

## TRATAMIENTOS BACTERICIDAS POSCOSECHA CONTRA *Vibrio cholerae* EN LECHUGA (*Lactuca sativa*)<sup>1</sup>

Daniel Saborío \*  
Leonardo Mata \*\*  
Luis Felipe Arauz \*\*\*

### ABSTRACT

Postharvest bactericide treatments for *Vibrio cholerae* in lettuce (*Lactuca sativa*). The effect of bactericidal solutions on postharvest quality of lettuce (*Lactuca sativa*) was evaluated. The effect of these treatments on *Vibrio cholerae* inoculated on lettuce was also investigated. Lettuce was dipped in chlorine at 0, 4, 8, 12, 16 and 20 ppm and Kilol at 1000 ppm for 1, 4, 7 and 10 min. Postharvest quality was not affected by any of the treatments. Ten minute dips of lettuce in either chlorine (20 ppm) or Kilol (1000 ppm), resulted in 99% mortality of *V. cholerae* inoculated on the vegetable at a concentration of  $10^8$  bacteria/g of leaf tissue. When the bacterium was inoculated at  $10^6$  bacteria/g, both bactericidal treatments resulted in 99.99% mortality of *V. cholerae*.

### INTRODUCCION

En Costa Rica, la provincia de Cartago produce el 70% de las hortalizas que se consumen en el país. Además esta provincia ha experimentado un significativo crecimiento de su población en los últimos 20 años. Este crecimiento se ha presentado sin un adecuado desarrollo y planificación de los sistemas de alcantarillados y tratamientos de aguas residuales, por lo que la contaminación de los ríos, que se utilizan tradicionalmente para el riego de hortalizas, ha aumentado considerablemente.

Según estudios preliminares aportados por el diagnóstico situacional de calidad de las aguas

de riego de los cantones de Oreamuno, Guarco y Central de la provincia de Cartago (INCIENSA, 1991), se ha encontrado que el 45,6% de los agricultores riegan los cultivos con aguas provenientes de ríos y acequias y en el 75% de los casos los recuentos bacterianos que se presentan son superiores a los 1000 coliformes fecales por 100 ml de muestra.

Estos valores sobrepasan el límite establecido por las directrices recomendadas por la Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial para la Salud, sobre la calidad microbiológica de las aguas empleadas para el riego de cultivos que comúnmente se consumen crudos. Este límite corresponde a < de 1000 de coliformes fecales por 100 ml de muestra de agua (OMS, 1989).

Los vegetales se contaminan con bacterias fecales cuando se han usado aguas negras o fuentes contaminadas para regarlos. Esto representa un riesgo potencial para la salud del consumidor, ya que las hortalizas pueden ser contaminadas con microorganismos patógenos a humanos, como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y, potencialmente, la bacteria causante del cólera, *Vibrio cholerae*.

1/ Recibido para publicación el 28 de febrero de 1994.

\* Convenio en Poscosecha Ministerio de Agricultura y Ganadería-Universidad de Costa Rica. Laboratorio de Tecnología Poscosecha, Centro de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

\*\* Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

\*\*\* Laboratorio de Fitopatología, Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

En el caso de la bacteria del cólera, el período de supervivencia del vibrión en vegetales es de 1 a 3 días a temperatura ambiente y se incrementa hasta 10 días en refrigeración (OPS, 1991). Las hortalizas de hoja, como lechuga, apio, culantro, perejil, etc., representan un grupo de alto riesgo de contaminación bacteriana, por ser consumidas crudas.

El cólera y otras enfermedades de tipo infeccioso son contraídas por ingestión, siendo la fuente más común las excretas de las personas infectadas (OPS, 1991).

Todo esfuerzo tendiente a prevenir las formas de contaminación y diseminación del cólera se justifica, tanto con los medios ya conocidos, como aquellos no convencionales. Entre las diferentes medidas que se pueden poner en práctica como parte de una estrategia para prevenir la infección está el adecuado manejo poscosecha, especialmente lo referente a tratamientos de desinfección, que garantizaría que el producto proveniente del campo sea óptimo y seguro para el consumo humano y a la vez, que no se alteren sus propiedades de calidad organoléptica y vida poscosecha. Sin embargo, en nuestro país no se tiene experiencia a este tipo de tratamientos empleando sustancias desinfectantes de acción bactericida.

Por esta razón se llevó a cabo esta investigación, la cual tuvo como objetivo evaluar la factibilidad de reducir la contaminación de la lechuga (*Lactuca sativa*) por *V. cholerae* mediante la aplicación poscosecha de productos desinfectantes.

## MATERIALES Y METODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Poscosecha del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) y en el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) ambos de la Universidad de Costa Rica. En una primera etapa se evaluó el efecto de los tratamientos desinfectantes sobre la calidad y vida poscosecha de la lechuga. Posteriormente se evaluó el efecto bactericida de las sustancias sobre el *V. cholerae* inoculado sobre esta hortaliza.

### Experimento 1

#### Efecto de desinfectantes sobre calidad y vida poscosecha

Se analizó el efecto de los productos desinfectantes cloro comercial (formulado como hipoclorito de sodio al 5%) y Kilol (Kilol DF-100:

producto desinfectante de origen natural, aprobado para tratamientos poscosecha en vegetales. Su ingrediente activo es extracto de semilla de toronja), sobre la calidad y vida poscosecha de la lechuga americana.

En experimentos preliminares se sumergió lechuga en una solución de 200 ppm de cloro por espacio de 3 min. Dicha concentración resultó en oxidación y pardeamiento del tejido de la hortaliza, en comparación con lechugas sin tratar, por lo que en pruebas subsiguientes se trabajó con dosis más bajas de este desinfectante. Se probaron diferentes concentraciones de cloro, a saber 0, 4, 8, 12, 16 y 20 ppm como cloro elemental (Cl), y el Kilol en la dosis recomendada de 10 ml de producto comercial/L. Para ambos productos se probaron diferentes tiempos de inmersión de la lechuga (1, 4, 7 y 10 min), con el fin de establecer la máxima exposición (concentración y tiempo de inmersión) al producto bactericida que no causara daño a la lechuga. Esto se hizo con el fin de que los trabajos posteriores con lechuga contaminada con el vibrión se llevaran a cabo con los tratamientos potencialmente más eficaces, pero descartando aquellos que por dañar el producto no tuvieran posibilidad de llevarse a la práctica a nivel comercial.

Para lograr una mejor cobertura del área a tratar de la lechuga, se añadió a las soluciones el producto de efecto surfactante WK (1 ml/L), ya que la forma de crecimiento de la lechuga americana dificulta la penetración de la solución en los espacios presentes entre las hojas.

El pH de las soluciones de cloro fue de alrededor de 11. A fin de mejorar la eficacia bactericida de las mismas, fue necesario bajar el pH a 6,5-7,0, valor al cual se logra la máxima actividad y la menor pérdida de este elemento de la solución (Ogawa, 1984). Esto se hizo añadiendo vinagre comercial (ácido acético al 3%) en igual volumen que la fuente comercial de cloro. Se escogió vinagre por considerarse un agente acidificante de fácil acceso para los agricultores.

Se llevaron a cabo 3 repeticiones en todos los tratamientos. La unidad experimental consistió de 3 lechugas.

Las lechugas fueron cosechadas en una finca ubicada en el cantón de El Guarco, provincia de Cartago. Fueron trasladadas al Laboratorio de Poscosecha en donde se lavaron y se les removió las hojas bajas secas y marchitas, al igual que acostumbra hacerlo el productor. Luego se procedió a

realizar las inmersiones de las lechugas enteras en las soluciones de cloro y Kilol en los tiempos y dosis correspondientes. Después de aplicar los tratamientos, se drenó el exceso de solución y las lechugas fueron sumergidas durante un minuto en agua limpia de cañería para remover los productos utilizados y se drenó el exceso de agua. Finalmente las lechugas fueron puestas en bandejas y colocadas en condiciones ambiente para su evaluación posterior.

La lechuga fue evaluada a las 12, 24 y 36 h después de efectuados los tratamientos. Se evaluó la presencia de olores extraños, sabores extraños, daños visibles como necrosis, decoloraciones y pudriciones y vida en anaquel.

### Experimentos 2 y 3

#### Efecto de los desinfectantes sobre el *Vibrio cholerae* inoculado

Estos experimentos se realizaron en el Instituto de Investigaciones en Salud y se utilizó también lechuga americana, proveniente de una finca de la zona de Cartago, la cual se lavó y se removió de sus hojas secas y partes marchitas, en forma similar a lo que acostumbra el productor.

La cepa de bacteria que se empleó para la inoculación fue la #1800-02 de *Vibrio cholerae* 01 Inaba El Tor, toxigénica, de la colección del Center for Disease Control de Atlanta, GA, que está almacenada en la bacterioteca del INISA. Esta cepa se activa en cultivos de agua peptonada alcalina (APA) y es trazable genéticamente. La inoculación se realizó a partir de un caldo de 18 h a 35°C, a 2 concentraciones, 10<sup>8</sup> y 10<sup>6</sup> bacilos/g o ml de lechuga o solución (log 8 y log 6) para los experimentos 2 y 3, respectivamente.

En el experimento 2 se evaluaron los siguientes tratamientos: Kilol DF 100 a una dosis de 10 ml/L, Cloro (20 ppm) y testigo.

Se preparó cada una de las soluciones con agua desionizada, ozonizada. Para el tratamiento con cloro se agregó penetrante WK (0,5 ml/L) y vinagre (ácido acético a 10 ml/L). Para el Kilol sólo se agregó el penetrante en la misma dosis.

El procedimiento fue el siguiente: La lechuga se cortó a la mitad, y cada mitad fue cortada en pequeñas porciones (aproximadamente 1 cm de ancho y 2 de largo). Las porciones de lechuga se inocularon con los vibrios en suspensión y se dejaron de 2 a 4 h en reposo a temperatura ambiente. Luego de esta incubación media lechuga se dejó

como testigo, y la otra media fue sumergida en las soluciones bactericidas antes descritas por espacio de 10 min.

Después del tratamiento se tomó una porción del caldo y otra de lechuga previamente macerada en morteros de porcelana empleando como diluyente APA, para preparar diluciones (log 10) en APA y cultivadas en agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS) y en APA, para identificar los vibrios.

Los cultivos de las diluciones fueron incubados a 35°C durante 18 h, para luego realizar la lectura de las cepas de *Vibrio cholerae* y los resultados fueron expresados en base logarítmica, como concentración de vibrios/g o ml de lechuga o fluido.

En el experimento 3 se procedió de forma similar a la descrita anteriormente, pero usando las soluciones bactericidas sin el penetrante y sin el ácido acético, y utilizando la concentración de vibrios menor, 10<sup>6</sup> bacilos/g o ml de lechuga o solución.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Experimento 1

Para la solución con cloro, no se presentaron daños físicos visibles o efectos que pudieran ser causados por acción de la solución desinfectante (ni por el producto penetrante o el ácido acético). El tratamiento en que se utilizó la mayor concentración de hipoclorito (20 ppm) y con el mayor tiempo de inmersión (10 min), no presentó diferencia con la lechuga sin tratar, por lo que algunos daños físicos observados no pueden atribuirse a los tratamientos. Tampoco se presentaron daños a la lechuga en ninguno de los tratamientos con Kilol.

Los resultados del experimento 1 indican que en el caso de cloro se puede usar la mayor dosis evaluada con el mayor tiempo de inmersión, con la seguridad de que no se presentarán daños al producto tratado, caso similar ocurre con el Kilol en que se utilizó la mayor dosis comercialmente recomendada (10 ml/L) y con el mayor tiempo de exposición de 10 min y tampoco se presentaron daños al producto tratado.

En relación con el tiempo Lema *et al.*, 1979, menciona que el período de sobrevivencia del *V. cholerae* en la mayoría de las hortalizas que presentan superficie rugosa o áspera, es mayor.

Por esa razón en la solución se añadió un penetrante, para que el fluido tuviera una menor

tensión superficial y el efecto bactericida abarcara toda la superficie del tejido de la lechuga.

### Experimento 2 y 3

Con los resultados obtenidos en el anterior experimento se procedió a la evaluación del análisis bactericida de las soluciones. Se utilizó la dosis de 20 ppm de hipoclorito de sodio (con adición de penetrante y ácido acético) y de Kilol 10 ml/L (con penetrante solamente), ambos tratamientos con un tiempo de inmersión de 10 min.

La eficiencia bactericida de estos productos ante soluciones de  $10^8$  y  $10^6$  bacilos/g (log 8 y log 6, respectivamente), son expresados también en base logarítmica, como vibrios/g o ml de lechuga y fluido. Como lo muestra el Cuadro 1, para la solución de log 8, cuando se utilizó cloro hubo una población superviviente de bacteria de menos de log 2 en solución y de log 6 en el tejido de lechuga. Al respecto Felsenfeld (1965), reporta que el hipoclorito tiene una excelente función desinfectante de acción bactericida y en sus evaluaciones obtuvo resultados de menos de 1% de supervivencia de vibrios en lechuga.

Para el caso del Kilol, en la solución se presentó una supervivencia calculada de log 4 vibrios y en el tejido una población de log 6 de bacilos sobrevivientes.

Las 2 sustancias analizadas presentaron un mayor control sobre los vibriones que se encontraban en la solución, en comparación con los que se encontraban adheridos al tejido de las hortaliza, y de los 2 desinfectantes, el cloro presentó la mejor acción bactericida.

Es importante destacar que la concentración de bacilos que se empleó en esta primera evaluación es tan elevada ( $10^8$ ) que prácticamente no se podrá encontrar en la naturaleza infectando las hortalizas por medio de las aguas de riego contaminadas, ya que esta población equivale a la que se encuentra en las evacuaciones (agua de arroz) de un paciente enfermo durante la fase aguda de *Cholera gravis* que es la forma más letal y grave de la enfermedad.

En relación con la concentración de vibrios sobreviviente es importante considerar la dosis mínima infectante. Al respecto Levine *et al.*, 1981, menciona que aunque para los seres humanos sólo se ha podido establecer en condiciones experimentales y muy controladas, la dosis infectante para el tipo El Tor puede ser de cien mil a un millón de bacilos, por lo que existe cierto riesgo en cuanto a la población que sobrevivió después de los tratamientos desinfectantes, principalmente en el tejido de la hortaliza. No obstante, como ya se mencionó, es difícil que por acción del agua de riego contaminada una hortaliza en producción tenga contacto con esa carga o cantidad de población bacteriana, por lo que se puede considerar que las 2 soluciones tuvieron una alta y eficiente acción bactericida, en proporción a la concentración de vibrios inoculada.

En la segunda evaluación no se agregaron a las soluciones de cloro y Kilol el penetrante ni el ácido acético, además, la concentración por g o ml del vibrión fue menor, ya que se inoculó con cerca de un millón (log 6) de bacilos.

Los resultados de eficiencia bactericida que se obtuvieron en este segundo experimento se

Cuadro 1. Concentración superviviente de vibrios tratados con soluciones bactericidas de cloro y Kilol a partir de 2 concentraciones inoculantes.

Sustancia bactericida	Material evaluado	10 <sup>8</sup> /g o ml de vibrios		10 <sup>6</sup> /g o ml de vibrios	
		Vibrios inoculados	Vibrios sobrevivientes	Vibrios inoculados	Vibrios sobrevivientes
Cloro	solución	8 *	< 2 **	6*	< 2 **
	tejido	8	6	6	< 2
Kilol	solución	8	4	6	< 2
	tejido	8	6	6	< 2

\* Concentración de 100,000,000 bacilos.

\*\* Menos de 100 bacilos.

muestran en el Cuadro 1. Para ambas soluciones, cloro y Kilol, se presentó una supervivencia de vibriones que equivale a una concentración menor de log 2, tanto en solución como en el tejido.

En este caso la población de vibriones que se empleó se acerca más a la que podría ocurrir en la realidad y representa la infección que podría ocurrir al regar hortalizas con agua proveniente de alguna fuente contaminada por evacuaciones producidas por algún enfermo de cólera. Feachem (1981) señala que el agua contaminada puede acarrear cientos de miles de bacilos por ml y puede infectar al ser humano a través de la contaminación de los alimentos.

La concentración de bacilos viables obtenido con las 2 soluciones bactericidas al final de los tratamientos garantiza que la hortaliza tratada con este manejo poscosecha es incapaz de infectar al ser humano y provocarle la enfermedad, ya que como se menciona anteriormente, según Levine *et al.* (1981), la dosis infectante para el ser humano es de 10 a 100 millones de bacilos (log 7 y log 8 respectivamente), para el biotipo "clásico" y de cien mil a un millón de bacilos para el tipo "El Tor" (log 5 y log 6 respectivamente) y se obtuvieron concentraciones medio más bajas que esas dosis correspondientes a log 2, o sea menos de 100 bacilos/g o ml.

En la actualidad el mecanismo preciso de diseminación de la bacteria no está bien definido, sin embargo, son conocidos 2 fuentes de infección: el contacto directo persona-persona o la transmisión indirecta por medio de alimentos contaminados con excretas (OPS, 1991). Este último mecanismo se estaría controlando por medio de los tratamientos poscosecha de desinfección, que se señalan aquí.

Otra medida práctica que se puede recomendar es tratar de no regar las hortalizas durante los últimos 5 días antes de ser cosechadas, para evitar de esta manera que no se presenten las condiciones en que la bacteria pueda estar viable, ya que los vibriones permanecen viables en particular cuando las frutas y hortalizas permanecen húmedas por algún tiempo (OPS, 1991).

Pollitzer (1959), comenta que el bacilo del cólera es altamente sensible a una serie de agentes físicos y químicos entre los que se encuentran el efecto de los ácidos y desinfectantes como también las condiciones de desecación. También, Hugues *et al.* (1982), señalan que el *V. cholerae* sobrevive mejor en agua o humedad que en los propios alimentos.

Específicamente para los vegetales que se consumen frescos o crudos las medidas que incluyen su lavado y limpieza son de singular importancia (OPS, 1991), por lo que contar con algunas sustancias con efecto bactericida eficaz como el cloro y el Kilol, es de suma relevancia para tratar de disminuir el riesgo de contaminación y transmisión del cólera por los alimentos.

## RESUMEN

Se evaluó el efecto de diferentes dosis y tiempos de inmersión de soluciones de cloro y de Kilol sobre la calidad poscosecha de lechuga americana, y además, la acción bactericida de estas soluciones sobre el *Vibrio cholerae* inoculado en la hortaliza. Las evaluaciones se llevaron a cabo en el Centro de Investigaciones Agronómicas y el Instituto de Investigaciones en Salud ambos de la Universidad de Costa Rica.

Las dosis de cloro fueron de 0, 4, 8, 12, 16 y 20 ppm de hipoclorito de sodio y la de Kilol 10 ml/L, ambos en tiempos de inmersión de 1, 4, 7 y 10 min. No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a efectos que pudieran atribuirse a las soluciones bactericidas en las dosis y tiempos de inmersión empleados.

Se llevaron a cabo 2 diferentes evaluaciones de acción bactericida; para ambas el tiempo de inmersión fue de 10 min. En la primera la concentración de vibrios inoculada fue de 100 millones de la cepa # 1800-02 *Vibrio cholerae* 01 Inaba El Tor, y la dosis de cloro usada fue de 20 ppm con ácido acético y penetrante.

Los resultados obtenidos fueron expresados en base logarítmica como vibrios por g o ml. Para el caso del cloro se presentó una supervivencia de menos de log 2 en solución y log 6 en tejido, y para Kilol fue de log 4 en solución y log 6 sobre el tejido.

En la segunda evaluación la concentración inoculante del vibrio fue de log 6 y las dosis de cloro y Kilol fueron similares pero no se añadió ni el penetrante ni el ácido acético. Los resultados del tratamiento desinfectante en cuanto a supervivencia de bacilos en ambas soluciones, tanto en fluido como en tejido de menos de log 2 de vibrios.

Esta última concentración de vibrios inoculado (log 6) se asemeja a la que podría estar infectando hortalizas al utilizar aguas de riego contaminadas y los resultados de su desinfección con cloro (20 ppm/10 min) o Kilol (10 ml/L/10 min), demuestran que ambos tratamientos son muy

efectivos ya que la concentración de vibrios sobreviviente está por debajo de la dosis mínima infectante que es log 5.

#### LITERATURA CITADA

- FELSFELD, D. 1965. Notes on food beverages and fomites contaminates with *Vibrio cholerae*. Bulletin World Health Organization. 33:730.
- HUGUES, L.; BOYGE, J.; LEVINE, R. 1982. Epidemiology of cholera in rural Bangladesh. Importance of surface water in transmission. Bulletin. World Health Organization. 6:60-395.
- INCIENSA-MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA. 1991. Presencia de *Escherichia coli* en aguas de riego de hortalizas en la provincia de Cartago (sin publicar).
- LEMA, O. *et al.* 1979. Survival of El Tor cholera vibrio in local water sources and beverages in Tanzania. East African Medical Journal. 56:504.
- LEVINE, M.N. *et al.* 1981. Volunteer studies in development of accines against cholera and enterotoxigenic *Escherichia coli*. In North Holland Biomedical Press. pp 443-459.
- MATA, J.L. 1992. El Cólera: historia, prevención y control. San José, C.R., EUNED-EUCR 1992. 384 p.
- ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 1989. Directrices sanitarias sobre el uso de aguas residuales en agricultura y acuicultura. Trad. por Organización Panamericana de la Salud. Informe de un grupo científico de la OPS. Serie de Informes Técnicos:778. 90p.
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). 1991. Guía para la prevención y control del cólera. Presentación en Ecuador, Quito. pp 20-40.
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). 1991. Risks of transmission of cholera by food. Publicado por el Programa de Salud Pública Veterinaria. Traducción Colegio de Médicos Veterinarios de Costa Rica. 53 p.
- POLLITZER, R. 1959. Cholera. World Health Organization. Geneva. pp. 10-19.
- SPIRA, W. M. *et al.* 1980. Microbiological Surveillance o intraneighbourhood El Tor cholera transmission in rural Bangladesh. Bull. World Health Organization 58: 731-740.