Agricultural Practices Good Handling Practices: Audit Verification Checklist” (USDA, 2019) y “Standards for the Growing, Harvesting, Packing, and Holding of Produce for Human Consumption” (FDA, 2015), así como el reglamento de “Buenas Prácticas de Manufactura: Principios Generales” (Poder Ejecutivo, 2006).....	- 81 -

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Ejemplo visual de un cultivo en terreno inclinado. Fuente: Kimball Koch, 1986..  
..... - 10 -
- Figura 2.** Corte que se realizó al repollo entero antes del proceso de desinfección. .... - 30 -
- Figura 3.** Corte que se realizó al repollo entero después del proceso de desinfección. ... - 30 -

## ABREVIATURAS

#: Porcentaje

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

ATCC: American Type Culture Collection

ATS: Agar Tripticasa Soya

BAM: Bacteriological Analytical Manual

BPA: Buenas Prácticas Agrícolas

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CEN: Comisión Europea de Estandarización

CITA: Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos

CTS: Caldo Tripticasa Soya

EFSA: European Food Safety Authority

FDA: US Food and Drug Administration

g: gramo

HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point

INEC: Instituto Nacional de Estadística y Censos

log: logaritmo

MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería

min: minutos

ppm: partes por millón

PIMA: Programa Integral de Mercadeo Agropecuario

RCT: Recuento de Coliformes Totales

RMYL: Recuento de Mohos y Levaduras

RTA: Recuento Total Aerobio

RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano

RTCR: Reglamento Técnico de Costa Rica

s: segundos

UFC: Unidades formadoras de colonias

WHO: World Health Organization

## RESUMEN

Soto Carballo, Monserrat

### **Evaluación de la calidad microbiológica del repollo cosechado en tres altitudes de una finca, así como la eficacia de los procesos de desinfección postcosecha del repollo entero y mínimamente procesado en un Centro Agrícola de Costa Rica**

Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos – San José, Costa Rica

Soto Carballo, M. 2023

88h.: 3 il. – 134 refs.

El presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar la calidad microbiológica del repollo cosechado en tres altitudes de una finca, así como la eficacia de los procesos de desinfección postcosecha del repollo entero y mínimamente procesado en un Centro Agrícola de Costa Rica con el propósito de brindar información y datos de utilidad a la industria de producto fresco, especialmente la del repollo.

Para evaluar la calidad microbiológica se tomaron muestras de repollos de cada una de las zonas y se realizaron análisis microbiológicos de recuento total aerobio (RTA), recuento de mohos y levaduras (RMYL) y recuento de *E. coli* y coliformes totales (RCT), así como de presencia / ausencia de *L. monocytogenes*. No se encontraron diferencias significativas entre los promedios de los recuentos de los repollos correspondientes a cada una de las tres zonas de la finca para el RTA ( $P=0,5276$ ;  $1-\beta = 0,9796$ ), el RMYL ( $P=0,9963$ ;  $1-\beta = 1,0000$ ) y el RCT ( $P=0,4095$ ;  $1-\beta = 0,9999$ ) con un nivel de significancia del 5%. Por otra parte, no se detectó *E. coli* ni *L. monocytogenes* en ninguno de los repollos de las zonas según la sensibilidad del método. En la zona alta y en la zona media se logró identificar en un 100% de las muestras la presencia de *L. ivanovii*, por lo que los repollos de la zona baja fueron los únicos en donde se pudo asegurar la ausencia de *Listeria* sp.

Seguidamente, al estudiar la cadena de producción del repollo que realizaba el Centro Agrícola, se evaluó el RTA en la cadena de procesamiento del repollo, antes y después de cada una de las etapas de desinfección: 60 ppm de cloro por 10 min en repollo entero, 50 ppm de peróxido de hidrógeno por 1-2 min en repollo entero y 60 ppm de cloro en repollo

rallado por 5 min, para comprobar su efectividad. Ninguno de los tratamientos logró superar 1 log UFC/g de reducción microbiológica por lo que se consideran poco efectivos bajo la meta de reducción de 3 log UFC/g (Chang, 2015).

Finalmente, al comparar la reducción de *E. coli* ATCC 25922 inoculado en repollos a nivel de laboratorio, después de ser desinfectados con 80 ppm de ácido peracético a 1, 5 y 10 min, 50 ppm de peróxido de hidrógeno a 1, 5 y 10 min y 200 ppm de cloro a 5, 10 y 15 min en tinajas de desinfección, se obtiene que ninguno de los tratamientos alcanza la reducción de 3 log UFC/g deseada. No se obtienen diferencias significativas que permitan declarar que uno de los desinfectantes fue más efectivo que los otros, pero se denota que estos sí son más efectivos que el utilizar agua solamente.

En conjunto, los resultados resaltan la importancia de que cada productor valore las condiciones de su terreno en específico y verifique los controles que implementa o debe implementar para evitar que una posible acumulación de materia orgánica ocurra y genere una problemática microbiológica para su producto. A pesar de que los tratamientos desinfectantes no alcanzaron la meta de reducción deseada, se recalca que estos sí son capaces de eliminar un porcentaje de la carga microbiológica presente, por lo tanto, su correcta implementación es vital para mantener la calidad de los repollos que llegan hasta el consumidor.

REPOLLOS, CALIDAD MICROBIOLÓGICA, PRÁCTICAS DE COSECHA, MANEJO POSTCOSECHA, TRATAMIENTOS DESINFECTANTES, CLORO, PERÓXIDO DE HIDRÓGENO, ÁCIDO PERACÉTICO.

M.Sc. Gabriela Davidovich Young

Escuela de Tecnología de Alimentos.

## 1. JUSTIFICACIÓN

El repollo (*Brassica oleracea*) es una hortaliza cultivada desde hace muchos años alrededor del mundo y representa una fuente de vitaminas, minerales y fibra (Sharma *et al.*, 2018). En Costa Rica, el estudio de consumo de hortalizas realizado por PIMA (Programa Integral de Mercadeo Agropecuario) en el año 2015, demostró que después de la papa y el tomate, el repollo es la tercera hortaliza más consumida del país y la cuarta hortaliza más gustada, con un consumo per cápita de 12,96 kg en ese año. Entre las principales razones de su consumo están su bajo precio, la costumbre a consumirlo y su funcionalidad como acompañamiento de otros alimentos (PIMA, 2016).

Las últimas estadísticas registradas por el INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos) en la Encuesta Nacional Agropecuaria 2019, muestran que en Costa Rica existen 590,9 hectáreas sembradas de repollo y 577,4 hectáreas cosechadas, permitiendo una producción anual de 19 479,6 toneladas métricas de repollo, con una pérdida de 166,7 toneladas métricas (INEC, 2020).

A diferencia del 2019, los estudios de mercado realizados por el Consejo Nacional de Producción en el año 2020 muestran que los productores de hortalizas tuvieron que reducir sus siembras hasta en un 50% debido a la crisis económica que generó el COVID-19. En un comunicado del presidente de la Corporación Hortícola Nacional, la reducción de la cantidad de hortalizas que se industrializaban, la caída de las exportaciones y la baja en las compras hizo que muchos productores tuvieran que aplicar nuevas formas de comercialización como la eliminación de intermediarios y el traslado a otras partes más alejadas del país para poder vender sus productos (Barquero, 2021).

Sumado a la problemática económica, una de las preocupaciones con los productos frescos como el repollo son las altas cargas microbiológicas. Estas y las posibles contaminaciones con patógenos a lo largo de la cadena de producción pueden conllevar a la pérdida del producto por problemas de inocuidad y calidad. Debido a lo anterior, las buenas prácticas agrícolas dictadas por el MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería), establecen

la importancia de identificar las posibles fuentes de contaminación física, química y biológica, de manera que se apliquen las medidas necesarias para reducir o eliminar sus peligros desde el momento de la cosecha (MAG, 2008).

A nivel físico, en los terrenos de siembra con inclinación o ladera se debe tener en cuenta el efecto de la erosión del suelo. En las partes más altas, la erosión, además de remover el material superficial rico en materia orgánica y nutrientes, altera la profundidad efectiva del suelo, la capacidad de retención de agua y la estructura de este; mientras tanto, en los suelos al pie de la pendiente, se genera la acumulación del material desplazado (Sancho y Villatoro, 2005). Dicho fenómeno podría causar la proliferación de microorganismos no deseados en las partes bajas de la ladera, los cuales representan una fuente de contaminación de las cosechas y un posible riesgo para los consumidores (Meng *et al.*, 2016).

En algunas fincas de Costa Rica se han detectado problemáticas como el uso de desechos de animales como abono orgánico, deficiencias sanitarias en el campo, presencia de animales domésticos, presencia de agroquímicos y coliformes totales en ríos usados para el riego de hortalizas en el país, cercanía de fincas dedicadas a la producción animal, deficiencias de aseo en los recipientes plásticos usados para cosecha, entre otros (Durán, 2016).

Todas estas malas prácticas podrían contribuir con la proliferación de microorganismos antes mencionada en los cultivos de las zonas bajas. El haber evaluado la calidad microbiológica del repollo cosechado en tres altitudes de una finca permitió tener una visión más clara ante una posible problemática no contemplada aún con claridad, procurando así el cultivo de productos inocuos y de calidad que puedan ser comercializados sin ningún problema, evitando asimismo el desperdicio de alimentos. Se pretende que todos los conocimientos adquiridos puedan ser transmitidos y aprovechados en un futuro, específicamente por los productores de repollo a nivel nacional que requieran de esta información, especialmente aquellos con sembradíos en terrenos no planos.

En la etapa postcosecha del repollo, se busca conseguir que el producto no sufra contaminación cruzada, de manera que el repollo entregado al consumidor esté en óptimas

condiciones. Las diferentes operaciones que se realizan, como la manipulación, el lavado, el troceado y el empaque final, se convierten en una posible entrada de microorganismos no deseados por el agua de lavado, el equipo, el contacto con superficies contaminadas, el mal manejo de los operarios, entre otras (Ilic, 2011).

La presencia de microorganismos patógenos no detectables sensorialmente representa la mayor inquietud en producto fresco (López, 2003). Por consiguiente, el seguir las dosificaciones correctas de desinfectantes y realizar el cambio del agua de lavado frecuentemente es de vital importancia; cuando las soluciones usadas no son cambiadas con regularidad, la propia desinfección puede convertirse en fuente de contaminación (Ilic, 2011). La acumulación de materia orgánica y la presencia de patógenos en la superficie del producto y su posterior internalización disminuyen la efectividad de los desinfectantes convencionales (Zhong, 2016).

En el caso del cloro, por ejemplo, este es barato en comparación con otros métodos de desinfección, es de rápida acción y es capaz de eliminar microorganismos de las superficies (CDC, 2008). Sin embargo, puede llegar a reaccionar fácilmente con la materia orgánica (Banach *et al.*, 2015) y el uso de altas concentraciones de este, favorece la formación de altos niveles de subproductos de desinfección que pueden adherirse a los biopolímeros de los alimentos y luego ser liberados durante su digestión (Komaki *et al.*, 2018). Estos subproductos pueden generarse por la formación de cloratos en agua clorada como resultado de la degradación del cloro o por la formación de trihalometanos y ácidos haloacéticos, debido a la reacción del cloro con la materia orgánica. La preocupación a nivel de salud radica en la detección de las propiedades cancerígenas y genotóxicas de estos compuestos (Gadelha *et al.*, 2019).

En el caso del peróxido de hidrógeno, este posee actividad bactericida. Sin embargo, posee una lenta cinética de desinfección y se disipa rápidamente en agua con vegetales de hoja frescos, lo que conlleva a que altas concentraciones deban ser utilizadas en los sistemas de desinfección para mantener la calidad del agua (Van Haute *et al.*, 2015).

Por otra parte, el ácido peracético es uno de los desinfectantes más utilizados, no es corrosivo y gracias a su poder bactericida posee la capacidad de degradar la membrana celular de microorganismos no deseados. Sin embargo, al ser expuesto a la piel o a altas temperaturas, puede desprender un aroma no deseado (Kramer y Doran, 2018). Está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés), gracias a que no genera productos secundarios dañinos ni residuos, por lo que incluso es aceptado en la producción orgánica (Zoellner *et al.*, 2018).

Para evaluar la calidad o inocuidad de un producto en la industria de alimentos, generalmente se utilizan microorganismos indicadores. El análisis de un microorganismo indicador proporciona información simple, fiable y rápida sobre el procesamiento y permite evaluar la contaminación del medio ambiente, el nivel general de higiene, la posible presencia o ausencia de patógenos de transmisión alimentaria y la eficacia de las medidas de control microbiano como lo son las desinfecciones (Halkman y Halkman, 2014).

El método: “Actividad germicida y detergente de los desinfectantes” de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (EPA, 2019), usado para determinar la reducción de las poblaciones bacterianas lograda por los desinfectantes, demanda que se logre una reducción  $\geq 5$  log en 30 s para que un agente desinfectante sea efectivo. Sin embargo, en esta metodología el desinfectante es directamente suspendido con la bacteria en una disolución, por lo que es diferente a cuando el proceso se realiza a nivel industrial e interfieren una serie de factores como la formación de biofilms, la internalización de las bacterias, la contaminación cruzada entre lotes, la presencia de materia orgánica, entre otros. Debido a esto, a nivel industrial, una reducción de 3 log es reconocida como efectiva para reducir las bacterias adheridas a superficies de producto fresco por medio de desinfectantes (Chang, 2015).

A nivel de inocuidad, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) ha identificado, investigado y advertido al público sobre brotes multiestatales relacionados con las hortalizas de hoja verde, mayoritariamente relacionados con ensaladas empacadas (CDC, 2022a). En el 2022 se identificaron brotes de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en este tipo de productos que

llegaron a causar la hospitalización de algunos de los consumidores (CDC, 2022b y CDC, 2022c).

La alerta para la industria surge a partir de la gran cantidad de casos relacionados con el consumo de vegetales frescos. En el 2018 un brote de *E. coli* 0157: H7 en lechuga romana generó 210 casos de enfermedad, 96 hospitalizaciones y 5 fallecimientos en Estados Unidos (Guevara *et al.*, 2019), mientras que, en el año 2021, los análisis de la FDA revelaron que el 43% de los hongos enoki muestreados en la República de Corea estaban contaminados con *L. monocytogenes*, causando un brote con un total de 36 casos en Estados Unidos, 12 casos en Canadá y 6 casos en Australia. (FDA, 2022d).

Al analizar y estudiar a nivel postcosecha los procesos de desinfección durante la cadena de producción del repollo entero y procesado, así como al evaluar los tratamientos desinfectantes y sus agentes químicos involucrados, bajo el parámetro de una reducción de 3 log utilizada en la tesis de Chang (2015), como una meta de desinfección deseada, se pretende mejorar la eficacia de la metodología de producción de repollo a nivel de planta procesadora, buscando nuevamente que se den todas las condiciones necesarias para un producto final inocuo y con la mejor calidad posible. De esta manera, los conocimientos adquiridos podrán ser aprovechados por todos aquellos involucrados en el procesamiento de esta hortaliza, así como por los consumidores.

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la calidad microbiológica del repollo cosechado en tres altitudes de una finca, así como la eficacia de los procesos de desinfección postcosecha del repollo entero y mínimamente procesado en un Centro Agrícola de Costa Rica.

### **Objetivos específicos**

- Comparar la calidad del repollo recién cosechado, según los resultados del recuento total aerobio, el recuento de mohos y levaduras, el recuento de *E. coli* y coliformes totales, así como la presencia de *Listeria monocytogenes* en tres zonas de distinta altitud de la finca estudiada.
- Evaluar la reducción del indicador microbiológico seleccionado en el repollo, antes y después de cada una de las etapas de desinfección en la finca productora y el Centro Agrícola que los recibe, para comprobar su efectividad.
- Comparar la eficacia de 3 desinfectantes distintos durante tres tiempos de contacto, por medio de la reducción de *E. coli* inoculado en el repollo.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 GENERALIDADES DEL REPOLLO

El repollo (*Brassica oleracea*) es una hortaliza cultivada desde hace muchos años alrededor del mundo (Sharma *et al.*, 2018). La mayoría de las variedades de repollo tienen su origen en la zona del Mediterráneo, Asia menor, Inglaterra y Dinamarca (MAG, 1991). En Costa Rica, se registraron 1168,3 hectáreas de repollo cosechado y sembrado en el año 2019. Este cultivo se encuentra principalmente en zonas altas como la región Central Oriental y la Central Occidental, caracterizadas por sus bajas temperaturas (INEC, 2020).

El repollo fresco está constituido en promedio por 90,6 - 92,5% de agua, 1,2% de proteína, un 0,12 - 0,18% de lípidos, un 5,4% de carbohidratos y un 1,6 - 6,2% de fibra (Nascimento, 2009). Además, es rico en compuestos bioactivos nutritivos y no nutritivos, que aportan propiedades antioxidantes y poseen beneficios para la salud, como los polifenoles. Estos últimos han sido reconocidos por sus propiedades preventivas contra la obesidad, la diabetes, la hipertensión e incluso el cáncer (Preedy, 2014).

##### 3.1.1 Microorganismos en el repollo a nivel de cosecha y postcosecha

La microbiota en hortalizas es muy variable. Mayoritariamente está constituida por bacterias Gram negativas como *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp. y *Pseudomonas* sp. y bacterias Gram positivas en las partes que crecen cerca o dentro del suelo, como *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp. y *Clostridium* sp. (Bejarano y Carrillo, 2007) y específicamente en hortalizas de hojas verdes, los niveles totales de bacterias aerobias pueden oscilar entre 5 y 6 log UFC/g (Johnston *et al.*, 2006).

El repollo pertenece a la familia de las crucíferas; esta familia a nivel de cosecha se ve afectada por microorganismos como *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas cichorii*, *P. maculicola*, *Xanthomonas campestris*, *Alternaria brassicae*, *Botrytis arasis*, *Peronospora*

*arasitica*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus stolonifer*, *Mycosphaerella brassicicola* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Tournas, 2005). Además, en las superficies del repollo se han encontrado bacterias ácido lácticas como *Leuconostoc* sp. y *Lactobacillus* sp. (Bejarano y Carrillo, 2007).

Entre los mohos más comunes que causan su deterioro destacan *Alternaria brassicae* y *Alternaria brassiciola*, los cuales causan manchas amarillas oscuras en las hojas y en casos serios, la pérdida de las hojas por completo. *Rhizoctonia solani* por su parte, causa un doblez o torcedura de la planta, haciendo que el tallo se asemeje a un alambre y que eventualmente el cultivo muera. *Fusarium oxysporum* aparece como el desarrollo de color verde amarillento en un lado de la planta que poco a poco la seca, mientras que, *S. sclerotiorum* produce estructuras negras llamadas esclerocios (Sharma *et al.*, 2018).

Entre las bacterias más comunes que causan deterioro en el repollo, destaca *Xanthomonas campestris*. Su infección se vuelve sistémica, lo que significa que la bacteria puede entrar en las venas de la planta y propagarse a la cabeza, causando ennegrecimiento del tejido vascular en infecciones graves (Lange y Smart, 2019). Esta puede sobrevivir de un año a otro en el suelo y en las hojas de cultivos muertos y puede ser transmitida de las plantas viejas hacia las más jóvenes (Murison y Napier, 2020).

Las pudriciones bacterianas resultan en una descomposición babosa del tejido infectado, y pueden seguirse de infecciones fúngicas. A nivel postcosecha, el recorte de las hojas exteriores, el enfriamiento rápido y el almacenamiento a baja temperatura reducen el desarrollo de estas pudriciones, sin embargo, *Botrytis* y *Alternaria* crecen aún a bajas temperaturas de almacenamiento (Cantwell y Suslow, 2002). En producto fresco los géneros fúngicos patógenos que más afectan incluyen *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* y *Sclerotinia* (Tripathi *et al.*, 2022).

En las plantas de producción se pueden procesar ingredientes alimentarios crudos hasta por 8 horas de forma continua. Durante este tiempo, microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Pseudomonas*

spp. y *Staphylococcus aureus* pueden encontrar refugio en el equipo de procesamiento y establecer biopelículas que pueden convertirse en focos de contaminación de los alimentos procesados o ser desplazados a otras ubicaciones (Aryal y Muriana, 2019).

### 3.2 CULTIVO DEL REPOLLO

Aun cuando los repollos de mejor calidad se obtienen en climas fríos y húmedos, algunas variedades producen cabezas aceptables en climas cálidos, por lo que el repollo puede ser cultivado durante todo el año. Esta hortaliza puede crecer en gran variedad de suelos, con valores de pH óptimos entre 6,0 y 6,5, siempre que las camas donde se siembren se preparen de manera adecuada, considerando que las plantas pequeñas se pueden dañar fácilmente por las fuertes lluvias y el viento (Murison y Napier, 2020).

La fertilización apropiada para el cultivo es dependiente de un previo análisis del suelo que permita determinar sus características físicas y químicas (Rikolto, 2019). Comúnmente se utilizan fertilizantes orgánicos o químicos; en Costa Rica, el 92,6% de las fincas de repollo utilizan fertilizante químico, el 4,5% hace una combinación de químico y orgánico, y un 2,9% utiliza solamente orgánico (INEC, 2020).

Para asegurar el rápido crecimiento y la maduración uniforme de toda la cosecha, los repollos requieren de acceso al agua. Los métodos de riego más eficientes son por aspersión y por goteo, los cuales permiten un riego uniforme y una posterior nutrición por igual de las plantas (Rikolto, 2019). Sin embargo, en Costa Rica solamente el 19,8% de las fincas de repollo usa riego por aspersión, mientras que un 79,2 % no utilizan riego (INEC, 2020) gracias a la facilidad que ofrecen las fuentes de agua naturales.

### 3.2.1 Las buenas prácticas agrícolas y el cultivo en laderas

El MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería) ha establecido mediante las BPA (Buenas Prácticas de Agricultura) las pautas básicas a seguir para minimizar los riesgos de degradación del ambiente y de contaminación, de manera que los productos tengan las características requeridas en cuanto a calidad e inocuidad para el consumidor. Estas incluyen el uso, manejo y conservación del suelo y el agua, el manejo de agroquímicos, bioinsumos, material propagativo y fertilizantes, el control de animales y los requerimientos postcosecha (MAG, 2008).

En Costa Rica se da el cultivo de montaña con parcelas dispersas de tierra aprovechable a diversas altitudes (figura 1), con diferentes climas, paisajes y escaso margen para la mecanización, gestionadas generalmente por explotaciones familiares. Estas proporcionan tierra para los cultivos y contribuyen a la seguridad alimentaria y nutricional de la población; sin embargo, la variabilidad climática y la degradación de la tierra, amenazan la capacidad de estos entornos montañosos para proporcionar bienes y servicios (FAO, 2017). Además, los usos previos del suelo o la presencia de agentes no deseados transmisibles por arrastre de viento o tierra de los terrenos aledaños, contribuyen como posibles fuentes de contaminación (MAG, 2008).



**Figura 1.** Ejemplo visual de un cultivo en terreno inclinado. Fuente: Kimball Koch, 1986

En un estudio del año 2005, realizado por Sancho y Villatoro en el Valle Central de Costa Rica, se determinó el efecto de la posición en la pendiente sobre la productividad de los suelos; como resultado se demostró una menor acidez y una mayor capacidad de retención

de agua en las bases de las pendientes, así como un alto contenido de materia orgánica, calcio y magnesio en algunos de los paisajes estudiados. Estos resultados fueron atribuidos al movimiento de las partículas de suelo provocado por la escorrentía a favor de la pendiente, lo que se cree que favoreció la acumulación de nutrientes en esta sección (Sancho y Villatoro, 2005). No obstante, en los terrenos inclinados, la pendiente hace que se creen pozos de agua cuando los suelos no cuentan con un drenaje como tal, generando un terreno inadecuado para un buen cultivo (Murison y Napier, 2020).

El transporte y la deposición de los suelos agrícolas afecta el ciclo del carbono y del nitrógeno, lo que influencia el comportamiento de los microorganismos del suelo. Debido a lo anterior, se ha vinculado la erosión del suelo con el aumento de la actividad microbiana en las partes inferiores de las pendientes (Meng *et al.*, 2016). Los microorganismos no deseados en los cultivos pueden transmitirse directamente por semillas o trasplantes contaminados y por cortes infectados en el vegetal, o bien, indirectamente por mala manipulación de los trabajadores, por agua y suelos contaminados con microorganismos, por insectos, o por la propagación del microorganismo, como en el caso de la extensión del micelio de los mohos o la transmisión de sus esporas con el viento (Sharma *et al.*, 2018).

El arrastre de microorganismos influye en la patogenicidad y la biogeografía microbiana (Acosta *et al.*, 2015). Por ejemplo, las altas concentraciones de patógenos como *Salmonella* sp. y cepas patógenas de *Escherichia coli* pueden sobrevivir períodos extensos de tiempo en el agua o directamente sobre el cultivo (Lampe *et al.*, 2017), representando un peligro para la inocuidad del cultivo, especialmente en producto fresco.

Consecuentemente, es estrictamente necesario el seguimiento de las BPA. Por medio de estas se verifica la pureza del agua utilizada, se evita el ingreso de animales al campo y la presencia de cualquier residuo fecal que pueda introducir patógenos, se verifica la higiene de los trabajadores, se trabaja con instrumentos limpios y desinfectados, se retiran del campo los empaques vacíos y se da tratamiento a todos los desechos orgánicos. Además, las BPA regulan que todos los fertilizantes, agroquímicos, plaguicidas y bioinsumos sean permitidos por organismos nacionales e internacionales, y sean agregados en las cantidades correctas y permitidas para obtener un producto final óptimo (MAG, 2008).

### 3.3 COSECHA DEL REPOLLO

El momento de la cosecha del repollo se llevará a cabo cuando la cabeza haya alcanzado la combinación deseada de tamaño y firmeza; dicha firmeza podrá ser palpable al presionar la cabeza del repollo con la punta de los dedos (Fornaris, 2014). Los días de maduración dependen del cultivar, la ubicación y el clima (Eskin, 2021), pero generalmente son entre 90 y 120 días (Rana *et al.*, 2014).

Si la cosecha se adelanta, las cabezas quedan muy suaves para su manipulación, mientras que, si la cosecha se atrasa, las cabezas se pueden hendir o partir (Rana *et al.*, 2014). Sin embargo, aunque la calidad del repollo puede disminuir al ser cosechado prematuramente (se da un marchitamiento acelerado y el olor característico disminuye), los compuestos bioactivos como el calcio, el hierro y el magnesio pueden estar en concentraciones más altas. Por otra parte, si el repollo se cosecha muy maduro, habrá una mayor concentración de los compuestos sulfurados y una menor concentración de vitaminas solubles en agua (Eskin, 2021).

La cosecha de los repollos se realiza manualmente, generalmente doblando la planta y cortando el tallo bajo la cabeza, dejando de 3 a 4 hojas exteriores que puedan proteger las cabezas. Los trabajadores deben saber manejar correctamente el producto para reducir los daños por cortaduras, impactos o magulladuras. Además, se debe hacer una desinfección regular de los cuchillos para evitar que sean una fuente de contaminación (Fornaris, 2014). Particularmente para esta hortaliza, es común el empaque en cajas plásticas, bolsas de malla o cartones cuyo peso varía entre 23 – 27 kg (Welbaum, 2015). Las cabezas deben ser colocadas sin sobrellenar el empaque de elección, de manera que no exista contacto entre el producto y el contenedor que se colocará en la parte superior, minimizando así los daños mecánicos durante el transporte (Rikolto, 2019).

### 3.4 MANEJO POSTCOSECHA DEL REPOLLO

El manejar cuidadosamente los repollos es requerido para prevenir el daño a las hojas exteriores que los envuelven, mantener su apariencia agradable y evitar la entrada de organismos no deseados (Eskin, 2021). Un repollo de buena calidad debería tener hojas exteriores de color verde brillante, crujientes y frescas, libres de manchas (Nascimento, 2009). En el Reglamento Técnico de Costa Rica “RTCR 382:2004 Repollo para Consumo en Estado Fresco”, se describen tres grados de calidad de repollo según el porcentaje de defectos acumulados permitidos: pudrición, daños por hongos, quemaduras de sol, marchitez, daños por insectos, daños mecánicos, falta de firmeza, babosas y tallo hueco. Asimismo, se clasifican los repollos en pequeños, medianos y grandes según su diámetro y su peso (Poder Ejecutivo, 2004).

Los productos frescos que atraviesan algún tipo de transformación física (pelado, rebanado o corte) como el repollo, deben ser manejados con especial cuidado. Al partir los vegetales, se da la liberación de agua y nutrientes que facilitan el crecimiento de los microorganismos presentes, especialmente si el producto pasa mucho tiempo a temperatura ambiente (Sivapalasingam *et al.*, 2004). Consecuentemente, estos deben de mantenerse o almacenarse en contenedores limpios y desinfectados, a temperatura y humedad controlada, que no estén en contacto con el suelo. Idealmente, todo producto fresco debe refrigerarse a más tardar 24 horas después de la cosecha (MAG, 2008).

En las instalaciones donde se acopia, procesa y empaca el repollo, debe existir una correcta ventilación y se deben tener protocolos de limpieza y desinfección establecidos, tanto antes de recibir la cosecha, como durante y después de su procesamiento; además, deben estar aisladas de otro tipo de operaciones que impliquen riesgos de contaminación (MAG, 2008).

Todos los trabajadores en contacto directo con el repollo deben de mantener una muy buena higiene y aseo. Debe existir una buena estructura sanitaria, donde los operarios puedan realizar sus necesidades fisiológicas en condiciones adecuadas, así como lavar y desinfectar

sus manos correctamente. Esta es una de las medidas más importantes ya que la mayoría de las enfermedades transmitidas por alimentos, se deben a contaminaciones con heces (Durán *et al.*, 2016). Asimismo, la FDA recomienda establecer una política de empresa que requiera el reporte de cualquier enfermedad de los trabajadores a su empleador, así como el uso de vestimenta adecuada y guantes en la medida de lo posible (FDA, 2018).

#### 3.4.1 Lavado y desinfección de producto fresco

A nivel industrial, se realizan procesos de lavado y desinfección de producto fresco con el objetivo de remover la tierra y la suciedad, eliminando así la contaminación adquirida en el campo (Barrera *et al.*, 2012). Sin embargo, los tratamientos antimicrobianos son menos efectivos en vegetales de hoja verde (Gombas *et al.*, 2017). El contacto del producto con agua de enfriamiento o lavado no óptima puede resultar en una fuente de contaminación por sí sola (Sivapalasingam *et al.*, 2004); aunque los químicos antimicrobianos añadidos pueden ayudar a controlar los peligros microbiológicos, estos deben ser mantenidos en cantidades suficientes o el agua puede transmitir la carga microbiana no deseada en cada lote de producto (Gombas *et al.*, 2017).

Factores como la concentración del desinfectante, el pH, la dureza del agua, la presencia de partículas insolubles y solubles, el tipo de producto, el nivel de calidad del producto, el tamaño del corte, la temperatura, la velocidad de agitación, el proceso de inmersión del producto, la variabilidad de las condiciones del proceso de lavado y el monitoreo, influyen la eficacia de la desinfección en vegetales de hoja verde (Gombas *et al.*, 2017).

El lavado postcosecha bajo condiciones comerciales tiene una eficacia de descontaminación limitada y podría terminar en una contaminación cruzada (Murray *et al.*, 2017). Se han demostrado aumentos en la carga microbiológica de los productos después de ser expuestos a aguas de lavado de instalaciones comerciales en lugar de observar una disminución (Grudén *et al.*, 2016). Esto quiere decir que, si el proceso no se realiza de manera

adecuada, el agua de lavado se convierte en una fuente de contaminación y no de desinfección, por lo que el correcto monitoreo y registro de los parámetros de desinfección realizados en las plantas de producción, es un componente esencial de los programas de inocuidad y calidad postcosecha (Suslow, 2017).

Teóricamente, la contaminación cruzada puede darse por 3 mecanismos: por contacto directo de producto con producto, por agua o por partículas en el agua. En la contaminación por agua se cree que los microorganismos patógenos lavados de las superficies de las hojas contaminadas se transfieren al agua y luego se adhieren a otras hojas. En la contaminación por las partículas en el agua, se cree que estas ya están presentes en el agua de lavado y luego se adhieren a las hojas y las contaminan. Estos dos últimos posibles mecanismos de transmisión representan un problema ya que se cree que la efectividad de los antimicrobianos sobre pequeñas partículas es menor (Gombas *et al.*, 2017).

La acumulación de materia orgánica en los tanques de lavado, conforme pasan los ciclos de lavado, es de las grandes limitaciones de este proceso. La materia orgánica brinda protección física a los patógenos humanos contra los desinfectantes, pero también resulta en la neutralización de la acción antimicrobiana (Shen *et al.*, 2013). Seguido a esto, puede darse el proceso de infiltración de microorganismos en el producto. Las barreras físicas como la corteza o la piel del vegetal no necesariamente previenen la infiltración de los microorganismos, ya que aquellos presentes en el agua de lavado son capaces de internalizarse bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, cuando el producto caliente se sumerge en agua a menor temperatura, la diferencia de presión entre el producto y el agua permite que los patógenos lleguen al interior del alimento (Li *et al.*, 2008). Asimismo, si el producto presenta algún tipo de corte, la contaminación presente en su superficie puede ser internalizada, haciendo que los patógenos se protejan del estrés impuesto durante las etapas postcosecha, especialmente las relacionadas con el lavado y desinfección (Sivapalasingam *et al.*, 2004).

Cuanto más tiempo sobreviva el patógeno en el agua de lavado, mayor será la probabilidad de que ocurra contaminación cruzada. La supervivencia del patógeno y su inactivación dependen de factores microbiológicos como el tipo de patógeno, el tamaño de

la población y el estado fisiológico en que se encuentre, mientras que, la velocidad hipotética en que puede pasar de una hoja a otra es afectada por la agitación del agua de lavado (determinada por el diseño del equipo), la distancia entre las hojas, y quizás por otros factores que aún están en estudio (Gombas *et al.*, 2017).

#### 3.4.2 Enfermedades de transmisión alimentaria en productos frescos

*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. y *Staphylococcus aureus* han sido documentados como formadores de biopelículas en alimentos y superficies en contacto con estos. La presencia de estos biofilms actúa como reservorio de contaminación microbiológica y representa un alto riesgo en la línea de producción, especialmente en el caso de las bacterias patógenas. *L. monocytogenes*, por ejemplo, ha demostrado ser resistente al cloro y al peróxido de hidrógeno conforme el tiempo de maduración de su biofilm aumenta (Aryal y Muriana, 2019).

Los brotes causados por enfermedades de transmisión alimentaria son comunes en la industria de productos frescos. En hortalizas que crecen cerca del suelo como el repollo, patógenos como *E. coli* O157:H7 pueden llegar a la superficie del vegetal si el agua o los suelos se encuentran contaminados por animales portadores (Sivapalasingam *et al.*, 2004).

Del 2014 al 2018, la CDC reportó un total de 51 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos relacionados a vegetales de hoja verde, 5 de los cuales requirieron de una advertencia pública a los consumidores. Igualmente, entre el 2019 y el 2021, se detectaron 9 brotes de este tipo, 6 relacionados con ensaladas empacadas (CDC, 2022a). En el año 2020 la CDC reportó 690 casos de consumidores afectados por *Cyclospora* vinculada con repollo y lechuga contaminados con el parásito (Food Safety News, 2020). No obstante, las enfermedades reportadas representan solamente una parte de las enfermedades causadas por el consumo de vegetales de hoja verde contaminados (CDC, 2022a).

En 1981 en Nueva Escocia, 42 personas se vieron infectadas después de consumir una ensalada de repollo contaminada. La problemática se generó porque el repollo utilizado

para la ensalada fue cosechado de campos fertilizados con estiércol de oveja de una granja con un historial de listeriosis ovina; 34 de los casos fueron mujeres embarazadas. De los bebés nacidos vivos, 27% murieron más tarde. Este brote proporcionó la primera evidencia convincente de que la listeriosis podría ser una enfermedad transmitida por los alimentos y destacó el potencial de las hortalizas crudas para ser una fuente de infección (Schoder, 2016).

En diciembre del 2021 la FDA y la CDC investigaron un brote de infecciones por *L. monocytogenes* relacionado con ensaladas envasadas, incluyendo varias ensaladas de repollo. Un total de 18 personas resultaron infectadas, 16 hospitalizadas y 3 de ellas fallecieron (FDA, 2021). Para julio del 2022, la misma empresa nuevamente debió retirar varias de sus ensaladas del mercado por una recontaminación en planta (FDA, 2022c).

### 3.5. DESINFECTANTES DE PRODUCTO FRESCO

A la hora de elegir un desinfectante para producto fresco se deben tomar en cuenta una serie de factores. En primer lugar, el químico antimicrobiano debe tener un amplio espectro de efectividad contra peligros comunes en el producto, posteriormente se debe verificar la estabilidad antimicrobiana, los efectos sobre la calidad y las cualidades del producto, la seguridad de los trabajadores, los efectos corrosivos sobre el equipo, el tratamiento de aguas y el impacto ambiental (Gombas *et al.*, 2017).

La vida útil y la calidad microbiológica de los productos frescos dependen en gran medida del lavado y la desinfección. El lavado con agua potable puede eliminar contaminaciones físicas en cierta medida, pero no es capaz de inactivar algunos microorganismos. En su lugar, los agentes de desinfección son necesarios para eliminar microorganismos patógenos y de deterioro presentes en la superficie del producto. Para alcanzar la reducción estimada, el producto químico debe ser usado a la concentración requerida y debe ser aplicado durante un período de tiempo predeterminado. La eficacia de estos desinfectantes se basa entonces en su capacidad para reducir el nivel de contaminación

microbiana (Joshi *et al.*, 2013). Sin embargo, la mayoría de los agentes desinfectantes logran reducir las poblaciones microbianas 2 o 3 log en los mejores casos (Gil *et al.*, 2009).

### 3.5.1. El cloro como desinfectante

El cloro es el químico antimicrobiano más comúnmente usado en el proceso de lavado de producto fresco. Se ha reportado que el mantener una concentración de 5 a 10 ppm de cloro libre es suficiente para inactivar patógenos en agua de lavado (Huang *et al.*, 2020). Entre las ventajas de su uso están su bajo costo, su facilidad de implementación y los numerosos estudios que han demostrado una reducción de 1 – 2 log de las poblaciones microbianas al someter los productos a una desinfección con cloro (FAO y WHO, 2008).

Aunque su mecanismo exacto de acción es aún estudiado, se tienen varias posibles razones para la inactivación de los microorganismos: la oxidación de las enzimas y aminoácidos, la pérdida del contenido intracelular, el descenso en la absorción de nutrientes, la inhibición de la síntesis de proteínas, la oxidación de los componentes necesarios para la respiración, la ruptura de ADN o la represión de la síntesis de este (CDC, 2008).

En operaciones de desinfección de productos vegetales, generalmente se usan concentraciones de 100 a 200 ppm de cloro. Se recomienda comenzar con concentraciones de 100 ppm, para así poder aumentar la cantidad de cloro en disolución, a medida que el agua se contamina con restos de vegetales y esporas suspendidas (López, 2003), ya que la concentración máxima permitida por la FDA es de 200 ppm (FDA, 2022b).

La eficacia del cloro para prevenir la contaminación cruzada y reducir la carga microbiológica al sumergir el producto o por aspersión, depende del cloro libre, el pH y la carga de materia orgánica (FAO y WHO, 2008). El cloro interactúa con componentes orgánicos e inorgánicos, formando subproductos de desinfección que tienen solamente un porcentaje de la actividad antimicrobiana reportada para el cloro libre. El agotamiento del cloro libre en los tanques de lavado se atribuye a la dispersión de contaminación entre diferentes lotes de producto (Murray, 2017). Especialmente al desinfectar producto que ha

sido cortado, la liberación de exudados y la adherencia de las bacterias, reduce su efectividad (FAO y WHO, 2008).

### 3.5.2 El peróxido de hidrógeno como desinfectante

El mecanismo de acción del peróxido de hidrógeno se atribuye a su caracterización como un agente oxidante reactivo con las biomoléculas como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, etc. que componen la estructura celular de los microorganismos. Por lo tanto, la mayoría de los estudios que lo han investigado, lo consideran una fuente de estrés oxidativo en la célula y se ha demostrado que específicamente para *E. coli*, el daño a la membrana celular ante la exposición a peróxido de hidrógeno representa un rol fundamental en su proceso de inactivación (Linley *et al.*, 2012).

El peróxido de hidrógeno no produce gases tóxicos y es una alternativa amigable con el ambiente en comparación con el cloro, ya que se descompone como oxígeno y agua y no forma subproductos cancerígenos (Van Haute *et al.*, 2015).

Por otra parte, un parámetro indeseado del peróxido es que en aguas de desinfección se necesitan altas concentraciones y tiempos de contacto para lograr una reducción microbiana (Van Haute *et al.*, 2015). Concentraciones entre 2,5% y 5% (25 000 ppm y 50 000 ppm) han sido aprobadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria o EFSA por sus siglas en inglés, como protección fungicida y bactericida de equipo de cortado de vegetales y algunas semillas (EFSA, 2016). Sin embargo, la FDA fija una concentración máxima de 59 ppm en agua de desinfección de alimentos (FDA, 2022a).

### 3.5.3 El ácido peracético como desinfectante

El ácido peracético se produce a partir de la reacción de ácido o anhídrido acético con peróxido de hidrógeno en presencia de ácido sulfúrico, el cual funciona como agente

catalizador. Su método de acción se da gracias a la producción de especies reactivas con el oxígeno, las cuales dañan los lípidos y el ADN; además, causa la desnaturalización de las proteínas y enzimas, la interrupción de los sistemas de transporte y permeabiliza las paredes celulares (Vandekinderen *et al.*, 2009).

Se recomienda su uso en concentraciones menores a 80 ppm por un tiempo de contacto de 1 min para lograr un 99,999% de muerte bacteriana (Gawande *et al.*, 2013). Se ha demostrado que este es capaz de inactivar bacterias Gram positivas y negativas, así como mohos y levaduras en menos de 5 min, en concentraciones menores a los 100 ppm, sin embargo, en presencia de materia orgánica se podrían requerir hasta 500 ppm de concentración para lograr este objetivo (CDC, 2008). En agua de lavado, la FDA establece una concentración máxima de 80 ppm de este desinfectante (FDA, 2022a), por lo que los estudios sobre su efecto en esta concentración son necesarios para comprobar su aplicabilidad en la industria.

#### 3.5.4 Proceso de validación de una desinfección

Para el diseño de la validación de un desinfectante, se toma en cuenta el microorganismo objetivo, el método de preparación del inóculo, el procedimiento y el nivel de inoculación, las consideraciones de muestreo y la interpretación de los resultados de las pruebas. Cada una de estas es específica para el producto, el proceso y el objetivo general del estudio (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2010).

El validar un proceso en que un agente químico proporciona cierto grado de letalidad contra un microorganismo objetivo o un grupo de estos, es una parte esencial en la industria alimentaria para garantizar la calidad e inocuidad de los productos. El éxito de una prueba de validación microbiológica depende de factores relacionados con la manera en que el producto se produce o formula, se empaca, se distribuye y se consume. Además, se debe considerar si el producto es susceptible al crecimiento de microorganismos de deterioro o patógenos específicos según los registros existentes (IFT, 2003).

En la industria de alimentos se utilizan microorganismos indicadores, cuya presencia en números que superan determinados límites numéricos, indica la posible aparición de patógenos, la calidad microbiológica del alimento, la vida útil de este o su calidad sanitaria o higiene general. *E. coli* se ha utilizado como indicador de contaminación fecal y como indicador de higiene e inocuidad alimentaria (Halkman y Halkman, 2014). Debido a su alta resistencia a los agentes desinfectantes, se ha utilizado como indicador de contaminación en agua; si las condiciones son desfavorables para la presencia de esta bacteria, la presencia de otros patógenos es poco probable (Fallahzadeh *et al.*, 2021). Incluso se ha demostrado que tiene una respuesta similar a *Salmonella enteritidis*, por lo que podría utilizarse como indicador de la posible presencia de esta bacteria después de un proceso de limpieza y desinfección (Dewaele *et al.*, 2011), así como se ha demostrado que funciona como indicador fiable para evaluar la calidad de los desinfectantes y antisépticos utilizados contra el COVID-19 (Fallahzadeh *et al.*, 2021).

Cuando se llevan a cabo estudios de reducción como lo es el evaluar la acción de los agentes desinfectantes, se suele inocular un gran número de microorganismos, por ejemplo, de 6 a 7 log UFC/g para cuantificar a los sobrevivientes y/o documentar altos niveles de inactivación. Las reducciones logarítmicas deben determinarse en ensayos replicados. La reducción deseada podría depender de la norma o ley que se aplique al producto o al método utilizado (Scott *et al.*, 2005).

En Europa, la norma europea (EN) 14885:2018 proporciona referencias a los métodos de ensayo requeridos que deben utilizar los fabricantes de desinfectantes para respaldar las afirmaciones de actividad microbiciada. En Estados Unidos, existe el “Product Performance Test Guideline OCSPP 810.2100” que es la Directriz OCSPP 810.2100 de la Agencia de Protección Ambiental o EPA, por sus siglas en inglés, sobre las pruebas de rendimiento de los productos, donde se detallan los métodos de ensayo de la AOAC que deben utilizar los fabricantes de desinfectantes para respaldar las afirmaciones de actividad microbiciada (ECOLAB, 2020).

Los diferentes métodos de ensayo utilizan inóculos iniciales (microorganismos), reducciones logarítmicas y tiempos de contacto específicos (ECOLAB, 2020). Sin embargo,

cuando no exista ninguna norma de rendimiento, la menor reducción lograda debería de superar el nivel de contaminación esperado en una cantidad que incorpore un margen de seguridad (a menudo se utiliza un margen de 2 log) consistente con la variabilidad esperada en el producto y el proceso (Scott *et al.*, 2005).

Dentro de las categorías de métodos de suspensión, EPA describe cómo evaluar la acción reductora de un desinfectante mediante el método 960.09 de la AOAC, el cual demanda que se logre una reducción de 5 log para que un agente desinfectante en contacto con alimentos se considere efectivo (EPA, 2019). Asimismo, la Comisión Europea de Estandarización (CEN), establece en diferentes normas que los agentes desinfectantes deben lograr una reducción de al menos 5 log para considerarse un desinfectante válido (Sandle, 2020). Sin embargo, la revisión realizada por Barrera *et al.* (2012) de previos estudios que buscaron validar los métodos de lavado postcosecha por medio de una reducción de 5 log después de inocular un patógeno de interés, denotó que, en condiciones comerciales, la reducción real era de 1 a 2 log sin importar el desinfectante o el tiempo de contacto utilizado (Barrera *et al.*, 2012).

Actualmente, una reducción de 3 log es reconocida como efectiva para reducir las bacterias adheridas a las superficies de producto fresco por medio de desinfectantes (Chang, 2015). Incluso, la FDA en su "Guía para minimizar los peligros microbianos contra la inocuidad alimentaria de frutas y verduras frescas", establece que los tanques de lavado para producto fresco reducen las poblaciones microbianas de 2 a 3 log y que se deben adoptar prácticas para mantener esta eficiencia (FDA, 2018).

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO**

Los análisis microbiológicos fueron realizados en el laboratorio de microbiología del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y en el laboratorio de microbiología de la Escuela de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, Sede Rodrigo Facio, San Pedro, Montes de Oca.

Los objetivos planteados en este proyecto se realizaron con base en la línea de producción del repollo que lleva a cabo uno de los Centros Agrícolas de Cartago. Esto quiere decir, que el primer y el segundo objetivo fueron desarrollados en colaboración con su principal finca proveedora de repollo. El primer objetivo se llevó a cabo en agosto 2021 (tres semanas consecutivas), el segundo objetivo en noviembre 2021 (tres semanas consecutivas) y el tercer objetivo entre setiembre y octubre 2021 (tres semanas consecutivas).

Tanto la finca, como su respectiva planta empacadora (las cuales preparan el repollo antes de ser llevado al Centro Agrícola), se localizan en el cantón de Pacayas, mientras que el Centro Agrícola que lo recibe, se localiza en el cantón de Cervantes; todos parte de la provincia de Cartago.

### **4.2 COMPARACIÓN DE LA CALIDAD DEL REPOLLO RECIÉN COSECHADO, SEGÚN LOS RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO EN TRES ZONAS DE DISTINTA ALTITUD DE LA FINCA ESTUDIADA**

#### **4.2.1 Entrevista con el proveedor**

Al proveedor se le realizó una entrevista sobre las prácticas de cultivo y cosecha que se practican dentro de la finca, con el propósito de conocer la metodología utilizada y la aplicación o no aplicación de las buenas prácticas agrícolas, según la herramienta de

evaluación diseñada para este propósito (Anexo I). Además, en esta misma evaluación, se anotaron las observaciones relevantes durante las posteriores visitas a la finca productora, en las cuales se llevó a cabo el muestreo descrito a continuación.

#### 4.2.2 Muestreo de repollos recién cosechados

De la finca localizada en Pacayas, se hizo un muestreo de los repollos listos para ser cosechados, no desinfectados. La finca se dividió en tres zonas según su altitud: zona alta, zona media y zona baja. Adaptando la metodología sugerida por Jiménez (2009) para el muestreo de un campo agrícola, se contó el número de hileras de repollo de toda la finca y se dividió entre 3. Se contabilizaron un total de 96 hileras de repollo en toda la extensión de la finca estudiada.

Consecuentemente, la zona alta, la zona media y la zona baja estuvieron conformadas por un total de 32 hileras cada una, que a su vez, contenían entre 100 y 120 repollos por hilera. Una vez realizada la delimitación, igualmente se procedió a la selección de muestras según Jiménez (2009), donde el repollo extraído correspondía a aquel encontrado en el número de hilera y en la posición coincidente con números aleatorios previamente establecidos; para cada zona se seleccionó 3 veces un número al azar entre 1 y el total de hileras, y un número al azar entre 1 y el total de repollos de dicha hilera. Por ejemplo, si se supone que los números al azar fueron 2 y 17, 5 y 13, y 9 y 4, se seleccionaron el repollo 17 de la hilera 2, el repollo 13 de la hilera 5 y el repollo 4 de la hilera 9.

Las cabezas de repollo deben cortarse cuando estén compactas, firmes y de color característico, de manera que el producto pueda ser comprimido levemente, por consiguiente, todo producto que presente daños por plagas, enfermedades, daño mecánico, etc. deberá ser rechazado (Rikolto, 2019). Según este parámetro, si la metodología indicaba que el repollo a muestrear correspondía con un repollo no conforme con los estándares de calidad, se volvieron a elegir dos números al azar (hilera y posición) hasta que fuera una muestra que cumpliera con los estándares de calidad de un repollo comercial.

Los 3 repollos de cada una de las altitudes se analizaron como una muestra compuesta. La toma de cada repollo se realizó utilizando guantes de látex estériles de manera que no se alterara la microbiota presente. Las muestras fueron empacadas en bolsas plásticas identificadas con etiquetas adhesivas, cerradas apropiadamente para impedir la contaminación con agentes externos (Andrews y Hammack, 2022). De la misma forma, para controlar la temperatura y evitar la exposición a rayos solares, las muestras fueron transportadas en hielera, con hielo almacenado en bolsas en su parte inferior, seguido de una rejilla plástica donde se colocaron las muestras (evitando el contacto directo del hielo con las muestras), de manera que la temperatura se conservó entre 4 y 8 °C hasta el momento de llegada al laboratorio (ICA, 2019).

#### 4.2.3 Análisis microbiológicos

##### 4.2.3.1 Recuento de coliformes totales y *E. coli*

Se realizó el recuento de coliformes totales y *E. coli* por el método de Petrifilm, para evaluar el cumplimiento de BPA y BPM, así como la presencia de materia fecal en los repollos recién cosechados, de acuerdo con el procedimiento P-SA-MM-008 del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), basado en el Método 991.14 Coliform and Escherichia coli Counts in Foods de la AOAC (2005) y Recuento de *E. coli* y Coliformes Totales de PETRIFILM 3M (2000).

##### 4.2.3.2 Recuento de mohos y levaduras

Se realizó el recuento de mohos y levaduras, como indicador de deterioro del repollo, de acuerdo con el procedimiento P-SAMM-007 del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), basado en la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, el Bacteriological Analytical Manual Chapter 18: Yeasts, Molds and Mycotoxins de Tournas *et al.*, (2001), el Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods de

Salfinger y Tortorello (2015) y en el Microbiological Examination Methods of Food and Water de Da Silva *et al.* (2013).

#### 4.2.3.3 Recuento total aerobio mesófilo

Se realizó el recuento total de aerobios mesófilos como indicador de la calidad microbiológica general del repollo, de acuerdo con el procedimiento P-SA-MM-001 del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), basado en el Bacteriological Analytical Manual Chapter 3: Aerobic Plate Count, de Maturin y Peeler (2001), el Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods de Salfinger y Tortorello (2015) y en el Microbiological Examination Methods of Food and Water de Da Silva *et al.* (2013).

#### 4.2.3.4 Análisis de *Listeria monocytogenes*

Se realizó la prueba de presencia / ausencia de la bacteria *L. monocytogenes* de acuerdo con el procedimiento P-SA-MM-021 del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), basado en las instrucciones de trabajo del Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods de Salfinger y Tortorello (2015), del Bacteriological Analytical Manual Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods de Hitchins *et al.*, (2001) y del kit API *Listeria* sp. de Biomerieux (2010). Este último, es un método de identificación simplificado y estandarizado que permite interpretar los resultados de un perfil bioquímico completo a los que se somete la bacteria aislada, para así reconocer la especie según la información almacenada en una extensa base de datos (BioMérieux, s.f.). Por lo tanto, si el género *Listeria* sp. es identificado, la confirmación bioquímica por medio del API *Listeria* permitirá identificar si es *L. monocytogenes* como tal o si es otra especie de este mismo género.

#### 4.2.3.5 Selección de un microorganismo indicador

Para finalizar el análisis microbiológico de este objetivo, se seleccionó el recuento con las mayores cargas microbiológicas para funcionar como microorganismo indicador en el apartado 4.3.4 correspondiente al segundo objetivo.

#### 4.2.4 Diseño experimental y análisis estadístico

Con el fin de evaluar las muestras de repollo cosechadas en tres zonas de distinta altitud de la finca, se utilizó un diseño de bloques al azar de un factor (la zona de la finca estudiada) y tres niveles (zona alta, zona media y zona baja de la finca). Se realizaron 3 repeticiones independientes, siendo cada una de ellas el muestreo que se realizó cuando se visitó la finca.

Las visitas se realizaron en un período de dos meses y se consideraron las condiciones climáticas de ese período (estación lluviosa y principios de la estación seca) ya que podrían influir en los resultados. Sin embargo, cada una de las visitas corresponde a un bloque, de manera que el diseño impide que la variabilidad de las condiciones ambientales de la finca en su respectivo día de muestreo influya. Así, predomina en los resultados la diferencia de las cargas entre cada altitud y no entre cada día de muestreo.

Las variables respuesta fueron el recuento total aerobio, recuento de mohos y levaduras, recuento de coliformes totales, recuento de *E. coli* y la presencia o ausencia de *L. monocytogenes*. Los datos de los recuentos fueron estudiados estadísticamente por medio de un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar si existían diferencias significativas entre los recuentos obtenidos de los repollos en las diferentes zonas. Para la prueba de ausencia / presencia de *L. monocytogenes*, al no detectar su presencia no se realizó el análisis estadístico.

Para todos los análisis se trabajó con un nivel de significancia de 0,05 y con el paquete estadístico JMP 9®. Para efectos no significativos se reportó la potencia de la prueba.

### 4.3 EVALUACIÓN DE LA REDUCCIÓN DEL INDICADOR MICROBIOLÓGICO SELECCIONADO EN EL REPOLLO, ANTES Y DESPUÉS DE CADA UNA DE LAS ETAPAS DE DESINFECCIÓN

#### 4.3.1 Selección de un microorganismo indicador

Según los resultados del apartado 4.2.3.5 se seleccionó el recuento total aerobio como indicador microbiológico, ya que, al ser el recuento más alto, se consideró como el más apto para ver una reducción de este después de los procesos desinfección, según su grado de efectividad.

#### 4.3.2 Descripción de las etapas de desinfección del repollo y recolección de datos.

Durante la primera etapa de la cadena de producción del repollo, este se cosecha y se lleva inmediatamente a la planta empacadora de la finca, donde es inmerso en una tina de desinfección. Esta tina se prepara agregando 300 mL de cloro comercial al 4% en 200 L de agua potable para una concentración de 60 ppm de cloro. El repollo permanece en esta por aproximadamente 10 min, para luego ser transportado al Centro Agrícola. En la segunda etapa, el Centro Agrícola recibe el repollo del proveedor y lo somete a un segundo proceso de desinfección, para el cual se depositan 2 mL de un desinfectante comercial al 2,5% de peróxido de hidrógeno por cada litro de agua adicionado. Esto equivale a una concentración de 50 ppm de peróxido de hidrógeno en el tanque de desinfección, durante un tiempo de 1 – 2 min. Posteriormente, el repollo se corta, se ralla y se somete a un tercer proceso de desinfección por inmersión con cloro comercial al 6%, donde se combina una igual cantidad de mililitros de cloro que de litros de agua para una concentración final de 60 ppm de cloro, por un tiempo de 5 min aproximadamente. Finalmente, el repollo es empacado y almacenado en refrigeración (4 °C a 8 °C) hasta el momento de su transporte.

Cada uno de estos tratamientos fue estudiado para el cumplimiento del objetivo. Además, durante las visitas de muestreo descritas a continuación, se utilizó la herramienta

evaluativa de las buenas prácticas de manufactura (Anexo II), la cual se completó mediante entrevistas a los encargados de cada etapa y observaciones de los procesos.

#### 4.3.3. Muestreo de repollos sometidos a diferentes procesos de desinfección

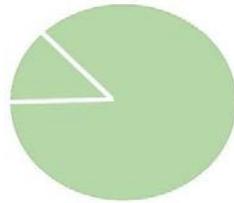
Como se mencionó anteriormente, el repollo del Centro Agrícola es sometido a tres procesos de lavado y desinfección desde la cosecha hasta que se empaca; por lo tanto, se realizó un muestreo del repollo antes y después de ser sometido a cada uno de los métodos de desinfección, con el propósito de valorar el efecto de cada uno de estos. Las condiciones de cada etapa se muestran en el cuadro I a continuación.

**Cuadro I.** Condiciones en las que se realiza cada uno de los procesos de desinfección durante la cadena de obtención del repollo mínimamente procesado del Centro Agrícola estudiado.

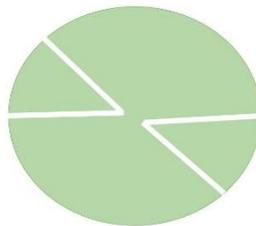
<b>Proceso de desinfección</b>	<b>Desinfectante utilizado</b>	<b>Concentración del desinfectante (ppm)</b>	<b>Tiempo de contacto (min)</b>	<b>Temperatura (° C)</b>	<b>pH del agua</b>
<b>1</b>	Cloro	60	10	No se controla	6-7
<b>2</b>	Peróxido de hidrógeno	50	1-2	No se controla	6-7
<b>3</b>	Cloro	60	5	No se controla	6-7

Para efectuar las pruebas, mientras se monitoreó la temperatura del agua que se encontraba a temperatura ambiente, se tomaron tres muestras de distintos repollos antes y después de cada uno de los procesos de desinfección. En el caso de los dos primeros procesos, los repollos a muestrear eran enteros, por lo que se hizo un corte al lado izquierdo del repollo con un cuchillo estéril (aproximadamente 50 g) antes de la desinfección, como se muestra en la figura 2. Posterior a la desinfección, se hizo otro corte al lado derecho del mismo repollo (aproximadamente 50 g) como se muestra en la figura 3. Con el primer corte (figura 2), se

obtuvo la carga inicial del repollo previo a su proceso desinfectante y con el segundo corte (figura 3), se evitó que se recolectara una muestra donde el alcance del desinfectante haya sido mayor al alcance que se tiene en un repollo compacto normal entero después del proceso de desinfección.



**Figura 2.** Corte que se realizó al repollo entero antes del proceso de desinfección.



**Figura 3.** Corte que se realizó al repollo entero después del proceso de desinfección.

En el caso del último proceso, se tomaron tres muestras distintas del repollo rallado para hacer una muestra compuesta, antes y después de su desinfección (50 g aproximadamente).

Las muestras fueron recolectadas en la planta empacadora de la finca y en el Centro Agrícola. Con esta metodología se pretende considerar todas las posibles contaminaciones que pueden darse dentro de la planta, cuando el repollo pasa de una operación a otra.

Para la toma de muestras se utilizaron guantes de látex estériles de manera que no se alterara la microbiota presente. Posteriormente, estas fueron empacadas en bolsas plásticas identificadas con etiquetas adhesivas, cerradas apropiadamente para impedir la contaminación con agentes externos (Andrews y Hammack , 2022). De la misma forma, para controlar la temperatura y evitar la exposición a rayos solares, las muestras fueron

transportadas en hielera, con hielo almacenado en bolsas en su parte inferior, seguido de una rejilla plástica donde se colocaron las muestras (evitando el contacto directo del hielo con las muestras), de manera que la temperatura se conservara entre 4 y 8 °C hasta el momento en que llegara al laboratorio (ICA, 2019).

#### 4.3.4. Análisis microbiológicos

Para realizar el análisis microbiológico, se siguió el mismo procedimiento descrito en el punto 4.2.3.3. para el recuento total aerobio mesófilo.

#### 4.3.5. Diseño experimental y análisis estadístico

Para este objetivo se realizó una estimación por intervalo al 95%, reportando promedio e intervalo de confianza de la reducción en la carga microbiológica alcanzada del recuento total aerobio como microorganismo indicador para cada una de las 3 etapas de desinfección. Con base en la magnitud de la reducción observada y las metas establecidas, se determinó si cada uno de los procesos de desinfección contribuía con la calidad final del producto.

Se realizaron tres repeticiones independientes del experimento, representadas cada una de ellas por muestreo, el cual se ejecutó en las visitas a la planta empacadora de la finca y al Centro Agrícola donde se realizan los procesos.

El cálculo de la reducción microbiológica alcanzada (RMA), se hizo mediante la sustracción de la carga microbiológica del repollo después del proceso de desinfección (CB), a la carga microbiológica del repollo antes del proceso de desinfección (CA) como se muestra en la siguiente fórmula:

$$CA (\log) - CB (\log) = RMA (\log)$$

Seguidamente, se realizó el análisis del límite inferior del intervalo de confianza, comparándolo con la referencia, tomando como parámetro que una reducción de 3 log es

reconocida como efectiva para reducir las bacterias adheridas a superficies de producto fresco por medio de desinfectantes (Chang, 2015).

#### 4.4 COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE TRES DESINFECTANTES DISTINTOS DURANTE TRES TIEMPOS DE CONTACTO, POR MEDIO DE LA REDUCCIÓN EN EL RECUENTO DE *E. coli* INOCULADO EN EL REPOLLO

##### 4.4.1 Muestreo de repollos para valorar la efectividad de 3 agentes desinfectantes

Se realizaron 3 visitas finales a la finca. En cada visita se tomaron repollos al azar listos para cosechar no desinfectados, utilizando el método de muestreo del objetivo 1 como una forma de garantizar la aleatoriedad, pero sin considerar el efecto de la altitud. La toma de cada repollo se realizó con guantes de látex estériles de manera que no se alterara la microbiota presente. Las muestras fueron empacadas en bolsas plásticas identificadas con etiquetas adhesivas, cerradas apropiadamente para impedir la contaminación con agentes externos (Andrews y Hammack , 2022).

De la misma forma, para controlar la temperatura y evitar la exposición a rayos solares, las muestras fueron transportadas en hielera con hielo almacenado en bolsas en su parte inferior, seguidas de una rejilla plástica donde se colocaron las muestras (evitando el contacto directo del hielo con las muestras), de manera que la temperatura se conservó entre 4 y 8 °C hasta el momento en que llegaron al laboratorio (ICA, 2019).

##### 4.4.2 Descripción de los tratamientos de desinfección evaluados

Los repollos recolectados, después de ser inoculados con la cepa *E. coli*, fueron utilizados para valorar la efectividad de 3 desinfectantes distintos a la concentración máxima recomendada o establecida: 50 ppm de peróxido de hidrógeno por recomendación del fabricante, 200 ppm de cloro y 80 ppm de ácido peracético como valores máximos permitidos

(FDA, 2022b; FDA, 2022a), tomando en cuenta que una concentración mayor no sería aplicable a un proceso industrial y una concentración menor no permitiría ver la máxima capacidad del agente.

Se partió del tiempo mínimo recomendado a la máxima concentración de cada desinfectante y se añadieron dos tiempos de contacto mayores. En el caso del peróxido de hidrógeno y del ácido peracético, el tiempo de contacto recomendado a su máxima concentración es de 1 min, por lo que adicionalmente se probaron tiempos de contacto de 5 y 10 min. Para el cloro, el tiempo recomendado es de 5 min, por lo que los otros tiempos fueron de 10 y 15 min. Además, se evaluó un control negativo de proceso con solamente agua a los mismos tiempos de contacto, con el fin de determinar si existía efecto de arrastre por parte del agua. Estas condiciones se describen en el cuadro II a continuación.

**Cuadro II.** Diseño experimental para el análisis de la reducción de la carga microbiológica alcanzada en el recuento de *E. coli*. para comparar la eficacia del agua potable (tratamiento control), del peróxido de hidrógeno a 50 ppm, del cloro a 200 ppm y del ácido peracético a 80 ppm durante tres tiempos de contacto.

<b>Tratamiento</b>	<b>Desinfectante y concentración</b>	<b>Tiempo de contacto (min)</b>
1	Agua potable (tratamiento control)	1
2	Agua potable (tratamiento control)	5
3	Agua potable (tratamiento control)	10
4	Peróxido de hidrógeno – 50 ppm	1
5	Peróxido de hidrógeno – 50 ppm	5
6	Peróxido de hidrógeno – 50 ppm	10
7	Cloro – 200 ppm	5
8	Cloro – 200 ppm	10
9	Cloro – 200 ppm	15
10	Ácido peracético – 80 ppm	1
11	Ácido peracético – 80 ppm	5
12	Ácido peracético – 80 ppm	10

#### 4.4.3. Inoculación y análisis microbiológicos

##### 4.4.3.1 Preparación del inóculo de *E. coli* ATCC 25922

Se llevó a cabo la inoculación de *E. coli* ATCC 25922 en los repollos. Se preparó el inóculo colocando una colonia aislada de *E. coli* en 5 ml de caldo tripticasa soya (CTS), el cual se incubó a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por  $5 \pm 1$  hora. Posteriormente, se trasvasaron más de 100 mL de CTS a un erlenmeyer que se incubó a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por  $18 \pm 2$  h con agitación a 200 rpm para así obtener un inóculo en fase estacionaria (Usaga *et al.*, 2014).

##### 4.4.3.2 Inoculación del repollo con *E. coli* ATCC 25922

Al preparar el tanque de inmersión, se inoculó agua desionizada con una población aproximada de 7 log UFC/mL de *E. coli* (agregando 98 mL de inóculo al tanque de 7 L de agua desionizada) y se tomó la temperatura inicial. Al sumergir el repollo a inocular, este permaneció un tiempo de 30 min, tal como se hizo en un estudio del 2018 para la inoculación de otros vegetales. Después, los repollos enteros inoculados fueron secados al aire (Gullian y Sánchez, 2018).

Seguidamente, las muestras fueron sometidas al proceso de desinfección respectivo. En este, para mantener la proporción de repollos en agua similar a la proporción usada en la desinfección del Centro Agrícola (300 kg de repollo en 200 L de agua), se utilizó una tina de 10 L de capacidad, donde se colocaron 3 kg de repollo (de 2 a 3 repollos aproximadamente) en 2 L de agua desionizada. Los repollos fueron agitados dentro de la tina para que toda la superficie de los mismos estuviera en contacto con el desinfectante durante el tiempo de contacto.

Por la naturaleza del estudio, fue necesario que en cada repetición existiera un control negativo y uno positivo de repollos (Gullian y Sánchez, 2018). El control negativo se usó para determinar la posible población inicial de *E. coli* en el repollo (este repollo no se inoculó y solamente se le realizó recuento). Los resultados por debajo del límite de cuantificación de la técnica se consideraron despreciables en comparación con lo inoculado. Por otra parte, el control positivo se usó para determinar la carga real inicial que se inoculó (este repollo no se

sometió a un proceso de desinfección y se le realizó el recuento después de ser inoculado y secado).

#### 4.4.3.3 Recuento de *E. coli* ATCC 25922

Con el fin de evaluar la efectividad de los desinfectantes a distintos tiempos de contacto se realizó el recuento de *E. coli* en agar MacConkey antes y después de cada proceso de desinfección de los repollos.

Esto se hizo según el procedimiento descrito en el Bacteriological Analytical Manual Chapter 3: Aerobic Plate Count, de Maturin y Peeler (2001) para el recuento total aerobio, adaptándolo al uso de agar MacConkey para contabilizar las colonias de *E. coli* específicamente (Maturin y Peeler, 2001)

#### 4.4.4 Diseño experimental y análisis estadístico

Una vez determinada la carga inicial de *E. coli* inoculado, por medio de los resultados de los controles positivos y negativos en cada repetición, se procedió a realizar el cálculo de la reducción microbiológica alcanzada (RMA) para cada proceso de desinfección. Este se hizo mediante la sustracción de la carga microbiológica del repollo después del proceso de desinfección (CB), a la carga microbiológica del repollo inicial (CI) como se muestra en la siguiente fórmula:

$$CI (log) - CB (log) = RMA (log)$$

Se realizaron tres repeticiones independientes del experimento (representadas cada una de ellas por muestreo). Los repollos fueron recolectados de la misma finca del proveedor para luego recrear los procesos de desinfección a nivel de laboratorio. Con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre las reducciones logarítmicas logradas por los tratamientos, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), con un nivel de significancia de 0,05 y con el paquete estadístico JMP 9®. Para efectos no significativos se

reportó la potencia de la prueba. En caso de haber diferencias significativas, se realizó una prueba de Tukey.

Además, se indicó cuál de los desinfectantes es más efectivo según los parámetros relevantes para el ente que realice la desinfección (tiempo de operación, costos del desinfectante o una mayor reducción microbiológica), considerando que una reducción de 3 log es reconocida como efectiva para reducir las bacterias adheridas a superficies de producto fresco por medio de desinfectantes (Chang, 2015).

## 5. RESULTADOS y DISCUSIÓN

### 5.1 COMPARACIÓN DE LA CALIDAD DEL REPOLLO RECIÉN COSECHADO EN TRES ZONAS DE DISTINTA ALTITUD DE LA FINCA ESTUDIADA.

De los repollos recolectados de la finca, se analizó el recuento total aerobio (RTA), el recuento de mohos y levaduras (RMYL), el recuento de coliformes totales (RCT) y el recuento de *E. coli*, en las tres zonas (alta, media y baja) para detectar si existían diferencias significativas entre estos. Además, se determinó la presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en los repollos de las tres zonas. Los resultados se muestran en el cuadro III.

**Cuadro III.** Resultados obtenidos del recuento total aerobio, recuento de mohos y levaduras y recuento de coliformes totales y *E. coli*, así como la presencia / ausencia de *L. monocytogenes* en repollos de tres altitudes distintas de una finca.

Zona	Recuento total aerobio (log UFC/g)*	Recuento de mohos y levaduras (log UFC/g)*	Recuento de coliformes totales (log UFC/g)*	Recuento de <i>E. coli</i> (log UFC/g)*	Presencia / Ausencia de <i>L. monocytogenes</i> (Presencia / ausencia/ 25 g)
Alta	5,1 ± 0,7	2,3 ± 0,6	2,5 ± 0,5	< 1	Ausencia
Media	4,6 ± 0,3	2,4 ± 0,4	2,5 ± 0,6	< 1	Ausencia
Baja	5,0 ± 1,3	2,3 ± 0,6	2,1 ± 0,7	< 1	Ausencia

\*Los promedios se muestran con sus intervalos de confianza respectivos a un 95% de confianza (n=3).

Se demostró que no existen diferencias significativas entre los promedios de los recuentos de los repollos de las tres zonas de la finca para el recuento total aerobio ( $P=0,5276$ ;  $1-\beta = 0,9796$ ), el recuento de mohos y levaduras ( $P=0,9963$ ;  $1-\beta = 1,0000$ ) y el recuento de coliformes totales ( $P=0,4095$ ;  $1-\beta = 0,9999$ ) con un nivel de significancia del 5%. No se detectó el crecimiento de *E. coli* en ninguna de las muestras de las zonas.

Por otra parte, no se logra detectar la presencia de *L. monocytogenes* en ninguna de las muestras de las zonas estudiadas. En la zona baja se determinó la ausencia de *Listeria* sp.; sin embargo, tanto en la zona alta como en la zona media se logró identificar en un 100% de las muestras la presencia de *L. ivanovii* por medio del sistema de identificación API *Listeria* sp. de Biomerieux (2010).

Los resultados indican que, bajo las condiciones características de la finca estudiada, se puede descartar la teoría de que la acumulación de materia orgánica en la parte inferior de las laderas promueva el crecimiento de los microorganismos estudiados en los repollos de manera significativa.

Estos resultados pueden justificarse por la correcta aplicación de las buenas prácticas de agricultura y la implementación de prácticas de manejo de cultivos sostenibles en la finca estudiada. Estas últimas, también denominadas “prácticas agroconservacionistas” (MAG, 2008) buscan el aumento de la biomasa microbiana saludable del suelo y su contenido de carbono, contribuyendo a mejorar su estructura y reduciendo su erosionabilidad (Acosta *et al.*, 2015). Por ejemplo, el dejar los residuos de la cosecha y triturarlos para reintegrar los nutrientes al suelo y el realizar una labranza menos disruptiva o mínima, se fomenta el retorno del carbono y nitrógeno al suelo y evita el rompimiento de las redes fúngicas del terreno (Quang, 2021).

Asimismo, el procurar que el cultivo cubra la mayor parte del suelo, lograr el aprovechamiento del agua mediante drenajes eficientes, procurar la fertilidad del suelo y buscar la máxima productividad, disminuye la velocidad de la escorrentía y mejora la penetración del agua en el suelo, reduciendo la cantidad de suelo perdido por la erosión (Raudes y Sagastume, 2009). Todas estas prácticas se realizaban en la finca en estudio según la información recolectada en las visitas realizadas (Ver Anexo I).

Además, gracias a que la finca en estudio aprovechaba el agua de lluvia, no utilizaba agua de riego ni estaba propensa a que las fuentes de agua (pozos, ríos, estanques) se contaminaran, por lo que el factor de riesgo disminuía, evitando así la introducción de patógenos y la proliferación de microorganismos no deseados en todas las zonas. Una de las

prácticas a futuro que se podría recomendar a este tipo de terrenos, es el uso de barreras vivas como hileras de árboles o muros de retención para evitar la erosión de los suelos (Raudes y Sagastume, 2009).

Específicamente, para analizar el resultado de cada recuento, se tomó en consideración que los repollos muestreados se encontraban en contacto directo con la tierra, el agua y demás componentes ambientales que promueven el crecimiento natural de microorganismos dentro del campo.

Para el resultado del recuento total aerobio o RTA, se obtuvieron resultados alrededor de 5 log UFC/g en las 3 altitudes. El recuento total aerobio indica la calidad microbiológica de los alimentos, mas no determina la presencia de microorganismos patógenos por lo que no se puede utilizar directamente como indicador de inocuidad. En el caso de materias crudas como los vegetales, los recuentos altos son esperados (6 – 7 log UFC/g) (Food Standards Australia New Zealand, 2016). Johnston *et al.* (2006), coincidentemente determinó que en vegetales de hojas verdes los recuentos totales aerobios oscilan entre 5 y 6 log UFC/g. Por lo tanto, los resultados obtenidos estaban dentro del rango esperado.

De la misma forma que el recuento anterior, el recuento de mohos y levaduras actúa solamente como indicador de calidad mas no de inocuidad, ya que ambos grupos de microorganismos pueden causar deterioro y descomposición en el alimento, afectando su textura, sabor, olor y color (Tournas *et al.*, 2001). La presencia de mohos en las verduras es indeseada, ya que algunos pueden producir micotoxinas mientras que otros son conocidos por causar alergias cuando son capaces de producir grandes cantidades de conidios (Oliveira *et al.*, 2010). Los recuentos obtenidos que rondan los 2 log UFC/g no indicaron que existiera una deficiencia de calidad del producto.

Mritunjay y Kumar (2017), al analizar diversas muestras de vegetales frescos, obtuvieron un recuento de mohos y levaduras menor a 4 log UFC/g en la mayoría de repollos. De la misma manera, Kim y Cheigh (2022), obtuvieron recuentos de mohos y levaduras entre 2,32 y 4,26 log UFC/g para muestras de repollo. En este caso, los resultados rondaron los 2,3 log UFC/g por lo que se asemejan a los de estos estudios.

Por su parte, las bacterias coliformes pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* e incluyen especies de los siguientes géneros: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Yersinia* (Curutiu *et al.*, 2019). Para este recuento se obtuvieron recuentos bajos entre 2,1 y 2,5 log UFC/g tomando en cuenta las muestras de las tres zonas. Hasta este momento, no hay normas establecidas para los niveles de coliformes en frutas y verduras frescas porque estos productos naturalmente tienen altos niveles de coliformes y a veces son parte de la microbiota natural de estos alimentos (Abadías *et al.*, 2008). Sin embargo, los altos recuentos de estos pueden indicar una mayor posibilidad de contaminación fecal (Espigol *et al.*, 2018).

Johnson *et al.* (2006) determinó que los recuentos de coliformes totales en repollos eran de menos de 1 log hasta 4,5 log UFC/g, mientras que Mritunjay y Kumar (2017) obtuvieron menos de 4 log UCF/g en los repollos muestreados. Por lo tanto, se puede decir que el recuento obtenido en este estudio fue esperado y no reflejó una calidad higiénica deficiente del producto.

El recuento de *E. coli*, por su parte, es el mejor indicador de contaminación fecal y su no detección en el producto fue un indicador de que en la finca estudiada se llevaban a cabo satisfactoriamente las buenas prácticas de agricultura. Sin embargo, su ausencia no asegura la ausencia de otros patógenos entéricos (Erkmen y Bozoglu, 2016) ni asegura que otros patógenos en general no estén presentes, considerando que diferentes cepas de *E. coli* tienen características de supervivencia y crecimiento distintas (Food Standards Australia New Zealand, 2016). No obstante, sí permite especular que la probabilidad de que otros patógenos de tipo entérico estén presentes sea baja. Johnson *et al.* (2006) respalda que bajo condiciones adecuadas de cultivo los resultados para *E. coli* son menos de 1 log, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

Por otra parte, la detección de *L. ivanovii* en los repollos de dos zonas de la finca indica que en el terreno existían todas las condiciones ambientales necesarias para que *L. monocytogenes* también se pudiese desarrollar, dada la similitud de las cepas. Ambas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, son patógenas y pueden invadir las células

huésped, replicarse en el citosol y multiplicarse de célula en célula al polimerizar la actina (Guillet *et al.*, 2010).

La infección con *L. monocytogenes* puede generar listeriosis, una enfermedad responsable del 19% del total de muertes causadas por todos los patógenos relacionados con alimentos; en su forma más severa, tiene una tasa de hospitalización del 90% y un índice de mortalidad del 20 – 30%. Con tan solo una cantidad inicial de 10 a 100 UFC de *L. monocytogenes* presente, se puede contagiar de listeriosis un consumidor; no obstante, la dosis infecciosa necesaria para el desarrollo de la enfermedad depende principalmente de las cepas y la susceptibilidad de los individuos (Chen *et al.*, 2017).

Por su parte, *L. ivanovii* se considera patógeno principalmente en rumiantes, ya que la listeriosis asociada con la infección de *L. ivanovii*, es extremadamente rara en humanos (Hitchins *et al.*, 2022) y en los últimos años solo se han notificado algunos casos en personas inmunocomprometidas (Gan *et al.*, 2020).

*L. monocytogenes* es tolerante a la sal y es capaz de sobrevivir y crecer en temperaturas por debajo de 1°C, a diferencia de otros patógenos. Además, es omnipresente en el medio ambiente y se puede encontrar en ambientes húmedos, suelo y vegetación en descomposición (Hitchins *et al.*, 2022). Existen registros de cepas de *Listeria* sp. que han sobrevivido en distintas superficies gracias a la formación de biopelículas, provocando la contaminación de los productos (Nyenje *et al.*, 2012). Estas consisten en un conjunto de células microbianas dentro de una matriz de sustancia polimérica extracelular que les permite adherirse y sobrevivir tratamientos de desinfección (Chen *et al.*, 2017).

La alta resistencia de las biopelículas de *L. monocytogenes* en plantas de elaboración de alimentos ha sido ampliamente estudiada contrario a las de *L. ivanovii*. Sin embargo, la alta prevalencia descubierta en los últimos años de *L. ivanovii* en efluentes de aguas residuales y alimentos listos para el consumo, ha desencadenado estudios que muestran que esta también tiene la capacidad de formar biopelículas duraderas (Nyenje *et al.*, 2012).

Dado los hechos anteriores, la presencia de este género representa un peligro constante para la industria de alimentos. Ciertas intervenciones como el minimizar el

potencial de contaminación precosecha y el lograr un mejor entendimiento de la ecología de los patógenos, puede minimizar la aparición de brotes asociados con *L. monocytogenes* (Erickson, 2010).

La detección en los repollos de las dos zonas superiores de *L. ivanovii* hace un llamado a buscar detener la proliferación de su género. *Listeria sp.* al ser un contaminante ambiental, puede ser introducido por trabajadores, equipo u otros productos. Por ejemplo, Prazak *et al.* en un estudio del 2002, detectó la presencia de *L. monocytogenes* en una superficie no desinfectada o limpiada frecuentemente de una planta procesadora de repollos, lo que generó la contaminación de estos al entrar en contacto con dicha superficie. Por lo tanto, los cuchillos y las cajas no desinfectadas correctamente o incluso los trabajadores que pudieron estar en contacto con un área contaminada y que después estuvieron presentes en la finca, pueden haber sido una de las causas de la contaminación, considerando que la bacteria puede persistir en superficies por hasta 100 días (Olaimat y Holley, 2012).

Consecuentemente, el tránsito de mayor cantidad de trabajadores en las dos zonas altas de la finca donde se detectó *L. ivanovii*, (ya que es donde se realiza la carga de producto a los camiones), puede ser la causa de la presencia del género *Listeria sp.* en estas zonas. Se ha detectado que aves que beben de alcantarillas son capaces de introducir *L. monocytogenes* y bacterias entéricas a otros terrenos. Por lo que la entrada y/o presencia de animales salvajes y domésticos, incluyendo mamíferos, aves, reptiles e insectos funcionan como entradas directas de *L. monocytogenes* a este tipo de terrenos (Miceli y Settanni, 2019).

Por lo tanto, es necesario reforzar las buenas prácticas de agricultura enfocadas en evitar la propagación de la bacteria en los repollos, como la desinfección constante de los cuchillos, cajones y demás herramientas en contacto con los repollos, el proporcionar a los trabajadores la indumentaria y los recursos apropiados para el cultivo en la finca (por ejemplo botas limpias y agentes desinfectantes para el correcto lavado de manos, considerando la ausencia de servicios sanitarios y lavamanos en el terreno), el tener un apropiado control de plagas para evitar el tránsito de animales y contar con herramientas que alejen a las aves de la finca y el evitar crear zonas de acumulación de producto en descomposición donde la bacteria pueda reproducirse con mayor facilidad (FDA, 2017).

Además, es importante conseguir semillas descontaminadas que eviten que *L. monocytogenes* pueda internalizarse en el producto (Miceli y Settanni, 2019), así como mantener un registro de las fechas de plantación, fumigación, abono y prevenir la entrada de escorrentías de campos que trabajen con animales (MAG, 2008).

En el aspecto de agroquímicos y fertilizantes, en la finca se utilizaban agroquímicos autorizados según la recomendación del fabricante y se contaba con un plan de muestreo de químicos indeseables. No obstante, si bien los agroquímicos se almacenaban en un lugar fuera del área de cultivo es necesario que se retiren los envases plásticos de estos y de otros productos utilizados del terreno (Anexo I), ya que estos podrían causar contaminaciones químicas, servir de refugio a animales como roedores y otras plagas o incluso almacenar agua contaminada. Asimismo, en la finca se daba la correcta aplicación del abono orgánico antes de la siembra (no durante la cosecha ni en los terrenos adyacentes), sin embargo, es necesario mencionar que, para prevenir la contaminación de los repollos por patógenos, es requerido un protocolo estándar de pasteurización y acondicionamiento del abono que elimine los abundantes niveles de microorganismos patógenos que pueden contener (Laborde, 2018).

En Costa Rica la principal causa de degradación del suelo es la hídrica, por lo que es necesario que los productores conozcan las características agroecológicas de su finca e identifiquen los riesgos que amenazan la producción para evitar la degradación del suelo (MAG, 2008). En la finca estudiada, si bien se consideraba la topografía del terreno y el patrón de lluvias para identificar posibles contaminaciones, se detectó que existían zonas ganaderas que a pesar de no estar aledañas (Anexo 1), sí estaban en zonas cercanas visibles, lo cual podría introducir contaminaciones con el viento o incluso por la escorrentía del terreno, por lo que se debe tener esto en consideración para buscar formas de prevenir la contaminación del repollo cultivado.

Los resultados obtenidos en esta parte de la investigación demuestran la importancia de la selección de prácticas agrícolas adecuadas para el terreno en el que se produce, de manera que se evite la erosión del suelo y se logre un producto inocuo y de calidad.

## 5.2 EVALUACIÓN DE LA REDUCCIÓN DEL RECuento TOTAL AEROBIO ANTES Y DESPUÉS DE CADA UNA DE LAS ETAPAS DE DESINFECCIÓN PARA COMPROBAR SU EFECTIVIDAD.

Con base en los resultados del apartado 5.1 se seleccionó un indicador microbiológico que permitiera observar una reducción microbiológica después de aplicar cada proceso de desinfección. Es decir, un grupo de microorganismos que estuviera en una carga significativa en el repollo salido del campo y pudiera ser reducido con el tratamiento de desinfección.

De esta forma, se seleccionó el recuento total aerobio como indicador. Se partió del supuesto de que habría una carga inicial de 4 - 5 log UFC/g y que se podría estudiar las reducciones a partir de esta; a manera de confirmación, antes de cada tratamiento, se realizó el análisis microbiológico para conocer con exactitud la carga presente en el repollo y poder determinar así la reducción posterior. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro IV.

**Cuadro IV.** Carga microbiológica inicial y final del repollo en cada uno de los procesos de desinfección realizados en la cadena de producción y su respectiva reducción microbiológica alcanzada.

	<b>Carga microbiológica inicial (log UFC/g)*</b>	<b>Carga microbiológica final (log UFC/g)*</b>	<b>Reducción microbiológica alcanzada (log UFC/g)*</b>
<b>Desinfección 1 Cloro 60 ppm por 10 min</b>	5,7 ± 0,8	4,5 ± 0,9	1,2 ± 0,2
<b>Desinfección 2 Peróxido de hidrógeno 50 ppm por 1-2 min</b>	4,7 ± 0,7	3,9 ± 0,8	0,8 ± 0,2
<b>Desinfección 3 Cloro 60 ppm por 5 min</b>	4,1 ± 0,2	3,2 ± 0,1	0,9 ± 0,2

\*Los promedios se muestran con sus intervalos de confianza respectivos a un 95% de confianza (n=3).

Para esta sección se define una desinfección exitosa como aquella que logre una reducción de 3 log UFC/g (Chang, 2015), sin embargo, ninguno de los procesos de desinfección realizados a lo largo de la cadena de producción del repollo logra alcanzar los 3 log UFC/g propuestos de reducción microbiológica (Chang, 2015), ni los 2 log UFC/g de reducción planteados por la FDA en los tanques de lavado de producto fresco (FDA, 2018).

Existen muchos factores que pueden afectar la eficacia de una solución desinfectante, tales como la calidad del agua, el tipo de desinfectante, los métodos de tratamiento y los agentes patógenos presentes (Gil *et al.*, 2009). Algunos estudios concluyen que el lavado postcosecha logra una reducción insignificante en los niveles de patógenos humanos, y contrario a su propósito, puede aumentar significativamente el potencial de contaminación cruzada entre lotes (Warriner y Namvar, 2013). Y es que, a pesar de que a nivel de laboratorio se puede alcanzar la eliminación de patógenos al aplicar directamente el desinfectante sobre estos, la bibliografía evidencia que en condiciones comerciales la reducción real se limita a 1-2 log, independientemente del desinfectante o del tiempo de contacto aplicado (Barrera *et al.*, 2012).

En el caso de los vegetales de hoja verde como el repollo, las hojas con daños mecánicos o bióticos tienden a ser lugares ideales para la multiplicación de microorganismos por la disponibilidad de nutrientes, mientras que las hojas enteras son superficies propensas a la formación de biopelículas protectoras (Rosberg *et al.*, 2020). Esto quiere decir que el proceso eficaz de desinfección de repollo es más difícil de alcanzar en comparación con otros productos frescos.

Una vez que el repollo ha sido cosechado, se le remueven las hojas superficiales dejando solamente la cabeza compacta. Luego, este es llevado a su primera desinfección en la planta empacadora de la finca. Esta se realiza en tanques de lavado de 200 L, donde el agua se cambia de manera regular y se le agregan 300 mL de cloro comercial al 4% como desinfectante, para una concentración de 60 ppm de cloro en el tanque. Los repollos son depositados en el tanque hasta que este quede cubierto y permanecen en él por un máximo de 10 min de manera estática.

La primera etapa de cualquier proceso de desinfección o lavado de un producto fresco tiene como objetivo eliminar la suciedad general del campo y los desechos. La carga microbiológica de este agua de lavado aumenta rápidamente, por lo que es necesaria una gestión adecuada del agua mediante su filtración y renovación, respetando la relación producto/agua y la aplicación del agente desinfectante para mantener la carga microbiana del agua a un nivel bajo (Holvoet *et al.*, 2012).

En este caso, si bien la dosificación del desinfectante se realizaba cuidadosamente, tanto el llenado del tanque como el cambio del agua se hacía según el criterio del operario. Estos son dos factores cruciales que podrían estar afectando la eficacia del tratamiento. En primer lugar, el sobrecargar el producto en el tanque, reduce el tiempo de contacto del antimicrobiano con el producto y aumenta la frecuencia de contacto directo producto - producto. En segundo lugar, la acumulación de materia orgánica en el tanque de lavado, producto del cambio no frecuente del agua, actúa como una barrera física protectora de las bacterias contra los desinfectantes y neutraliza la acción antimicrobiana (Murray *et al.*, 2017). Por lo tanto, existen factores externos al desinfectante que podrían estar interfiriendo en el tratamiento.

El desempeño del cloro se ve afectado por su reacción con la materia orgánica presente en el agua de lavado, ya que un 50% del consumo del desinfectante se produce dentro de los primeros 5 min del tratamiento. Esto constituye un gran desafío a nivel industrial, ya que lo deseado sería lograr reducir la demanda de cloro una vez que el producto fresco se deposita en los sistemas de lavado, con el fin de que el efecto desinfectante se pueda mantener (ShihChi *et al.*, 2016).

Consecuentemente, el monitorear la concentración de cloro en el agua y el tomar acciones correctivas para que esta se mantenga en el valor deseado, es de vital importancia cuando se trata de producto fresco. No obstante, se debe recordar que, a nivel de una producción mediana – pequeña, el cambio frecuente del agua y las mediciones constantes del cloro representan un gasto económico adicional, por lo que el enfoque investigativo se debería mantener en estabilizar la concentración de cloro deseada en los tanques y buscar alternativas que faciliten el proceso realizado por los agricultores en todos los ámbitos.

En términos de desinfección, existe la posibilidad de que los microorganismos estén protegidos por procesos como la internalización o la formación de biofilms (Darabă, 2021).

La internalización es el proceso mediante el cual un patógeno puede pasar a las hojas del vegetal por medio del sistema vascular o bien, por penetración de los tejidos internos usando las heridas o aberturas naturales de las hojas (Darabă, 2021). Generalmente ocurre durante las etapas de enfriamiento y lavado, donde el agua puede ser un vehículo para la internalización del patógeno a través de sitios deformados, lesiones y estomas (Cai *et al.*, 2018). Considerando que el repollo es traído del campo en cajas plásticas por carreteras en malas condiciones, la generación de hundimientos y micro fisuras en algunos de los productos es inevitable, generando vías de internalización como las mencionadas cuya efectividad puede ser potenciada al momento en que el producto entra en contacto con el agua de desinfección.

Incluso cuando el producto no presente lesiones, las barreras físicas como la corteza o la piel del vegetal no necesariamente previenen la infiltración de los microorganismos, ya que aquellos presentes en el agua de lavado son capaces de internalizarse bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, cuando el producto caliente, como lo es el repollo recién cosechado, se sumerge en agua a menor temperatura como la que proviene de las tuberías de una zona del país particularmente fría, la diferencia de presión entre el producto y el agua permite que los patógenos lleguen al interior del producto (Li *et al.*, 2008). O bien, si la temperatura de una solución desinfectante es inferior a la de un producto fresco en un tanque de lavado contaminado con patógenos al momento de la desinfección, esto causaría la internalización del microorganismo y de una proporción del agua de lavado en las estructuras interiores y tejidos del vegetal (Yoon y Lee, 2017).

Por otra parte, la formación de biofilms es la primera parte de la colonización bacteriana (Darabă, 2021). Los biofilms son comunidades de microorganismos en las que las células están unidas por una matriz extracelular de exopolisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos (Elhariry, 2011). Una vez formado, este tiene la capacidad de proteger el resto de las bacterias adheridas contra los factores de estrés ambientales (deseccación, radiación UV, etc.) y contra la respuesta inmune de la planta (Darabă, 2021).

Por lo tanto, la eliminación de las células adheridas requiere de una ruptura química de las fuerzas de fijación a través de la aplicación de enzimas, detergentes, tensioactivos, desinfectantes y/o calor, o bien, de la aplicación de una fuerte fuerza de cizalla (lavado o raspado) de la superficie, la cual no es contemplada en esta etapa de desinfección estudiada (Elhariry, 2011). Sin embargo, aunque se recomendara aplicar algún tipo de fuerza sobre el producto, la adherencia de las bacterias a productos frescos como el repollo se ve favorecida por las irregularidades de la superficie (rugosidad, grietas, hoyos), lo que reduce la eficacia de lavado y desinfección para eliminar las células adheridas (Giaouris y Simões, 2018) y representa un gasto de recursos.

Al finalizar esta primera etapa de desinfección, se podría suponer que la razón por la cual no se logró una reducción de 3 log, es la alta interacción del cloro con la materia orgánica acumulada en los tanques, en conjunto con los mecanismos protectores de los microorganismos en superficies rugosas como el repollo. Por lo tanto, es necesario que las condiciones de la operación se controlen de manera más efectiva, tomando en cuenta la relación agua – producto en el tanque, evitando la exposición de los repollos al sol o a cualquier circunstancia que pueda generar un diferencial de temperatura con el agua de desinfección y realizando un cambio de agua constante, respetando la concentración del cloro y el tiempo de contacto con el producto. Cabe mencionar que, en el caso del cloro, su forma más activa como desinfectante se da cuando este se encuentra como ácido hipocloroso, el cual se forma dependientemente del pH del medio. Si se utilizarán disoluciones de hipoclorito de sodio a un pH entre 6,5 y 7,0, considerando que el agua puede tener un pH básico entre 10-12, se podría maximizar la eficacia del proceso de desinfección (Schneider y Fatica, 2009). Por lo tanto, el acidificar el medio de desinfección podría ser una mejora al proceso realizando las pruebas respectivas que garanticen la efectividad de la operación.

Siguiendo en la cadena de producción, la segunda desinfección se realiza cuando el repollo llega al Centro Agrícola donde se procesa. Esta desinfección se lleva a cabo con 50 ppm de peróxido de hidrógeno, por 1- 2 min en tanques de lavado respetando una relación de 3 partes de producto y 2 de agua en cada desinfección. En este caso el Centro Agrícola lleva a cabo una verificación del procedimiento cada cierto tiempo. Esta verificación se

realiza con bandas indicadoras de la concentración de peróxido, antes de introducir los repollos, a la mitad del tiempo de contacto (1 min) y después de que los repollos han sido retirados del tanque, demostrando que la cantidad de desinfectante adicionada se mantiene en 50 ppm en los tanques de lavado.

Esta verificación no toma en cuenta la pérdida de la concentración del desinfectante si se desinfectaran varias tandas de producto con esta misma agua. El Centro Agrícola recibe grandes cantidades de repollo de diferentes fincas, haciendo que la microbiota presente en el producto antes de la desinfección sea variada. Además, existe la posibilidad de que algunos lotes no fueran transportados en las mejores condiciones; por ejemplo, en la finca en estudio, el productor transportaba los repollos en cajas plásticas sobre un camión de cajón abierto, donde se exponían directamente al ambiente (sol, polvo, suciedades, etc.), ya que los productores consideran que los tiempos de transporte son muy cortos para aumentar la protección (Anexo I). De esta manera se introdujeron dos posibles causas de la baja reducción: la contaminación cruzada y el agotamiento del desinfectante en el agua de lavado por acumulación de materia orgánica.

Al analizar la posible contaminación cruzada en repollos, se debe considerar que, de haber hojas contaminadas en un lote de producción, estas pueden liberar células microbianas en el agua de lavado. En presencia de un nivel insuficiente de agente desinfectante, los microorganismos más resistentes en el agua de lavado pueden permanecer viables y pueden ser transferidos a hojas no contaminadas. Aunque el lote de producción inicialmente solo contenía una pequeña proporción de hojas contaminadas, el uso de un nivel insuficiente de agente antimicrobiano en el agua de lavado causará la contaminación cruzada de otros lotes, una mayor proporción de hojas portadoras de los microorganismos y un mayor riesgo de transmisión de enfermedades en caso de haber patógenos presentes (Gombas *et al.*, 2017).

El peróxido de hidrógeno es una alternativa amigable con el ambiente en comparación con el cloro, ya que no produce gases tóxicos en el espacio de trabajo y se descompone como agua y oxígeno. Sin embargo, algunos estudios enfocados en la inactivación de bacterias y esporas bacterianas mostraron que el peróxido por sí solo es un desinfectante de acción lenta, por lo que requiere de altas dosis y altos tiempos de contacto para lograr dicha inactivación

(Van Haute *et al.*, 2015). Un tiempo de contacto de 1 – 2 min como el que utiliza el Centro, por lo tanto, se podría considerar como insuficiente para que el peróxido de hidrógeno logre una inactivación superior, por lo que el recomendar aumentar este tiempo podría ser beneficioso siempre y cuando se pruebe que no hay daños a la calidad del producto.

Por otra parte, la concentración sugerida por el fabricante del desinfectante al Centro, es relativamente baja en comparación con otros estudios que demuestran desinfecciones efectivas del agua de lavado bajo condiciones más favorables, como reducciones de 3 log o más al utilizar una concentración de 5% de peróxido de hidrógeno con agitación vigorosa a una temperatura de 50-60 °C para manzanas y 70-80 °C para melón. Sin embargo, altas concentraciones de este desinfectante pueden causar problemas de calidad sensorial y nutricional, como el pardeamiento de los productos o la oxidación de antocianinas (Joshi *et al.*, 2013).

Ölmez y Kretzschmar (2009), determinaron que la eficacia antimicrobiana del peróxido de hidrógeno es comparable con la del tratamiento con cloro de 100 a 200 ppm a temperatura ambiente, tal y como se obtuvieron los resultados en este estudio. Sin embargo, estos autores mencionan mayores reducciones en los recuentos microbianos y la conservación de una mayor calidad general del producto cuando se aplica peróxido de hidrógeno a temperaturas más altas entre 50-60 °C (Ölmez y Kretzschmar, 2009). Por lo tanto, otra prueba a recomendar para obtener mayores reducciones microbiológicas en el Centro Agrícola y evitar la internalización de microorganismos por diferencial de temperatura, podría aumentarse la temperatura del agua de desinfección, con el costo asociado que esto conlleva.

La combinación de la contaminación cruzada, los mecanismos protectores de los microorganismos (internalización y formación de biofilms) y la lenta acción del desinfectante que hace que la concentración y el tiempo de contacto implementados no sean efectivos, así como el efecto de la acumulación de la materia orgánica antes observado, se podrían señalar como posibles factores que impidieron la reducción de los 3 log en este caso.

Por último, la tercera desinfección se realiza cuando el repollo ha sido troceado y rallado de forma manual por los operadores. Antes de empacarlo, este recibe una última desinfección, al combinar una igual cantidad de mililitros de cloro comercial al 6% que de litros de agua, para una concentración final de 60 ppm de cloro, por un tiempo de 5 min aproximadamente.

Si bien el Centro contaba con un sistema de BPM y sistemas de higiene, siguiendo protocolos de limpieza y desinfección tanto para el personal, como para los equipos y materiales en contacto directo con el alimento (Ver Anexo II), la posibilidad de una mala manipulación por parte de un operario o el contacto con cualquier superficie mal desinfectada como las tablas de picar, los cuchillos o los guantes, representa una entrada de microorganismos no deseados en el agua de lavado que afectan la eficacia de la desinfección (Ilic, 2011) y hace necesaria una revisión de los procedimientos establecidos.

A diferencia de las desinfecciones anteriores del repollo entero, los productos frescos que atraviesan algún tipo de transformación física como el rallado del repollo, sufren la liberación de agua y nutrientes que facilitan el crecimiento de los microorganismos presentes, especialmente si el producto pasa mucho tiempo a temperatura ambiente (Sivapalasingam *et al.*, 2004). En el caso analizado, la zona de procesamiento de vegetales se encontraba a una temperatura de 14 – 16 °C aproximadamente y el tiempo entre operaciones era óptimo, de manera que el producto no pasaba mucho tiempo en condiciones en las que pudieran proliferar los microorganismos.

El efecto del desinfectante se ve disminuido por la liberación de exudados y la adherencia de las bacterias; la acción de cortar el tejido vegetal libera agua y nutrientes que pueden reducir significativamente la disponibilidad de cloro. Esto también puede conducir a la reducción de la eficacia del desinfectante en la eliminación de la contaminación cruzada. Las bacterias se adhieren en mayor medida al corte que al vegetal entero sin cortar, al tener una mayor superficie disponible, lo que resulta en diferencias significativas en la eficacia de los tratamientos de lavado y desinfección (FAO y WHO, 2008).

Al reconsiderar la posible entrada de microorganismos por el nivel de contacto característico del producto con los operarios y los utensilios durante esta etapa, la fácil interacción del cloro con los componentes orgánicos e inorgánicos (Komaki *et al.*, 2018) y el agotamiento de este cloro libre dentro de los tanques de lavado por la diseminación de contaminación entre diferentes lotes (Murray *et al.*, 2017), se establecen las posibles razones de la baja efectividad de este tratamiento en los resultados observados.

En este caso, el no detectar la reducción microbiológica esperada es de especial cuidado al considerar que es el último punto de control del producto antes de ser empacado para su consumo directo. Como se mencionó anteriormente, si bien el estudio del recuento total aerobio no permite levantar una alerta de inocuidad por la naturaleza del mismo, sí resalta la importancia de mantener las buenas prácticas de agricultura y de manufactura además de los métodos de desinfección, para lograr una mejor calidad microbiológica del producto.

Nuevamente no se logra la eficacia esperada de parte del cloro al igual que en la primera desinfección. La efectividad del cloro ha sido cuestionada por múltiples casos en donde se vinculó producto fresco con un brote después de que estos habían sido sometidos a este desinfectante, sin embargo, la relación efectividad – costo y su amplio espectro de aplicación, hace que sea un tratamiento común y preferido dentro de la industria (Galanakis, 2021). Según estos resultados se reitera la necesidad de buscar mecanismos para mantener la concentración del cloro libre dentro de los tanques.

Al considerar el efecto acumulativo de las tres desinfecciones se observa que existe una reducción de la carga inicial microbiológica, sin embargo, hasta no realizar una evaluación más profunda, todos los tratamientos de desinfección que se aplican actualmente al repollo estudiado, son necesarios para el proceso de garantizar la inocuidad del producto al actuar como una de las barreras preventivas ante patógenos, así como para contribuir con la vida útil y calidad microbiológica del repollo rallado.

En Costa Rica el Reglamento Técnico Centroamericano: Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos (Poder Ejecutivo, 2018), no establece ningún parámetro para

el recuento total aerobio en vegetales como criterio de inocuidad; este solamente dicta que las hortalizas procesadas deben tener una carga  $< 10$  UFC/g de *E. coli* y ausencia de *Salmonella* sp. y de *L. monocytogenes*. Pascual (1992), sugiere que el recuento de aerobios mesófilos en frutas y verduras debe de ser de 2 a 5 log UFC/g como parámetro aceptable, el Poder Ejecutivo Federal (1995), establece que en ensaladas de vegetales crudos el RTA no sobrepase los 5 log UFC/g, mientras que Degaga *et al.* (2022), clasifica los recuentos totales aerobios de los alimentos en: bueno ( $< 4$  log UFC/g), promedio (4.0 - 6.7 UFC/g), pobre (6.7 - 7.7 log UFC/g) y alimentos en mal estado ( $> 7.7$  log UFC/g). por lo que el recuento final de 3 log UFC/g que se obtuvo después de la última desinfección, no solo evidenció que el repollo se consideraba aceptable, sino también de una buena calidad microbiológica.

Seguidamente, la sección evaluada de lavado y desinfección (Anexo II), muestra que se cumplen todas las pautas a seguir correctamente, como lo es el control diario del cloro del agua, la desinfección de los tanques de lavado, el establecimiento de condiciones de desinfección y su respectivo registro, así como las correctas condiciones de temperatura para almacenar el producto.

Las múltiples operaciones de procesamiento que requieren los productos frescos como el repollo, funcionan como puertas de contaminación cruzada, en donde una pequeña parte contaminada de un lote puede ser responsable de la contaminación de toda una producción. Por lo tanto, además de las desinfecciones del producto, el mantenimiento periódico y la limpieza durante los turnos, la limpieza diaria, la desinfección de superficies de equipos en contacto directo con el repollo como las cajas de almacenamiento y el equipo de corte como los cuchillos y las tablas de picar, es esencial para reducir peligros microbianos (Gil *et al.*, 2015).

De la misma manera, la evaluación mostró que en la sección de higiene de los trabajadores e instalaciones y el transporte del producto final se cumplía con todas las BPM (Anexo II). No obstante, siempre se recomienda que todos los involucrados en la cadena de producto fresco, reciban capacitación para implementar y reforzar efectivamente el conjunto de barreras preventivas ante patógenos además de los procesos de desinfección.

La Organización Mundial de la Salud describe los programas prerrequisitos como "prácticas esenciales de inocuidad alimentaria que deben implementarse antes y durante la instalación del HACCP (Sistema de Análisis de Peligros y Control de Puntos Críticos)". Los programas prerrequisitos aplicados correctamente, incluidas las buenas prácticas de higiene, las BPA y las BPM, junto con la formación y la trazabilidad, deben proporcionar las bases para un sistema HACCP eficaz (Lee *et al.*, 2021). En la evaluación realizada al Centro Agrícola (Anexo II), se detectó un muy buen manejo de sus programas prerrequisitos, así como de su sistema HACCP. Dentro de sus programas, el programa de control de proveedores sobresalió gracias a la naturaleza de este tipo de institución gubernamental, la cual se encarga de instruir y evaluar a los productores, procurando el desarrollo agrícola de la comunidad para desarrollar productos bajo estándares de calidad e inocuidad (P. Castillo, comunicación personal, noviembre del 2020).

Aún con estas medidas, es necesario que, a nivel de industria de producto fresco y alimentaria en general, se incorporen normas nuevas y mejoradas en conjunto con regulaciones, de manera que se logren alimentos inocuos, por medio de sistemas de inocuidad alimentaria interrelacionados con la calidad, la eficiencia, la fiabilidad, la intercambiabilidad, la economía y el respeto del medio ambiente (Lee *et al.*, 2021).

### 5.3 COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE 3 DESINFECTANTES DISTINTOS DURANTE 3 TIEMPOS DE CONTACTO, POR MEDIO DE LA REDUCCIÓN DE *E. coli* INOCULADO EN EL REPOLLO.

Por último, se procedió a comparar el efecto de diferentes tratamientos desinfectantes contra una bacteria indeseada específica como lo es *E. coli*. Con este fin se seleccionaron el peróxido de hidrógeno y el cloro por su aplicación a nivel industrial en la sección anterior, y se decidió probar el ácido peracético tras investigar teóricamente su efectividad en producto fresco. Estos se aplicaron a concentraciones de 50 ppm, 200 ppm y 80 ppm respectivamente y se realizó una prueba solamente con agua potable como tratamiento control.

Los repollos enteros inoculados con *E. coli*, se sometieron a los tratamientos desinfectantes en concentraciones permitidas por la FDA (FDA, 2022a; FDA, 2022b) para observar la reducción microbiológica lograda. La prueba de la AOAC mencionada en el apartado 3.5.4, determina que la desinfección es eficaz si muestra una reducción de 5 log de las poblaciones microbianas en suspensión (EPA, 2019). Los productos químicos de uso doméstico como el peróxido de hidrógeno logran más de 5 log de reducción de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* cuando se realiza una prueba de suspensión (Yang *et al.*, 2009). Sin embargo, como en condiciones reales las desinfecciones son de 1-2 log UFC/g solamente (Barrera *et al.*, 2012), el alcanzar los 3 log UFC/g propuestos inicialmente sería considerado una desinfección exitosa (Chang, 2015).

La supervivencia de patógenos humanos en la superficie de las hojas depende de varios factores como la tolerancia a la radiación UV, la competencia con la microbiota natural del producto y la disponibilidad de nutrientes y agua (Rosberg *et al.*, 2020). En un tratamiento, el microorganismo seleccionado para evaluar la desinfección determina la reducción lograda por el agente, así como la estrategia de desinfección más apropiada para su inactivación (Banach *et al.*, 2020).

En este caso se seleccionó *E. coli* ya que es resistente a los tratamientos desinfectantes (Fallahzadeh *et al.*, 2021), funciona como indicador de otros patógenos como *Salmonella enteritidis* (Dewaele *et al.*, 2011) y su ausencia en producto fresco es un buen indicador de

la inocuidad del producto y del ambiente en el cual fue cultivado y procesado (Yi *et al.*, 2021). Específicamente, la cepa *E. coli* ATCC 25922 utilizada es una cepa de control de calidad secuenciada del genoma completo que no produce verotoxina y es considerada una cepa de control para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y de calidad, tanto en el campo farmacéutico como en la industria alimentaria (ATCC, 2008). El RTCA: Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos (Poder Ejecutivo, 2018), dicta que tanto en vegetales “frescos” como en los “pelados y cortados, empacados” debe de haber ausencia / 25 g de la cepa patógena de este microorganismo *E.coli* O157:H7, mas no establece ningún parámetro adicional.

Las reducción microbiológica de *E. coli* alcanzada por cada tratamiento desinfectante sobre los repollos inoculados, se muestran en el cuadro V a continuación.

**Cuadro V.** Reducción microbiológica alcanzada después de someter muestras de repollo inoculadas con *E. coli* a tratamientos desinfectantes con cloro, ácido peracético, peróxido de hidrógeno y agua por 3 tiempos de contacto distintos.

<b>Tratamientos desinfectantes</b>	<b>Promedios de la reducción microbiológica alcanzada (log UFC/g)*</b>
Ácido peracético (80 ppm) 1 min	1,8 ± 0,1 a
Cloro (200 ppm) 10 min	1,4 ± 0,1 ab
Ácido peracético (80 ppm) 5 min	1,27 ± 0,02 ab
Peróxido de hidrógeno (50 ppm) 1 min	1,2 ± 0,1 ab
Ácido peracético (80 ppm) 10 min	1,18 ± 0,03 ab
Cloro (200 ppm) 5 min	1,2 ± 0,1 ab
Peróxido de hidrógeno (50 ppm) 5 min	1,0 ± 0,1 b
Cloro (200 ppm) 15 min	0,9 ± 0,1 bc
Peróxido de hidrógeno (50 ppm) 10 min	0,8 ± 0,1 bcd
Agua 5 min (tratamiento control)	0,4 ± 0,1 cd
Agua 10 min (tratamiento control)	0,3 ± 0,1 cd
Agua 1 min (tratamiento control)	0,26 ± 0,02 d

\*Los promedios se muestran con sus intervalos de confianza respectivos a un 95% de confianza (n=3).

Según los resultados obtenidos se determinó que, sin importar el tiempo de contacto del producto con el agua, el nivel de reducción microbiológica va a ser el mismo, ya que los tres tiempos a los que se evaluó el tratamiento control, no presentaron diferencias significativas entre sí. Consecuentemente, un tratamiento con solamente agua potable podría remover en promedio 0,32 log UFC/g de *E. coli* aproximadamente.

Los primeros siete tratamientos desinfectantes evaluados fueron significativamente diferentes de la reducción microbiológica alcanzada por el agua y aunque ninguno de estos pudo ser considerado como eficaz ya que no se lograron alcanzar los 3 log UFC/g esperados, se podrían considerar los óptimos para probar su efectividad bajo condiciones comerciales y sobre otros microorganismos específicos como *L. monocytogenes* o *Salmonella* sp. en un estudio futuro. Dentro de estos están el ácido peracético en sus 3 tiempos de contacto (1 min, 5 min y 10 min), el cloro a los 5 y 10 min, y el peróxido de hidrógeno a 1 y 5 min.

De manera similar, en un estudio donde se evaluó la reducción de *E. coli* O157:H7 en repollo rallado con diferentes desinfectantes, al probar concentraciones de hasta 2% de peróxido de hidrógeno, de 450 ppm de cloro y de 50 ppm de ácido peracético por 1 min, se obtuvo una reducción menor a 1 log UFC/g (Hyun-Hee *et al.*, 2014), a pesar de que este estudio utilizó el patógeno y no el indicador.

El tiempo de contacto es un factor limitante del proceso de desinfección, ya que a nivel industrial es necesario que sea lo más reducido posible, es decir, de 30 segundos a unos pocos minutos (Banach *et al.*, 2015). Además, los tiempos de exposición de la bacteria al agente son de vital importancia para mantener la calidad del producto. Las frutas y vegetales tienen diferentes características fisiológicas. Un tratamiento desinfectante de tiempo excesivo puede conducir a la pérdida de atributos nutricionales y sensoriales como el color y la textura de las hojas (Chang, 2015).

Los resultados permitieron observar que no se detectaron diferencias significativas entre las reducciones alcanzadas en los tiempos de contacto probados para cada uno de los tratamientos desinfectantes. La reducción alcanzada en un tiempo de 15 min de inmersión en cloro, no tuvo diferencias significativas en comparación con un tiempo de 5 min. De la misma

forma, reducciones en tiempos de 1 y 10 min de contacto con peróxido de hidrógeno, y tiempos de 1 y 10 min de contacto con ácido peracético, no mostraron diferencias significativas entre sí. Por lo tanto, el utilizar el ácido peracético durante 1 min, el peróxido de hidrógeno por 1 min y el cloro por 5 min serían los tratamientos más eficientes en cuanto a su rapidez. No obstante, al examinar los resultados de manera práctica, es necesaria la ampliación del estudio para determinar las condiciones a nivel industrial en las que se puede potenciar la acción de cada desinfectante sin afectar significativamente los requisitos a nivel operativo.

A nivel de costos se tiene que el cloro es el desinfectante más barato de los 3, sin embargo, es el que requiere un mayor tiempo de acción para obtener los mismos resultados que los otros. El peróxido de hidrógeno por su parte es más costoso que el cloro, pero más económico que el ácido peracético, por lo que a nivel de costo – eficiencia (por el tiempo de contacto de 1 min) sería el desinfectante más adecuado. No obstante, es aquí donde se debe hacer énfasis a los productores en que la eficacia del desinfectante no solo se mide mediante la reducción microbiológica, también se debe considerar la seguridad química y microbiológica del producto que se utiliza, el efecto sobre el valor nutricional y sensorial del producto a desinfectar, la relación costo – eficacia del tratamiento y la inversión inicial necesaria para su aplicación (Banach *et al.*, 2015). Por lo tanto, cada productor debe de realizar un análisis detallado antes de implementar o cambiar su proceso de desinfección.

Aun cuando en este estudio no se logra obtener un resultado concluyente, al comparar los resultados del cloro y el peróxido de hidrógeno en previas investigaciones, se ha demostrado que la inactivación de *E. coli* requiere una exposición mucho mayor (concentración y tiempo de contacto) al peróxido de hidrógeno que al cloro libre (Van Haute *et al.*, 2015). Debido a la fuerte interacción del peróxido de hidrógeno con la materia orgánica en el agua de lavado, se da un rápido consumo y una cinética lenta de desinfección, por lo que se requiere un alto residuo y una alta demanda de desinfectante para lograr una desinfección exitosa (Banach *et al.*, 2015). Sin embargo, se debe considerar que, si se decide optar por el uso del cloro, al exceder concentraciones de 200 ppm se estaría incumpliendo la

dosis máxima establecida por la FDA (FDA, 2022b) y es posible que aparezcan manchas amarillas sobre el repollo (Hyun-Hee *et al.*, 2014).

El ácido peracético es un oxidante soluble en agua con gran potencial como agente antimicrobiano en el agua de lavado (Van Haute *et al.*, 2015; Vandekinderen *et al.*, 2009). Ha ganado interés como una alternativa a los desinfectantes a base de cloro porque no genera subproductos dañinos y termina descomponiéndose en ácido acético, agua y oxígeno (Joshi *et al.*, 2013). Además, se ha reportado que este no se ve afectado por la presencia de otros compuestos orgánicos en el agua (Joshi *et al.*, 2013; Banach *et al.*, 2020), ya que su nivel de reactividad es menor en comparación con el cloro y el peróxido de hidrógeno (Banach *et al.*, 2015). Los perácidos se mantienen estables bajo condiciones de alta carga orgánica, mientras que el hipoclorito es más susceptible a degradación bajo esas condiciones (Gombas *et al.*, 2017), razón por la cual pudo haber obtenido una reducción microbiológica ligeramente más alta en comparación con los otros desinfectantes. Incluso a una concentración menor de 50 ppm, se ha visto que el ácido peracético es insensible a la presencia de sustancias orgánicas y es capaz de mantener la eficacia antimicrobiana (Davidson *et al.*, 2017).

No obstante, Joshi *et al.*, (2013) al realizar una recopilación de resultados de las desinfecciones realizadas con ácido peracético a la concentración máxima permitida por la FDA de 80 ppm, informa que las reducciones de bacterias aerobias, coliformes, levaduras y mohos en producto fresco como el repollo, son menores a 1,5 log UFC/g. Por lo tanto, si se desea aumentar esta reducción es necesario enfocar la metodología de las investigaciones en lograr un mejor contacto entre el agente desinfectante y los sitios de unión microbiana en las superficies de los productos.

Además, para ampliar la efectividad de los desinfectantes es necesario estudiar sobre el efecto del uso combinado de los agentes, ya que muchos tratamientos individuales por sí solos no son adecuados para garantizar la inocuidad de los alimentos (Joshi *et al.*, 2013).

Es por esto que, las estrategias de desinfección como tales, deben centrarse en la prevención de la contaminación cruzada en los tanques de lavado, en lugar de garantizar la inocuidad de los productos como resultado de la descontaminación. Gil *et al.* (2015), plantea

que las medidas preventivas y las estrategias de control tanto a nivel precosecha como postcosecha pueden enfocarse en tres puntos: (1) las intervenciones a nivel de gestión, en donde se dé la creación de una cultura operativa de inocuidad alimentaria comprometida con la aplicación de las estrategias de control preventivo, como lo son las BPA, las BPM y las buenas prácticas de higiene y los procedimientos operativos de limpieza y desinfección; (2) las intervenciones a nivel de infraestructura, mediante la adquisición y el control de equipos, herramientas y utensilios necesarios para el adecuado de procesamiento y desinfección y (3) las intervenciones a nivel de la desinfección como tal, mediante la regulación de los químicos y procesos físicos necesarios para que esta sea eficiente.

Además, a nivel de desinfección el mantener la calidad del agua durante todo el procesamiento es la principal herramienta para evitar la posible contaminación entre productos limpios y contaminados, ya que una vez que el producto se contamina, es poco probable que la descontaminación del producto final logre remover los microorganismos adheridos a este (Banach *et al.*, 2015). Esto se debe a los mecanismos protectores de microorganismos antes mencionados, como la internalización en plantas en donde las bacterias tienen la capacidad de penetrar los tejidos internos y residir en espacios extracelulares, así como a la formación de biofilms (Godfrey *et al.*, 2010). Esta capacidad representa una amenaza para la inocuidad de los alimentos en la producción de cultivos, ya que las bacterias internalizadas son difíciles de eliminar con las prácticas de saneamiento estándares (Wright *et al.*, 2017).

## 6. CONCLUSIONES

Al comparar la calidad del repollo recién cosechado en tres zonas de distinta altitud de la finca estudiada, se concluye que no existen diferencias significativas para el recuento total aerobio, el recuento de mohos y levaduras y el recuento de *E. coli* y coliformes totales. Además, no se detecta la presencia de *L. monocytogenes* en ninguno de los repollos provenientes de las tres zonas. Esto se atribuye a la buena implementación de las prácticas agrícolas y a la aplicación de prácticas agroconservacionistas en la finca en estudio; estas evitan la erosión excesiva del suelo y la formación de acumulaciones de agua y materia orgánica en la zona baja del terreno que podrían haber cambiado los resultados obtenidos. Sin embargo, la detección de *L. ivanovii* en los repollos de la zona alta y media sugiere la existencia de condiciones ideales para la proliferación de *L. monocytogenes*.

Seguidamente, al evaluar la reducción del recuento total aerobio como indicador microbiológico en el repollo, antes y después de cada una de las etapas de desinfección, se tiene que ninguno de los tratamientos logra una reducción microbiológica superior a 1 log UFC/g. Por lo tanto, el sugerir que se omita alguno de los procesos de desinfección sería injustificado, considerando que ninguno de los tratamientos logra un parámetro de reducción microbiológica de 3 log UFC/g. No obstante, se hace hincapié en la necesidad de ampliar el estudio, probando la acción de los desinfectantes contra otros microorganismos no deseados.

Finalmente, al comparar la eficacia del peróxido de hidrógeno a 50 ppm y el ácido peracético a 80 ppm durante 1 min, 5 min y 10 min, y del cloro a 200 ppm durante 5, 10 y 15 min por medio de la reducción de *E. coli* ATCC 25922 inoculada en repollos, no se detectan diferencias significativas en las reducciones alcanzadas entre los diferentes tiempos de contacto de cada uno de los desinfectantes. Además, ninguno de los desinfectantes logra una reducción significativamente mayor que los otros. El peróxido de hidrógeno a nivel de costo – eficiencia (por ser el segundo más costoso, pero tener un tiempo de contacto de 1 min) sería el desinfectante con resultados más favorables a nivel de este estudio. Sin embargo, nuevamente se hace necesaria la ampliación del estudio hacia el efecto de los tratamientos sobre otros patógenos y la valoración multifactorial de parte de los productores a la hora de

diseñar su sistema de desinfección: acción antimicrobiana, proceso de aplicación, precio, requerimientos y consecuencias sobre la calidad y valor nutricional del producto.

## 7. RECOMENDACIONES

- El repollo, como producto inocuo y de calidad listo para consumir, debe de ser cultivado y cosechado bajo buenas prácticas de agricultura y con prácticas agroconservacionistas que garanticen que aún con factores como la inclinación del terreno y la erosión natural (como los presentes en la finca de estudio), no se generen fuentes de contaminación cruzada como acumulaciones de agua, desplazamiento de materia orgánica concentrada y proliferación de microorganismos no deseados.
- Es necesario restringir el ingreso de animales o personas a las zonas de cultivo y mantener un correcto sistema de prevención de plagas para prevenir la presencia de *E. coli* en los cultivos, tal como se observó en la finca.
- Para evitar la proliferación específicamente de *L. monocytogenes*, como parte de las buenas prácticas de agricultura se debe revisar cualquier posible fuente que pueda generar contaminación cruzada a la zona de cultivo, como el uso de herramientas no desinfectadas (especialmente si fueron usadas en otros ambientes), la compra de semillas no descontaminadas o la aplicación de abono orgánico no tratado.
- La mejor manera de garantizar la inocuidad del producto a nivel industrial es prevenir la entrada de patógenos antes que buscar cómo eliminarlos. A nivel de procesamiento, las reducciones del recuento total aerobio obtenidas con los tratamientos desinfectantes estudiados, demostraron que la efectividad real de los procesos de control de microorganismos aplicados en la industria es más baja que la supuesta.
- Monitorear periódicamente la concentración del desinfectante en el agua es una medida de control necesaria para garantizar la eficacia de la desinfección. Esto se puede lograr mediante la adquisición de equipos o materiales indicadores que permitan garantizar que en las etapas de desinfección se mantiene el agente en la concentración ideal desde el inicio hasta el final del proceso y si es necesario adoptar alguna medida para que esto se dé o se mantenga.
- Acidificar el medio y mantener un control del pH durante las desinfecciones con cloro permitirá que este se encuentre en su forma más efectiva contra microorganismos, conocida como ácido hipocloroso, la cual se maximiza en rangos de pH entre 6,5 y

7,0. Entre mayor sea la concentración de ácido hipocloroso más eficaz será la desinfección.

- Ampliar el estudio para demostrar si los tratamientos desinfectantes en la industria son capaces de lograr una reducción microbiológica más significativa sobre un grupo específico de microorganismos como los coliformes, los mohos o las levaduras. Esto permitirá conocer más sobre el espectro desinfectante del tratamiento, sus fortalezas y debilidades y así facilitar la toma de decisiones para los encargados de producción.
- Ampliar el estudio de la efectividad de los desinfectantes al comprobar su acción contra microorganismos patógenos como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella enterica* a diferentes concentraciones y en diferentes tiempos, como una forma de estudiar el nivel de inactivación logrado por los tratamientos, ante una amenaza a la inocuidad del producto fresco.
- Analizar el efecto de diferentes rangos de pH y temperatura sobre los procesos de desinfección, considerando los efectos más favorecedores que se han evidenciado en otros estudios al usar rangos de pH más bajos como en el caso del cloro o de altas temperaturas como en el caso del peróxido de hidrógeno.
- Analizar el efecto de mayores tiempos de contacto sobre los procesos de desinfección industrial considerando la degradación de los agentes microbianos en el tiempo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C. and Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 121–129. [10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013)
- Acosta, V., Van Pelt, S., Moore-Kucera, J., Baddock, M. y Zobeck, T. (2015). Microbiology of wind-eroded sediments: Current knowledge and future research directions. *Aeolian Research*, 18, 99-113. .
- Andrews, W. y Hammack, T. (2022). Chapter 1: Food Sampling/Preparation of Sample Homogenate. En FDA (Food and Drugs Administration) (Ed.), *BAM (Bacteriological Analytical Manual)*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-1-food-samplingpreparation-sample-homogenate>.
- Aryal, M. y Muriana, P. (2019). Efficacy of Commercial Sanitizers Used in Food Processing Facilities for Inactivation of *Listeria monocytogenes*, *E. Coli* O157:H7, and *Salmonella* Biofilms. *Foods*, 8 (639). <https://www.mdpi.com/2304-8158/8/12/639>.
- ATCC. (American Type Culture Collection). (2008). *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers 25922™. <https://www.atcc.org/products/25922>
- Banach, J., Sampers, I., Van Haute, S., y Van Der Fels-Klerx, H. (2015). Effect of Disinfectants on Preventing the Cross-Contamination of Pathogens in Fresh Produce Washing Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(8), 8658–8677. <https://www.mdpi.com/1660-4601/12/8/8658>.
- Banach, J., Van Bokhorst-van de Veen, H., Van Overbeek, L., van der Zouwen, P., Zwietering, M. y van der Fels-Klerx, H. (2020). Effectiveness of a peracetic acid solution on *Escherichia coli* reduction during fresh-cut lettuce processing at the laboratory and industrial scales. *International Journal of Food Microbiology* 321. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108537>.
- Barquero, M. (2021). Horticultores de Cartago van a vender sus productos a Guanacaste para sortear la pandemia. *La Nación*. <https://www.nacion.com/economia/agro/horticultores-de-cartago-van-a-vender-sus/Z4G2G3THWZDJPS7KWLPABDQ2I/story/>
- Barrera, M., Blenkinsop, R. y Warriner, K. (2012). The effect of different processing parameters on the efficacy of commercial post-harvest washing of minimally processed spinach and shredded lettuce. *Food Control*, 25(2), 745–751. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.013>

- Bejarano, N. y Carrillo, L. (2007). Capítulo 7: Frutas y Hortalizas. En L. Carrillo y M.C. Audisio (Ed), *Manual de microbiología de Alimentos*, 71 - 83. [https://www.academia.edu/7757730/Bejarano\\_NV\\_Carrillo\\_L\\_71\\_FRUTAS\\_y\\_HORTALIZAS](https://www.academia.edu/7757730/Bejarano_NV_Carrillo_L_71_FRUTAS_y_HORTALIZAS)
- BioMérieux. (s.f.). *API®/ID32 Método de identificación manual estandarizado*. <https://www.biomerieux.es/microbiologia-industrial/apirid32-1>
- Cai, S., Worobo, R. y Snyder, A. (2018). Outgraded produce variably retains surface inoculated *Escherichia coli* through washing. *International journal of food microbiology*, 269, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.012>
- Cantwell, M. and T. Suslow. 2002. Lettuce, Crisphead: Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. [https://postharvest.ucdavis.edu/Commodity\\_Resources/Fact\\_Sheets/Datastores/Vegetables\\_English/?uid=8&ds=799#:~:text=The%20most%20common%20decays%20found,Erwinia%2C%20Pseudomonas%2C%20Xanthomonas](https://postharvest.ucdavis.edu/Commodity_Resources/Fact_Sheets/Datastores/Vegetables_English/?uid=8&ds=799#:~:text=The%20most%20common%20decays%20found,Erwinia%2C%20Pseudomonas%2C%20Xanthomonas)
- Center for Food Safety. (2014). *Microbiological Guidelines for Food (For ready-to-eat food in general and specific terms)*. Hong Kong: Risk Assessment Section, Centre for Food Safety. [https://www.cfs.gov.hk/english/food\\_leg/files/food\\_leg\\_Microbiological\\_Guidelines\\_for\\_Food\\_e.pdf](https://www.cfs.gov.hk/english/food_leg/files/food_leg_Microbiological_Guidelines_for_Food_e.pdf)
- Chang, J. (2015). *Food Safety Research for Fresh Produce*. Purdue University. [https://docs.lib.purdue.edu/open\\_access\\_theses/1098/](https://docs.lib.purdue.edu/open_access_theses/1098/)
- Chen, J., Regan, P., Laksanalamai, P., Healey, S., y Hu, Z. (2017). Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness*, 6(3), 97–120. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453017300113>
- Curutiu, C., Iordache, F., Gurban, P., Lazar, V. y Chifiriuc, M. (2019). Main Microbiological Pollutants of Bottled Waters and Beverages. *Bottled and Packaged Water*, 403–422. doi:10.1016/b978-0-12-815272-0.00014-3
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2008). Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/sterilization/peracetic-acid.html#:~:text=Only%20limited%20information%20is%20available,and%20other%20metabolites654%2C%20726>.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2022a) Lettuce, Other Leafy Greens, and Food Safety. <https://www.cdc.gov/foodsafety/communication/leafy-greens.html#outbreaks>
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2022b). *E. coli* Outbreak Linked to Packaged Salads. <https://www.cdc.gov/ecoli/2021/o157h7-12-21/index.html>

- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2022c). Listeria Outbreak Linked to Packaged Salads Produced by Fresh Express. <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/packaged-salad-12-21-b/index.html>
- Davidson, G., Kaminski, C. y Ryser, E. (2017). Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 during pilot-scale processing of iceberg lettuce using flume water containing peroxyacetic acid-based sanitizers and various organic loads. *International Journal of Food Microbiology*, 248, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.006>.
- Degaga, B., Sebsibe, I., Belete, T. y Asmamaw, A. (2022). Microbial Quality and Safety of Raw Vegetables of Fiche Town, Oromia, Ethiopia. *Journal of Environmental and Public Health*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2556858>
- Dewaele, I., Ducatelle, R., Herman, L., Heyndrickx, M., y De Reu, K. (2011). Sensitivity to disinfection of bacterial indicator organisms for monitoring the *Salmonella* Enteritidis status of layer farms after cleaning and disinfection. *Poultry science*, 90(6), 1185–1190. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01178>
- Durán, A., González, M., Mora, D. y Vargas, G. (2016). Evaluación de los riesgos de contaminación microbiológica en los sistemas hortícolas, Valle Central Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 40(2): 129-146. [http://www.mag.go.cr/rev\\_agr/v40n02\\_129.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_agr/v40n02_129.pdf)
- ECOLAB. (2020). A Review of Efficacy Testing of Disinfectants – The Relevance of a Wet Contact Time. <https://www.ecolab.com/articles/2020/03/a-review-of-efficacy-testing-of-disinfectants>
- EFSA (European Food Safety Authority). (2016). Outcome of the consultation with Member States and EFSA on the basic substance application for hydrogen peroxide for use in plant protection as fungicide and bactericide in seed treatment and for disinfecting cutting tools. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1091>
- Elhariry, H. (2011). Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: cabbage and lettuce. *Food microbiology*, 28(7), 1266–1274. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.05.004>.
- EPA (Environmental Protection Agency). (2019). Standard Operating Procedure for Germicidal and Detergent Sanitizing Action of Disinfectants Test: MB-27-03. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2020-02/documents/mb-27-03.pdf>
- Erickson, M. (2010). Microbial risks associated with cabbage, carrots, celery, onions, and deli salads made with these produce items. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 602-619. <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1541-4337.2010.00129.x>.
- Erkmen, O. y Bozoglu, T.F. (2016). Indicators of Foodborne Pathogens. *Food Microbiology: Principles into Practice*. John Wiley & Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119237860.ch12>

- Eskin, M. (2021). *Quality and Preservation of Vegetables*. CRC Press. <https://books.google.co.cr/books?id=we0rEAAAQBAJ&pg=PT254&dq=cabbage+harvest&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwidp9rP4bT1AhVcSDABHVteAqMQ6AF6BAgGEAI#v=onepage&q=cabbage%20harvest&f=false>
- Espigol, A., Del Carmen, D., Esguerra, E., Lualhati, R y Alcantara, G. (2018). Microbiological quality of selected organically-grown fruits and vegetables in Luzon, Philippines. *International Food Research Journal*; 25(6), 2337-2344, [http://www.ifrj.upm.edu.my/25%20\(06\)%202018/\(15\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/25%20(06)%202018/(15).pdf)
- Fallahzadeh, R., Omid, F., Ghadirian, D., Fallahzadeh, A. y Reza Nafisi, A. (2021) Applicability of Escherichia coli as an Indicator for Assessing Quality of Disinfectants and Antiseptic During the COVID-19 Pandemic. *Journal of Environmental Health and Sustainable Development*, 6(2), 1267-74. <https://publish.kne-publishing.com/index.php/JEHS/article/view/6538/6532>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2017). Costa Rica se une a la celebración del Día Internacional de las Montañas 2017. <https://www.fao.org/costarica/noticias/detail-events/ru/c/1072462/FAO> (Food and Agriculture Organization of the United Nations) y WHO (World Health Organization). (2008). Benefits and Risks of the Use of Chlorine-containing Disinfectants in Food Production and Food Processing: Report of a Joint FAO/WHO Expert Meeting. <https://www.fao.org/3/i1357e/i1357e.pdf>
- FDA (Food and Drugs Administration). (2017). Control of Listeria monocytogenes in Ready-To-Eat Foods: Guidance for Industry. <https://www.fda.gov/files/food/published/Draft-Guidance-for-Industry--Control-of-Listeria-monocytogenes-in-Ready-To-Eat-Foods-%28PDF%29.pdf>
- FDA (Food and Drugs Administration). (2018). Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-guide-minimize-microbial-food-safety-hazards-fresh-fruits-and-vegetables>
- FDA (Food and Drug Administration). (2021). Outbreak Investigation of Listeria monocytogenes: Dole Packaged Salad (December 2021). <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/outbreak-investigation-listeria-monocytogenes-dole-packaged-salad-december-2021>
- FDA (Food and Drug Administration). (2022a). CFR - Code of Federal Regulations Title 21: subchapter b - food for human consumption. Part 173 -- secondary direct food additives permitted in food for human consumption. Subpart D - Specific Usage Additives <https://www.accessdata.fda.gov/SCRIPTs/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=173.315&SearchTerm=chemicals>

- FDA (Food and Drug Administration). (2022b). CFR - Code of Federal Regulations Title 21: Subchapter B - Food For Human Consumption. Part 178 -Indirect Food Additives: Adjuvants, Production Aids, And Sanitizers. Subpart B - Substances Utilized To Control the Growth of Microorganisms. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=178.1010>
- FDA (Food and Drug Administration). (2022c). Dole Fresh Vegetables, Inc. Announces Voluntary Recall for Certain Salads Processed at its Springfield, OH and Soledad, CA Facilities and Containing Iceberg Lettuce Due to Possible Health Risk from *Listeria monocytogenes*. <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts/dole-fresh-vegetables-inc-announces-voluntary-recall-certain-salads-processed-its-springfield-oh-and>
- FDA (Food and Drug Administration). (2022d). FDA Issues Country-Wide Import Alert for Enoki Mushrooms from the Republic of Korea. [https://www.fda.gov/food/cfsan-constituent-updates/fda-issues-country-wide-import-alert-enoki-mushrooms-republic-korea#:~:text=In%20fiscal%20year%202021%2C%20FDA,monocytogenes\)](https://www.fda.gov/food/cfsan-constituent-updates/fda-issues-country-wide-import-alert-enoki-mushrooms-republic-korea#:~:text=In%20fiscal%20year%202021%2C%20FDA,monocytogenes)).
- Food Safety News. (2020). Farms growing red cabbage and iceberg lettuce for Fresh Express are suspects in *Cyclospora* outbreak. <https://www.foodsafetynews.com/2020/08/farms-growing-red-cabbage-and-iceberg-lettuce-for-fresh-express-are-suspect-in-cyclospora-outbreak/>
- Food Standards Australia New Zealand. (2016). *Compendium of Microbiological Criteria for Food*. [https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/Compendium%20of%20Microbiological%20Criteria/Compendium\\_revised-jan-2018.pdf](https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/Compendium%20of%20Microbiological%20Criteria/Compendium_revised-jan-2018.pdf)
- Fornaris, G. (2014). Cosecha y manejo postcosecha. En: *Conjunto Tecnológico para la Producción de Repollo*. Estación Experimental Agrícola. <https://www.upr.edu/eea/wp-content/uploads/sites/17/2016/04/12.-REPOLLO-COSECHA-Y-MANEJO-POSTCOSECHA-v.-2014.pdf>
- Gadelha, JR., Allende, A., Lopez-Gálvez, F., Fernández, P., Gil, M. y Egea, JA. (2019). Chemical risks associated with ready-to-eat vegetables: quantitative analysis to estimate formation and/or accumulation of disinfection byproducts during washing. *EFSA Journal*. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.2903/j.efsa.2019.e170913>
- Galanakis, C. (2021). *Food Losses, Sustainable Postharvest and Food Technologies*. Academic Press. <https://books.google.co.cr/books?id=B-P7DwAAQBAJ&pg=PA95&dq=DISINFECTANT+ON+THE+QUALITY+LOSS+OF+FR+ESH+CUT+PRODUCE&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwi5v7S-j-j3AhUdRjABHY--AagQ6AF6BAgKEAI#v=onepage&q=DISINFECTANT%20ON%20THE%20QUALITY%20LOSS%20OF%20FRESH%20CUT%20PRODUCE&f=false>
- Gan, L., Mao, P., Jiang, H., Zhang, L., Liu, D., Cao, X., Wang, Y., Sun, H., Huang, Y. y Ye, C. (2020). Two Prevalent *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* Clonal Strains With Different

Virulence Exist in Wild Rodents and Pikas of China. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2020.00088/full>

Gawande, H., Dhotre, A., M., Shendurshe y M., Khodwe. (2013). Peroxyacetic Acid: A Potent Food Industry Sanitizer. *Indian Food Industry Magazine*, 32 (3), 26-30, [https://www.researchgate.net/profile/Hemant-Gawande-2/publication/327100509\\_Peroxyacetic\\_Acid\\_A\\_Potent\\_Food\\_Industry\\_Sanitizer/links/5c8f743445851564fae4e04a/Peroxyacetic-Acid-A-Potent-Food-Industry-Sanitizer.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hemant-Gawande-2/publication/327100509_Peroxyacetic_Acid_A_Potent_Food_Industry_Sanitizer/links/5c8f743445851564fae4e04a/Peroxyacetic-Acid-A-Potent-Food-Industry-Sanitizer.pdf)

Giaouris E. y Simões M. (2018). Chapter 11. Pathogenic biofilm formation in the food industry and alternative control strategies. En: *Foodborne Diseases* (Academic Press, 309–377). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811444-5.00011-7>

Gil, M., Selma, M., López-Gálvez, F. y Allende, A. (2009). Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 134(1-2), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.021>

Gil, M. I., Selma, M. V., Suslow, T., Jacxsens, L., Uyttendaele, M., Allende, A. (2015). Pre- and postharvest preventive measures and intervention strategies to control microbial food safety hazards of fresh leafy vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(4), 453-468. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24915374/>

Godfrey, S., Mansfield, J., Corry, D., Lovell, H., Jackson, R. y Arnold, D. (2010). Confocal imaging of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* colony development in bean reveals reduced multiplication of strains containing the genomic island PPHGI-1. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 23(10), 1294–1302. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-10-0114>

Gombas, D., Luo, Y., Brennan, J., Shergill, G., Petran, R., Walsh, R. y Deng, K. (2017). Guidelines To Validate Control of Cross-Contamination during Washing of Fresh-Cut Leafy Vegetables. *Journal of Food Protection*, 80(2), 312–330. <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/80/2/312/175032/Guidelines-To-Validate-Control-of-Cross>

Grudén, M., Mogren, L. y Alsanius, B. (2016). Processing of green leaf produce: microorganisms associated with process water and produce. *Acta Horticulturae*. 373-380. [https://www.researchgate.net/publication/311336792\\_Processing\\_of\\_green\\_leaf\\_produce\\_microorganisms\\_associated\\_with\\_process\\_water\\_and\\_produce](https://www.researchgate.net/publication/311336792_Processing_of_green_leaf_produce_microorganisms_associated_with_process_water_and_produce)

Guevara, L., Arenas, M., Martínez de la Peña, C., Silva, J., y Guevara, M. (2019). The Role of Pathogenic *E. coli* in Fresh Vegetables: Behavior, Contamination Factors, and Preventive Measures. *International Journal of Microbiology*, 2019.. <https://doi.org/10.1155/2019/2894328>

- Gullian, M. y Sánchez, M. (2018). Growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 on the epicarp of fresh vegetables and fruits. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1), 104-111. [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822018000100104](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822018000100104)
- Guillet, C., Join, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M., Bielecka, M., Scortti, M., Disson, O., Berche, P., Vazquez, J., Lortholary, O., Lecuit, M. (2010). Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), 136-138. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2874378/#:~:text=ivanovii%20and%20human%20mesenteric%20adenitis,our%20report%20shows%20that%20L>
- Halkman, H. y Halkman, A. (2014). Indicator Organisms. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 358–363. doi:10.1016/b978-0-12-384730-0.00396-7
- Hitchins, A., Jinneman, K. y Chen, Y. (2001). Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods En FDA (Food and Drugs Administration) (Ed.), *BAM (Bacteriological Analytical Manual)*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>
- Holvoet, K., Jacxsens, L., Sampers, I., and Uyttendaele, M. (2012). Horticultural Assessment Scheme: Insight in prevalence and distribution of microbial contamination to evaluate water management in fresh produce processing industry. *J. Food Protec* 75:671–681. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22488054/>
- Huang, K., Tian, Y., Tan, J., Salvi, D., Karwe, M., y Nitin, N. (2020). Role of contaminated organic particles in cross-contamination of fresh produce during washing and sanitation. *Postharvest Biology and Technology*, 168. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925521419313675#:~:text=The%20presence%20of%20organic%20matter,microbial%20contamination%20to%20fresh%20produce>.
- Hyun-Hee, L., Seok-In, H. y Dongman, K. (2014). Microbial reduction efficacy of various disinfection treatments on fresh-cut cabbage. *Korea Food Research Institute*, 2(5), 585-590. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fsn3.138>
- ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). (2019). Guía para la toma, transporte y envío de muestras para análisis y diagnóstico fitosanitario. <https://www.ica.gov.co/getattachment/Areas/laboratorios/Lab-Nacional-de-Diagnostico-Fitosanitario/guia-toma-de-muestra.pdf.aspx?lang=es-CO>
- Institute of Food Technologists (IFT). (2003). Chapter 4: Microbiological challenge testing. En: *Comprehensive reviews in food science and food safety* (46-50). <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00051.x>

- Ilic, S. (2011). *Post-harvest interventions and food safety of leafy green vegetables*. The Ohio State University. [https://etd.ohiolink.edu/apexprod/rws\\_etd/send\\_file/send?accession=osu1313509920&disposition=inline](https://etd.ohiolink.edu/apexprod/rws_etd/send_file/send?accession=osu1313509920&disposition=inline)
- INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos). (2020). Encuesta Nacional Agropecuaria 2019: Resultados Generales de la Actividad Agrícola y Forestal. San José, Costa Rica, Setiembre 2020. [https://admin.inec.cr/sites/default/files/media/reena-cultivos2019\\_2.pdf](https://admin.inec.cr/sites/default/files/media/reena-cultivos2019_2.pdf)
- Jiménez, E. (2009). *Métodos de Control de Plagas*. Universidad Nacional Agraria: Facultad de Agronomía. <https://cenida.una.edu.ni/relectronicos/RENH10J61me.pdf>
- Johnston, L., Jaykus, L., Moll, D., Anciso, J., Mora, B., y Moe, C. (2006). A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *International journal of food microbiology*, 112(2), 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.002>
- Joshi, K., Mahendran, R., Alagusundaram, K., Norton, T., y Tiwari, B. K. (2013). Novel disinfectants for fresh produce. *Trends in Food Science & Technology*, 34(1), 54–61. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224413001830>
- Kim, M. y Cheigh, C. (2022) Microbiological contamination of fresh-cut produce in Korea. *Food Science Biotechnology*, 31, 79–87. <https://doi-org.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/10.1007/s10068-021-01014-7>
- Komaki, Y., Simpson, A., Choe, J., Plewa, M. y Mitch, W. (2018). Chlorotyrosines versus Volatile Byproducts from Chlorine Disinfection during Washing of Spinach and Lettuce. *Environmental Science & Technology*, 52(16), 9361–9369. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.8b03005>
- Kramer, G. y Doran, M. (2018). Disinfectants and Sanitizers Are Essential to Produce Safety. *Food Safety Magazine*. <https://www.food-safety.com/articles/5975-disinfectants-and-sanitizers-are-essential-to-produce-safety#:~:text=In%20light%20of%20all%20these,use%20of%20disinfectants%20and%20sanitizers.>
- Laborde, L. (2018). Control de *Listeria Monocytogenes* en el Medio Ambiente de Cultivo y Empaque de Hongos. *PennState Extension*. <https://extension.psu.edu/control-de-listeria-monocytogenes-en-el-medio-ambiente-de-cultivo-y-empaque-de-hongos>.
- Lampe, U., Hidalgo, I., Fernandez, F. y Krause, P. (2017). Technical Look on Microbiological Risk Factors in Pre-Harvest Crops. *Wiley Food Science*. <https://www.foodqualityandsafety.com/article/technical-look-microbiological-risk-factors-pre-harvest-crops/3/>

- Lange, H. y Smart, D. (2019). Managing Black Rot of Cabbage and other Crucifer Crops in Organic Farming Systems. eOrganic (Oregon State University) <https://eorganic.org/node/4957#:~:text=Black%20rot%2C%20caused%20by%20the,growers%20for%20over%20100%20years>.
- Lee, J., Daraba, A., Voidarou, C., Rozos, G., Enshasy, H. y Varzakas, T. (2021). Implementation of Food Safety Management Systems along with Other Management Tools (HAZOP, FMEA, Ishikawa, Pareto). The Case Study of *Listeria monocytogenes* and Correlation with Microbiological Criteria. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(9), 2169. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8468768/>
- Li, H., Tajkarimi, M., Osburn, B. (2008). Impact of vacuum cooling on escherichia coli o157:h7 infiltration into lettuce tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 3138–3142. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18344328/>
- Li, D., y Liu, S. (2019). Water Quality Monitoring in Aquaculture. En: Water Quality Monitoring and Management (303–328). doi:10.1016/b978-0-12-811330-1.00012-0
- Linley, E., Denyer, S., McDonnell, G., Simons, C. y Maillard, J. (2012). Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67 (7), 1589–1596. <https://doi.org/10.1093/jac/dks129>
- López, A. (2003). Capítulo 4. Aspectos higiénicos y sanitarios. En: *Manual Para la Preparación y Venta de Frutas y Hortalizas: Del campo al mercado*. Boletín de servicios agrícolas de la FAO. <http://www.fao.org/3/Y4893S/y4893s07.htm>
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). (1991). REPOLLO - Brassica oleracea var. Capitata Brassicae. En: *Aspectos Técnicos sobre Cuarenta y Cinco Cultivos Agrícolas de Costa Rica*. Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola. Ministerio de Agricultura y Ganadería. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-0658repollo.pdf>
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería) (2008). *Buenas prácticas agropecuarias*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/P01-4955.PDF>
- Maturin, L. y Peeler, J. (2001). Chapter 3: Aerobic Plate Count. En FDA (Food and Drugs Administration) (Ed.), *BAM (Bacteriological Analytical Manual)*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count>
- Maina, D., Okinda, N., Mulwa, E. y Revathi, G. (2014). A five year review of API20E bacteria identification system's performance at a teaching hospital, *East African Medical Journal*, 91 (3),73-75. [https://www.researchgate.net/publication/263143525\\_A\\_FIVE\\_YEAR\\_REVIEW\\_OF\\_API\\_20E\\_BACTERIA\\_IDENTIFICATION\\_SYSTEM'S\\_PERFORMANCE\\_AT\\_A\\_TEACHING\\_HOSPITAL](https://www.researchgate.net/publication/263143525_A_FIVE_YEAR_REVIEW_OF_API_20E_BACTERIA_IDENTIFICATION_SYSTEM'S_PERFORMANCE_AT_A_TEACHING_HOSPITAL)

- McEgan, R., Mootian, G., Goodridge, L. D., Schaffner, D. W., y Danyluk, M. D. (2013). Predicting Salmonella populations from biological, chemical, and physical indicators in Florida surface waters. *Applied and environmental microbiology*, 79(13), 4094–4105. <https://doi.org/10.1128/AEM.00777-13>
- Meng, X., Cardenas, L., Donovan, L., Zhang, J., Phil, M., Zhang, F. y Dungait, F. (2016). Soil erosion increases soil microbial activity at the depositional position of eroding slopes. EGU General Assembly, Vienna, Austria. EPSC2016-18526. <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2016EGUGA..1818526M/abstract>
- Miceli, A. y Settanni, L. (2019). Influence of agronomic practices and pre-harvest conditions on the attachment and development of *Listeria monocytogenes* in vegetables. *Annals of Microbiology*. doi:10.1007/s13213-019-1435-6
- Mritunjay, S. K. y Kumar, V. (2017). A study on prevalence of microbial contamination on the surface of raw salad vegetables. *Biotech*, 7(1), 13. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0585-5>
- Murison, J. y Napier, T. (2020). Cabbage growing. Department of Primary Industries. [https://www.dpi.nsw.gov.au/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0005/80168/Cabbage-growing.pdf](https://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0005/80168/Cabbage-growing.pdf)
- Murray, K., Wu, F., Shi, J., Jun Xue, S. y Warriner, K. (2017). Challenges in the microbiological food safety of fresh produce: Limitations of post-harvest washing and the need for alternative interventions. *Food Quality and Safety*, 1(4), 289–301. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx027>
- Nascimento, M. (2009). *Color Atlas of Postharvest Quality of Fruits and Vegetables*. John Wiley & Sons. <https://books.google.co.cr/books?id=hvNCSnihtf8C&pg=PA339&dq=cabbage+harvest&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjs2vjpwOn1AhU6VzABHccJByIQ6AF6BAGKEAI#v=onepage&q=cabbage%20harvest&f=false>
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. (2010). Parameters for Determining Inoculated Pack / Challenge. *Journal of Food Protection*, 73, 140–202. <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/73/1/140/171011/Parameters-for-Determining-Inoculated-Pack>
- Nyenje, M.; Green, E. y Ndip, R. (2012). Biofilm Formation and Adherence Characteristics of *Listeria ivanovii* strains isolated from Ready-to-Eat Foods in Alice, South Africa. *The Scientific World Journal*, 1–7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23365535/>
- Olaimat A. y Holley R. (2012) Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food microbiology*, 32(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.016>.

- Oliveira, M., Usall, J., Viñas, I., Anguera, M., Gatiús, F., y Abadías, M. (2010). Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food microbiology*, 27(5), 679–684. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.008>.
- Ölmez, H. y Kretzschmar, U. (2009). Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *Food Science and Technology*, 42 (3), 686-693. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.001>.
- Pascual, R. (1992). *Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas*. Ediciones Díaz de Santos S.A.
- PIMA (Programa Integral de Mercadeo Agropecuario). (2016). Análisis del consumo de frutas, hortalizas, pescado y mariscos en los hogares costarricenses. <http://www.pima.go.cr/wp-content/uploads/2017/07/Analisis-Consumo.pdf>
- Poder Ejecutivo Federal. (1995). Norma Oficial Mexicana, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos NOM-093-SSA1-1994. Secretaría de Salud. [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4882432&fecha=04/10/1995#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4882432&fecha=04/10/1995#gsc.tab=0)
- Poder Ejecutivo. (2018). Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:17 Alimentos. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de los Alimentos". [http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm\\_texto\\_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=87920&nValor3=114653&strTipM=TC](http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=87920&nValor3=114653&strTipM=TC)
- Poder Ejecutivo. (2004) Reglamento Técnico RTCR 382:2004 Repollo para Consumo en Estado Fresco. [http://www.mag.go.cr/sitio\\_viejo/legislacion/2004/de-31908.pdf](http://www.mag.go.cr/sitio_viejo/legislacion/2004/de-31908.pdf)
- Prazak, M., Murano, A., Mercado, I. y Acuff, R. (2002). Prevalence of *Listeria monocytogenes* during Production and Postharvest Processing of Cabbage. *Journal of Food Protection*, 65(11), 1728–1734. doi:10.4315/0362-028x-65.11.1728
- Preedy, V. (2014). *Processing and impact on active components in food*. Elsevier Science & Technology. <https://www.elsevier.com/books/processing-and-impact-on-active-components-in-food/preedy/978-0-12-404699-3>
- Quang, N. (2021). Soil Microbial Biomass. *Eurofins Agroscience: Sac Ky Hai Dang*. <https://cdnmedia.eurofins.com/apac/media/609711/09-soil-microbial-biomass-leaflet-chon-edit-5sep2021.pdf>
- Rana, K., Dass, A., Srivastav, M. y Choudhary, A. (2014). Advances in Vegetable Agronomy. *Indian Agricultural Research Institute*. [https://www.researchgate.net/publication/330564524\\_Scientific\\_Cultivation\\_of\\_Cabbage\\_Brassica\\_oleracea\\_L\\_var\\_capitata](https://www.researchgate.net/publication/330564524_Scientific_Cultivation_of_Cabbage_Brassica_oleracea_L_var_capitata)

- Raudes, M. y Sagastume, N. (2009). *Manual Conservación de Suelos*. El Zamorano, Honduras: Escuela Agrícola Panamericana. [https://www.se.gob.hn/media/files/media/Modulo\\_3\\_Manual\\_Conseervacion\\_de\\_Suelos.pdf](https://www.se.gob.hn/media/files/media/Modulo_3_Manual_Conseervacion_de_Suelos.pdf)
- Rikolto, V. (2019). *Guía: cultivando repollo con buenas prácticas agrícolas*. <https://international-rikolto.wieni.work/nl/node/2476>
- Rosberg, A.; Darlison, J.; Mogren, L. y Alsanius, B. (2020). Commercial wash of leafy vegetables do not significantly decrease bacterial load but leads to shifts in bacterial species composition. *Food Microbiology*, 94, 103667. doi:10.1016/j.fm.2020.103667
- Salfinger, N. y Tortorello, M. (2015). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Apha Press. <https://doi.org/10.2105/MBEF.0222>
- Sancho, F. y Villatoro, M. (2005). Efecto de la posición en la pendiente sobre la productividad de tres secuencias de suelos en ambientes ústicos de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 29(3): 159-174. <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/13782/6789-9357-1-PB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sandle, T. (2020). Disinfectant standards: what you need to know. *Infection Prevention & Control*. <https://www.clinicalservicesjournal.com/story/32875/disinfectant-standards-what-you-need-to-know>
- Scott, V., Swanson, K., Freier, T., Pruett, W. Jr, Sveum, W., Hall, P., Smoot, L. y Brown, D. (2005). Guidelines for conducting *Listeria monocytogenes* challenge testing of foods. *Food protection trends*, 25, 818-825. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301047377>
- Sharma, A., Rathore, J., Ali, A., Qadri, I. y Hussain, S. (2018). Major diseases and pathogen ecology of cabbage. *The Pharma Innovation Journal*, 7(7), 574–578. <https://www.thepharmajournal.com/archives/2018/vol7issue7/PartJ/7-7-40-690.pdf>
- Shen, C., Luo, Y., Nou, X., Wang, Q., y Millner, P. (2013). Dynamic Effects of Free Chlorine Concentration, Organic Load, and Exposure Time on the Inactivation of Salmonella, Escherichia coli O157:H7, and Non-O157 Shiga Toxin–Producing E. coli. *Journal of Food Protection*, 76(3), 386–393. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-320>.
- ShihChi, W., Yaguang, L., Jie, L., Bin, Z., Jacangelo, J., Schwab, K. J. (2016). Assessment and speciation of chlorine demand in fresh-cut produce wash water. *Food Control*, 60: 543–551. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713515301663>
- Schneider, K. y Fatica, M. (2009). The use of chlorination and alternative sanitizers in the produce industry. *CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources*.

[https://www.researchgate.net/publication/283720337\\_The\\_use\\_of\\_chlorination\\_and\\_alternative\\_sanitizers\\_in\\_the\\_produce\\_industry](https://www.researchgate.net/publication/283720337_The_use_of_chlorination_and_alternative_sanitizers_in_the_produce_industry).

- Schoder, D. (2016). Listeria: Listeriosis. *Encyclopedia of Food and Health*, 561–566. doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00425-6
- Sivapalasingam, S., Friedman, C., Cohen, L., y Tauxe, R. (2004). Fresh Produce: A Growing Cause of Outbreaks of Foodborne Illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*, 67(10), 2342–2353. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.10.2342>Smart, C.;
- Suslow, T. (2017). *Revising practical considerations in the application of ORP as water quality metric*. <http://postharvest.ucdavis.edu/files/260798.pdf/>.
- Tournas, V., Stack, M., Mislivec, P., Koch, H. y Bandler, R. (2001). Chapter 18: yeasts, molds and mycotoxins. En FDA (Food and Drugs Administration) (Ed.), *BAM (Bacteriological Analytical Manual)* <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins>.
- Tournas, V. H. (2005). Spoilage of Vegetable Crops by Bacteria and Fungi and Related Health Hazards. *Critical Reviews in Microbiology*, 31(1), 33–44. <https://doi.org/10.1080/10408410590886024>
- Tripathi, A. N., Tiwari, S. K. y Behera, T. K. (2022). *Postharvest Diseases of Vegetable Crops and Their Management*. Postharvest Technology - Recent Advances, New Perspectives and Applications. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101852>
- Usaga, J., Churey, J., Padilla, O. y Worobo, R. (2014). Determination of the validation frequency for commercial UV juice processing units. *Journal of Food Protection*, 77(12): 2076-2080.
- Vandekinderen, I., Devlieghere, F., Meulenaer, B., Ragaert, P. y Van Camp, J. (2009). Optimization and evaluation of a decontamination step with peroxyacetic acid for fresh-cut produce. *Food Microbiology*, 26, 882-888. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.06.004>
- Van Haute, S., Tryland, I., Veys, A. y Sampers, I. (2015). Wash water disinfection of a full-scale leafy vegetables washing process with hydrogen peroxide and the use of a commercial metal ion mixture to improve disinfection efficiency. *Food Control*, 20, 173–183. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514004770?via%3Dihub>.
- Warriner, K. y Namvar, A. (2013). Recent advances in fresh produce post-harvest decontamination technologies to enhance microbiological safety. *Stewart Postharvest Review*, 9, 3. [https://www.researchgate.net/publication/270074914\\_Recent\\_advances\\_in\\_fresh\\_produce\\_post-harvest\\_decontamination\\_technologies\\_to\\_enhance\\_microbiological\\_safety](https://www.researchgate.net/publication/270074914_Recent_advances_in_fresh_produce_post-harvest_decontamination_technologies_to_enhance_microbiological_safety)
- Welbaum, G. (2015). *Vegetable Production and Practices*. CABI. [https://books.google.co.cr/books?id=zq4tBgAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gb\\_s\\_g\\_e\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.co.cr/books?id=zq4tBgAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gb_s_g_e_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

- Wright, K., Crozier, L., Marshall, J., Merget, B., Holmes, A. y Holden, N. (2017). Differences in internalization and growth of *Escherichia coli* O157:H7 within the apoplast of edible plants, spinach and lettuce, compared with the model species *Nicotiana benthamiana*. *Microbial biotechnology*, 10(3), 555–569. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12596>.
- Yang F, Hu J, Li J, Wu X, Qian Y (2009) Chitosan enhances leaf membrane stability and antioxidant enzyme activities in appleseedlings under drought stress. *Plant Growth Regulations*, 58:131–136
- Yi, S., Wei-Yea, H., Tung-Shi, H. y Simonne, A. (2021). Evaluation of the Microbiological Quality of Fresh Cilantro, Green Onions, and Hot Peppers from Different Types of Markets in Three U.S. States. *Horticulturae*, 7. <https://www.mdpi.com/2311-7524/7/6/122/pdf?version=1621837976#:~:text=coli%20are%20common%20indicator%20organisms,grown%20and%20processed%20%5B16%5D>.
- Yoon, J.H., y Lee, S.Y. (2017). Review: Comparison of the effectiveness of decontaminating strategies for fresh fruits and vegetables and related limitations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1 (20). doi:10.1080/10408398.2017.1354813
- Zhong, Z. (2016). Feasibility of indicator microorganisms in assessing the efficacy of sanitizers in fresh produce washing. College of the Illinois Institute of Technology <https://repository.iit.edu/islandora/object/islandora%3A9260>
- Zoellner, C., Aguayo, A., Siddiqui, M. y Dávila, J. (2018). Peracetic Acid in Disinfection of Fruits and Vegetables. *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812698-1.00002-9>

## 9. ANEXOS

### 9.1 ANEXO I.

**Cuadro VI.** Instrumento de evaluación de las buenas prácticas agrícolas en la finca proveedora de repollo visitada, basado en los manuales de “Buenas Prácticas Agropecuarias” (MAG, 2008), “USDA Good Agricultural Practices Good Handling Practices: Auditory Verification Checklist” (USDA, 2019) y “Standards for the Growing, Harvesting, Packing, and Holding of Produce for Human Consumption” (FDA, 2015).

Aspecto por evaluar	Cumple con el aspecto			Anotaciones
	Sí	No	N/A	
<b>Agua</b>				
Utiliza agua de riego de calidad microbiológica y química comprobada			X	No usan agua de riego
Las fuentes de agua están protegidas contra potenciales riesgos de contaminación			X	
Existen barreras para evitar la entrada de agua contaminada a las áreas de cultivo		X		
<b>Suelo</b>				
Se maneja el historial de uso del suelo	X			
Se toma en consideración la topografía del terreno y el patrón de lluvias para identificar posibles contaminaciones	X			Se toma en cuenta que la inclinación del terreno ante las fuertes lluvias puede afectar los cultivos y se debe tener una mayor vigilancia de detección de plagas
Se aplican medidas para evitar la erosión del suelo (siembra directa, mínima labranza, uso de coberturas...)	X			El producto que no se cosecha y pasa su tiempo de aceptabilidad, se tritura y se devuelve al suelo
Las áreas de cultivo se encuentran alejadas de sitios que puedan ser un riesgo de contaminación (fincas ganaderas, botaderos...)		X		Aunque no estaban precisamente al lado, las fincas ganaderas eran visibles desde la finca, por lo que puede haber contaminación por el viento y la escorrentía.
Las áreas de cultivo están libres de la presencia de animales	X			No se observaron durante la visita, mas no se descarta la posibilidad de tránsito de estos por la zona donde se ubica la finca y sobretodo en horario nocturno.
Se cuenta con un correcto sistema de drenaje del agua para evitar estancamiento y cúmulos de desechos orgánicos	X			La topografía del lugar favorece el movimiento del agua
<b>Agroquímicos y fertilizantes orgánicos</b>				
Se utilizan agroquímicos autorizados por los organismos nacionales e internacionales, según las recomendaciones	X			

Existe un plan de muestreo para el control de residuos de químicos indeseables en los cultivos	X			Una de las empresas cliente hace análisis
Los agroquímicos se rotulan y almacenan en un lugar cerrado lejos del área de cultivo	X			Los agroquímicos no se almacenan en el lugar, sin embargo, los recipientes vacíos sí se encontraban en el terreno
Como fertilizante orgánico se utilizan desechos orgánicos debidamente procesados y convertidos en abono		X		
El tratamiento de los desechos orgánicos y la elaboración de abono, así como su lugar de almacenamiento, se lleva a cabo en áreas alejadas de los campos de producción			X	No realizan tratamiento de los desechos orgánicos
Se aplica el abono orgánico antes de la siembra (no durante la cosecha ni en terrenos adyacentes)	X			
Control de plagas				
Existe un programa preventivo de control de plagas	X			Se toman acciones correctivas al momento de detectar una plaga
Se inspecciona periódicamente el área de cultivo para identificar brotes y aplicar medidas de control	X			El producto es vigilado durante el período de crecimiento para detectar enfermedades o brotes.
Higiene general				
Hay servicios sanitarios y lavatorios disponibles para los trabajadores		X		La finca está alejada de las facilidades, mas los encargados les indican que no pueden realizar sus necesidades en los cultivos
Se entrena a los trabajadores sobre medidas básicas de higiene (buena higiene, lavado de manos y uso del servicio sanitario)		X		Se les da una charla de aspectos básicos antes de entrar
Cosecha y transporte				
Se cosecha solamente producto sano en óptimas condiciones	X			El producto no apto es devuelto al suelo
Todo el equipo utilizado en la cosecha (cuchillos, machetes, palas...) es desinfectado y/o limpiado regularmente	X			Se limpia regularmente
Todo el equipo en contacto con el producto se encuentra en buen estado	X			
Los trabajadores en contacto con el producto están saludables y cumplen normas de higiene	X			
Todos los contenedores de producto son desinfectados y/o limpiados regularmente.	X			Limpiados regularmente
El transporte del producto se realiza en condiciones de acomodamiento, limpieza, temperatura y humedad adecuada, protegidos de condiciones ambientales		X		El producto se transporta distancias cortas por lo que no lo consideran necesario. Se usan cajas plásticas transportadas en camiones de cajón de madera que en ocasiones quedan expuestas al sol y ambiente.

9.2 ANEXO II.

**Cuadro VII.** Instrumento de evaluación de las buenas prácticas agrícolas postcosecha y buenas prácticas de manufactura en la planta empacadora de la finca proveedora de repollo y la planta del Centro Agrícola visitadas, basado en los principios de “Buenas Prácticas Agropecuarias” (MAG, 2008), “USDA Good Agricultural Practices Good Handling Practices: Audit Verification Checklist” (USDA, 2019) y “Standards for the Growing, Harvesting, Packing, and Holding of Produce for Human Consumption” (FDA, 2015), así como el reglamento de “Buenas Prácticas de Manufactura: Principios Generales” (Poder Ejecutivo, 2006).

Aspecto por evaluar	Cumple con el aspecto			Anotaciones
	Sí	No	N/A	
<b>Recepción de producto</b>				
El producto es almacenado y manipulado en condiciones adecuadas para evitar la introducción de contaminaciones (temperatura, humedad y luminosidad adecuadas, en tarimas separadas como mínimo a 15 cm de las paredes y al menos 10 cm del suelo)	X			
Se realiza la clasificación y selección de los repollos según determinados motivos de descarte de materia prima	X			El producto no es aceptado si no está en condiciones óptimas
<b>Lavado y Desinfección</b>				
El agua utilizada en los procesos posteriores a la cosecha es potable y con niveles de cloro controlados	X			Todos los días se realiza un monitoreo del cloro del agua
La temperatura del agua de lavado es monitoreada y mantenida en condiciones apropiadas para el cultivo		X		La temperatura no se monitorea normalmente
Los tanques y equipos de lavado son limpiados y/o desinfectados regularmente.	X			
Los tratamientos desinfectantes del producto están establecidos (pH, concentración del agente, tiempo de contacto y tiempo de permanencia del agua de lavado) y se monitorean	X			En ninguna de las desinfecciones se controla el pH del tratamiento.  En el caso del primer proceso de desinfección no se controla el tiempo de permanencia del agua de lavado.  No hay un monitoreo constante en ninguna de las desinfecciones
Se lleva un correcto registro y documentación de los procesos de desinfección realizados	X			
El almacenamiento del producto antes y después de los procesos de desinfección es apropiado (temperatura, humedad y luminosidad adecuadas, en tarimas separadas como mínimo a 15 cm de las paredes y al menos 10 cm del suelo)	X			
<b>Trabajadores e Instalaciones</b>				
Existe reglamentación y se aplica, sobre la correcta vestimenta y normas de higiene	X			

Se realiza un control periódico del estado de salud del personal	X			Los trabajadores deben reportar cualquier enfermedad y no se les permite entrar a planta en caso de contagio.
Las instalaciones sanitarias y de lavado de manos están limpias y en buen estado, con capacidad suficiente para los trabajadores por turno	X			
Existen instalaciones de almacenamiento separadas para: materia prima, producto terminado, productos de limpieza y sustancias peligrosas	X			Tanto zonas como producto están rotuladas y debidamente identificadas
El estado de piso, paredes y techo es apropiado para evitar acumulación de suciedad y posibles contaminaciones	X			
El interior de la planta es limpio y ordenado: se cuenta con espacio suficiente para cumplir satisfactoriamente con todas las operaciones de producción, la colocación del equipo y las operaciones de limpieza.	X			
Hay un correcto manejo de los desechos y un buen drenaje del agua dentro de las instalaciones (pisos libres de agua acumulada)	X			
Se siguen protocolos de limpieza y desinfección de los equipos en contacto directo con el alimento	X			
Se siguen protocolos de limpieza y desinfección general de la planta, así como el apropiado control de plagas	X			
Transporte				
Antes de cargar el producto, el contenedor es limpiado y desinfectado, se encuentra en buen estado y está libre de olores y suciedad visible	X			
Se realiza un control de las condiciones de transporte de materia prima (acomodamiento, luz, humedad y temperatura)	X			