

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**EFFECTO DE DIFERENTES FACTORES FÍSICOS SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE
(*Salmonella entérica*) EN FRESAS Y MANGOS CONGELADOS EN GRIFFIN,
GEORGIA**

POR:

MARIO ROBERTO MELENDEZ SALINAS

TESIS

**PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

LICENCIADO EN TECNOLOGÍA ALIMENTARIA



CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A

DICIEMBRE, 2012

EFFECTO DE DIFERENTES FACTORES FÍSICOS SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE
(*Salmonella entérica*) EN FRESAS Y MANGOS CONGELADOS EN GRIFFIN,
GEORGIA

POR:

MARIO ROBERTO MELENDEZ SALINAS

Dra. NELYS HERRERA

Asesor(a) Principal

TESIS

PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

LICENCIADO EN TECNOLOGÍA ALIMENTARIA

CATACAMAS

OLANCHO

DICIEMBRE, 2012

DEDICATORIA

A DIOS TODO PODEROSO, por su gran amor y fidelidad hacia mi, que a pesar de mis defectos y desobediencias con el siempre esta para mi, gracias Dios por brindarme la salud y las fuerzas necesarias para culminar esta etapa de mi vida.

A mi MADRE del alma a mi doña Alba Aurora, por ser mi ángel y haberme guiado por el buen camino inculcándome los valores necesarios para ser un hombre de bien, por haber estado conmigo en todo momento.

A mi tía Marla Meléndez, por ser una madre para mi a lo largo de mi vida, por brindarme su amor y apoyo incondicional como uno más de sus hijos en todo momento y a lo largo de mi carrera universitaria.

A mis hermanos Krizia Meléndez y Hugo Meléndez, por su amor y comprensión, por haber estado conmigo en los momentos más felices de mi vida y compartir tantos recuerdos juntos.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradezco a Dios por haberme permitido alcanzar esta meta, y por su infinito amor.

A mis padres Santa Cecilia y Mario Meléndez, por haberme traído a este mundo, por su cariño y apoyo.

A mis asesores en Honduras Dra. Nelys Herrera, Ing. Fanny Maradiaga e Ing. Luis Castillo por su tiempo y comprensión para el desarrollo de este trabajo, a mis asesoras en Estados Unidos Dra. Ynes Ortega por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación en su laboratorio y brindarme su asesoría para el desarrollo de la investigación y a la M.Sc. Patricia Díaz por su apoyo incondicional en el laboratorio de parasitología.

A todos los docentes de la Carrera de Tecnología Alimentaria por haberme transmitido sus conocimientos, por sus consejos y todo el tiempo dedicado.

A mis eternos compañeros y hermanos Efrain Figueroa, William Jácome por su amistad y experiencias compartidas.

A mis compañeros de Tecnología Alimentaria clase 2012, especialmente a Wendy Hernández por ser tan buena amiga todo el tiempo.

A mi ALMA MATER Universidad Nacional de Agricultura por darme la formación para ser un profesional responsable, y por haberme inculcado la trilogía, Estudio, Trabajo y Disciplina.

CONTENIDO

	pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE ANEXOS	vii
RESÚMEN	viii
I INTRODUCCIÓN	1
II OBJETIVOS	3
2.1 General.....	3
2.2 Específicos.....	3
III REVISION DE LITERATURA	4
3.1 Enterobacterias	4
3.1.1 Generalidades	4
3.1.2 Morfología e identificación	4
3.2 <i>Salmonella</i> spp.....	5
3.2.1 Generalidades	5
3.2.2 Hábitat	6
3.2.3 Patogenicidad de <i>Salmonella</i>	6
3.2.4 Epidemiología.....	7
3.2.5 Características de los cultivos	8
3.3 Supervivencia de <i>Salmonella</i>	8
3.3.1 Temperatura.....	8
3.3.2 pH	9
3.3.3 Actividad de agua	9
3.3.4 Refrigeración	9
3.4 Panorama de la seguridad alimentaria	10
3.5 Buenas Prácticas Agrícolas	13

3.6 Conservación de frutas	14
IV MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 Ubicación y descripción del sitio de investigación	17
4.2 Materiales y equipo	17
4.3 Metodología.....	18
4.4 Descripción de los experimentos.....	18
4.4.1 Fresas	19
4.4.2 Fresas con azúcar.....	19
4.4.3 <i>Salmonella</i> adaptada a la acidez con azúcar.....	19
4.4.4 Fresas con jarabe de azúcar	20
4.4.5 Pulpa de mango	21
4.4.6 Contaminación cruzada	21
4.5.1 Preparación de medios.....	22
4.5.2 Preparación pool bacteriano	23
4.5.3 Preparación del inóculo contaminante.....	24
4.5.4 Control pool bacteriano e inóculo contaminante	26
4.5.5 Replicación de las cepas bacterianas	26
4.5.6 Inoculación del contaminante.....	26
4.5.7 Recuperación de las bacterias inoculadas en las frutas	27
4.5.8 Dilución de las soluciones de lavado.....	29
4.5.9 Siembra en Placas Petri	29
4.6 Lectura de resultados	31
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
5.1 Supervivencia de <i>Salmonella</i> en fresas y mangos.....	32
VI CONCLUSIONES.....	36
VII RECOMENDACIONES	36
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	38
ANEXOS	41

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Muestras de mango inoculadas con <i>Salmonella</i>	21
Figura 3. Repartición en placas del medio agar XLD.	23
Figura 4. Las cinco cepas de <i>Salmonella</i> y el pool bactriano.....	24
Figura 5. Bolsas ziplock utilizadas para el almacenamiento de las frutas.....	27
Figura 6. Lavado de pulpa de mango mismo utilizado para las fresas y la cascara.	29
Figura 7. Esquema de las diluciones realizadas y la siembra en placas.	30
Figura 8. Conteo de colonias de <i>Salmonella</i>	31
Figura 9. Gráfico en el que se muestran los resultados de los experimentos con fresa a las distintas temperaturas.	33
Figura 10. Gráfico de los resultados obtenidos en pulpa de mango y la contaminación cruzada tanto en cascara (xcascara) y pulpa (xpulpa).	34
Figura 11. Gráfico comparativo del crecimiento de <i>Salmonella</i> entre fresas y mangos.	35

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Experimento con <i>Salmonella</i> , uso de escaldado y distintas temperaturas peso muestra= 20-25 gr concentración inculo 10^4	25
Cuadro 2. Diluciones para la concentración 10^7 utilizado como inculo peso muestra 20-25gr.	25
Cuadro 3. Comparación de la eficiencia de recuperación en el lavado entre el agua peptonada 0.1% y el 2XDE peso por muestra fresa (20-25 gr), Inculo= <i>Salmonella</i> 10^4 ..	28
Cuadro 4. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos con fresas y mangos, expresados en LOG10.	32

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 Cuadro de resultados utilizada en todos los experimentos.	42

Meléndez Salinas M. 2012. Efecto de diferentes factores físicos sobre la supervivencia de (*Salmonella entérica*) en fresas y mangos congelados en Griffin, Georgia. Tesis Lic. en Tecnología Alimentaria, Universidad Nacional de Agricultura, Catacamas, Olancho, Honduras.

RESÚMEN

Actualmente la inocuidad de los alimentos es de suma importancia debido a la alta incidencia de personas afectadas por el consumo de alimentos contaminados, por lo cual la industria de las frutas y hortalizas se ha visto afectada debido a las medidas tomadas, el año pasado el presidente de EE.UU Barack Obama aprobó la Ley de Modernización de Seguridad Alimentaria, la norma autoriza a la FDA a inspeccionar los productos antes de pasar al receptor o distribuidor final, suspender el producto por 30 días e incluso, prohibir el ingreso de la fruta si el exportador se niega a la revisión. Esta norma incluye a todos los alimentos que ingresen a EE.UU., incluyendo frutas y hortalizas. Por razones como las mencionadas anteriormente es necesario este tipo de investigación, la cual se realizó en las instalaciones del laboratorio de parasitología de la Universidad de Georgia, Griffin Campus en conjunto con la Universidad Nacional de Agricultura, y se llevó a cabo con el objetivo de observar la supervivencia de *Salmonella* ante distintos factores físicos en fresas y mangos. El trabajo consistió en contaminar dichas frutas con un inóculo elaborado a partir de un pool bacteriano de cinco cepas distintas de *Salmonella*. El inóculo contaminante para todo el experimento tanto en mangos y fresas fue 10µl de una concentración de 10⁷ UFC/20µl. Se utilizaron fresas enteras las cuales fueron inoculadas con el contaminante en toda su superficie, y expuestas a distintas temperaturas y tratamientos (21°C, 4°C, -20°C y nitrógeno líquido que se almacenaba a -75°C), los tratamientos fueron azúcar refinada en toda la superficie de la fresa, también jarabe de azúcar refinada 8% y el nitrógeno líquido. Los resultados obtenidos tanto en fresa como en mangos mostraron la capacidad de resistencia que tiene la *Salmonella* a las bajas temperaturas, ya que sobrevivió a todas las temperaturas y tratamientos, también se estudió la contaminación cruzada en mangos de la cascara hacia la pulpa en el momento que se realizan cortes para el consumo de la fruta, obteniendo como resultado que en todos los casos hubo contaminación cruzada. En cuanto a la comparación que se realizó entre estas dos frutas el mayor crecimiento se dio en mangos.

Palabras claves: nitrógeno líquido, inóculo contaminante, inocuidad, seguridad alimentaria.

I INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos suponen un importante problema para la salud. Millones de personas enferman y muchas mueren por consumir alimentos insalubres. La inocuidad de los alimentos engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos. Las políticas y actividades que persiguen dicho fin deberán de abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción al consumo.

Salmonella que fue el objeto de estudio en esta investigación pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* constituida por bacilos gramnegativos no esporulados, que fermentan y oxidan la glucosa, carecen de indofenol oxidasa, reducen los nitratos a nitritos y se hallan ampliamente distribuidos por la naturaleza; muchas de sus especies tienen como hábitat el intestino del hombre y los animales, mientras que otras pueden infectar a plantas o tener vida saprofita.

Todos los factores intrínsecos de un alimento influyen sobre el desarrollo microbiano, ya sea de forma positiva o negativa. Teóricamente el gran número de factores que interviene podría ser cuantificado, por lo que se podría establecer si ese alimento es o no un posible medio adecuado para que se desarrollen gérmenes patógenos. Si consideramos la cantidad de alimentos diferentes que existen llegaríamos a la conclusión de que sería una tarea enorme recoger todos los datos sobre la relación de cada factor con cada microorganismo, de qué manera afectan o favorecen a su crecimiento. Por suerte los factores determinantes que predominan en el crecimiento de microorganismos son sólo unos pocos, entre los que destacan pH, aW, y temperatura.

Debido al aumento del número y de la gravedad de los brotes de tox infecciones alimentarias en los países desarrollados, se ha proporcionado un mejoramiento en el control

de los microorganismos, como con el género de *Salmonella* en los alimentos, principalmente en los que se refiere a sus cepas patógenas.

Por lo tanto en la presente investigación, para observar el comportamiento de esta bacteria se utilizó un pool bacteriano de cinco cepas distintas de *Salmonella* (*Salmonella enteritidis*, *Salmonella tennessee*, *Salmonella bairdson*, *Salmonella agona* y *Salmonella gaminara*), las cuales fueron inoculadas en fresas y mangos posteriormente expuestas a distintas temperaturas y tratamientos, como el uso de azúcar, jarabe de azúcar para la superficie de las fresas y nitrógeno líquido para la congelación instantánea para ambas frutas. Los efectos de estos factores sobre la supervivencia de *Salmonella* fueron medidos realizando un análisis microbiológico a las muestras tratadas.

II OBJETIVOS

2.1 General

Determinar la influencia de distintos factores físicos sobre la supervivencia de *Salmonella* en fresas y mangos en Griffin, Georgia.

2.2 Específicos

Evaluar distintas temperaturas de congelación en fresas y mangos para estimar cual es la que menos favorece al crecimiento y supervivencia de *Salmonella*.

Determinar el efecto que tiene la azúcar sobre la capacidad de crecimiento y supervivencia de *Salmonella*.

Observar la influencia del uso de nitrógeno líquido como congelante, sobre la supervivencia y crecimiento de *Salmonella*.

.

III REVISION DE LITERATURA

3.1 Enterobacterias

3.1.1 Generalidades

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gramnegativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre (García *et al.* 2010).

3.1.2 Morfología e identificación

En ocasiones, en cultivos jóvenes, se pueden observar formas cocobacilares y hasta cocoides. Sus bordes son rectos y sus extremos curvos. La presencia de cápsula se puede observar en algunas cepas de *E. coli*. Las bacterias pertenecientes a esta familia no pueden clasificarse sobre la base de la coloración de Gram, puesto que todos sus miembros se presentan con la misma forma y afinidad tintoreal.

La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de sus especies es de 37°C, aunque algunas *E. coli* y *Salmonella* toleran temperaturas de hasta 42°C, y otras como *Yersinia* y *Serratia* pueden crecer a baja temperatura entre 1 y 5°C (Hernández *et al.* 2001).

3.2 *Salmonella* spp

3.2.1 Generalidades

Salmonella spp es uno de los principales microorganismos implicados en las enfermedades transmitidas por alimentos. La infección conocida como salmonelosis se puede manifestar como dos procesos patológicos diferentes, la fiebre tifoidea o la gastroenteritis. Las bacterias pertenecientes a este género se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, utilizan citrato como única fuente de carbono y poseen metabolismo de tipo oxidativo y fermentativo. (Méndez 2010).

Los miembros del género se pueden clasificar en tres grupos:

a) Los que no tienen preferencia por algún huésped en especial, por lo que infectan tanto al hombre como a los animales. En este grupo se encuentran la mayoría de las serovariedades responsables de las salmonelosis.

b) Los que infectan sólo al hombre: *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi A* y *Salmonella Paratyphi C*

c) Los que están adaptados a un huésped animal: *S. Abortusovis*, a los ovinos; *S. Abortusequi*, a los equinos y *S. Gallinarum*, a las aves

La salmonelosis se presenta en términos generales, dentro de dos espectros clínicos: el primero, la fiebre entérica más conocida como fiebre tifoidea, caracterizada por ser un cuadro febril sistémico cuyos agentes etiológicos son *S. typhi* y *S. paratyphi*, donde el hombre se comporta como único huésped; y el segundo, la gastroenteritis, caracterizada por síntomas como dolor abdominal, malestar general, vómito, diarrea y en algunos casos fiebre, frecuentemente relacionado a previo consumo de alimentos contaminados de origen animal, es importante tener en cuenta que en los pacientes adultos inmunocomprometidos

con infección por *Salmonella* no tifoidea, existe mayor mortalidad relacionada con bacteriemia recurrente.

Los serotipos de *Salmonella* más representativos a nivel mundial son *S. enteritidis* y *S. typhimurium* (24,1% y 6,6% de los brotes atribuidos a estos serovares respectivamente); ubicándose así como el principal microorganismo bacteriano implicado (46,9%) dentro del espectro de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) (Méndez 2010).

3.2.2 Hábitat

La mayoría de los representantes de la familia se encuentran en el tracto intestinal del hombre y de los animales, bien como patógenos, bien como comensales. En el ambiente las bacterias pertenecientes al género *Salmonella spp.* están presentes en los afluentes de los ríos, y heces secas de los animales, en el lodo residual de arroyos y aguas costeras, con el consiguiente riesgo de diseminación. En grupos de animales destinados al consumo humano, pueden permanecer viables durante varios meses y pueden ser diseminadas por aerosoles y el polvo, originando una contaminación ambiental acumulativa (Dos Santos 2007).

Se transmite por vía fecal-oral y por contacto con agua contaminada. (Ciertos protozoos pueden actuar como un depósito para el organismo). Puede, por ejemplo, contaminar la carne, la granja del agua de riego (por lo tanto contaminación de dichos productos en el campo), el suelo y los insectos, equipo de la fábrica, las manos y superficies de la cocina y utensilios (FDA 2012).

3.2.3 Patogenicidad de *Salmonella*

Algunas serovariedades por ejemplo: (*S. typhi*, *S. paratyphi A.*, *S. paratyphi C* y *S. sendai*) están adaptadas al hombre como hospedador y generalmente causan síndrome septicémico-tifoideo en los seres humanos. Las demás serovariedades, sin embargo, causan

gastroenteritis en el hombre. La fiebre tifoidea es muy común en algunos países en desarrollo, mientras que es rara en los países desarrollados en los que la gastroenteritis causada por *Salmonella* se encuentra entre las causas principales de morbilidad por consumo de alimentos. Las serovariedades implicadas varían de acuerdo con la zona geográfica, pero frecuentemente incluyen a *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. agona*, *S. newport*, *S. infantis*, *S. panama*, *S. saint paul* y *S. welteveden*. En la actualidad *S. enteritidis* ha llegado a ser la serovariedad predominantemente responsable de la enfermedad, seguida de *S. typhimurium* (Dos Santos 2007).

3.2.4 Epidemiología

Investigaciones detalladas de brotes transmitidos por alimentos han indicado que la ingestión de sólo unas cuantas células de *Salmonella* puede resultar infecciosa. Datos científicos indican que de 1 a 10 células pueden constituir una dosis infectiva humana.

La fuente más frecuente de los humanos adquirir la salmonelosis (serotipos gastroentéricos), es por medio de la ingestión de alimentos y aguas contaminadas. Los pollos y los derivados cárnicos son la fuente más común de infección. La infección de persona a persona o de animal a persona es menos habitual, aunque en hospitales y unidades cerradas se han descrito epidemias por esta vía, principalmente entre los neonatos y personas con otras enfermedades de base que comprometen el sistema inmune. La infección por *S. typhi* es señal del contacto con heces humanas contaminadas por este microorganismo, ya que el hombre es su único reservorio.

Cada país tiene su propio esquema de circulación de serotipos; en nuestro medio, los serotipos que más frecuentemente circulan son, en las enfermedades gastroentéricas: *S. enteritidis*, *S. agona* y *S. anatum*; en las infecciones extraintestinales los serotipos que priman son: *S. enteritidis*, *S. namibia* y *S. infantis*. El conocimiento de los serotipos circulantes es un importante marcador epidemiológico, como lo es el fagotipaje para la *S. typhi*. En algunos países donde prima el serotipo *S. typhimurium* es frecuente el uso del

fagotipaje para este serotipo. El control de la salmonelosis se basa en las medidas higiénico-sanitarias, así como en el control de los alimentos tanto de los humanos como de aquellos suministrados a aves u otros animales de consumo por el hombre (Hernández *et al.* 2001).

3.2.5 Características de los cultivos

En los medios de aislamiento primarios, ya sean diferenciales o selectivos, que contienen como sustrato de diferenciación la lactosa, las colonias de *Salmonella* se observan como no fermentadoras de este carbohidrato. La mayoría de las cepas son móviles, producen ácido y gas a partir de la glucosa, aunque algunas especies como *S. typhi* son anaerogénicas. Producen ácido y gas a partir del manitol, dulcitol y sorbitol. Raramente utilizan la lactosa en su metabolismo, la sacarosa, salicina o adonitol. La producción de indol es excepcional, no hidrolizan la urea ni deaminan la fenilalanina. La mayoría de los serotipos emplean el citrato como fuente de carbono, aunque algunos, como *S. typhi*, no lo utilizan; igualmente ocurre con la producción de H₂S. Casi nunca crecen en el medio KCN (Hernández *et al.* 2001).

3.3 Supervivencia de *Salmonella*

3.3.1 Temperatura

La evidencia más reciente indica que la exposición prolongada de cepas mesófilas a condiciones de estrés térmico se traduce en mutantes de *Salmonella typhimurium* capaces de crecer a 54 °C. La viabilidad de la *Salmonella* en los alimentos secos almacenados a temperatura ≥ 25 °C disminuye con el aumento de la temperatura de almacenaje y con el aumento del contenido de humedad.

3.3.2 pH

La capacidad de adaptación fisiológica de *Salmonella spp.* se demuestra por su capacidad de multiplicarse a valores de pH que varían desde 3,8 hasta 9,5. Los efectos bacteriostáticos o antibacterianos de los medios ácidos dependen del acidulante. De los ácidos orgánicos formados por los cultivos iniciadores en la carne, en los alimentos lácteos y en otros alimentos fermentados, y de los diversos ácidos orgánicos que se utilizan en la acidificación de productos, los ácidos propiónico y acético son más bactericidas que los ácidos lácticos y cítrico asociados a los alimentos corrientes.

3.3.3 Actividad de agua

Los estudios han demostrado que los alimentos con a_w de valores $\leq 0,93$ no sustentan el crecimiento de *Salmonella*. Aunque por lo general las *Salmonellas* son inhibidas en presencia de un porcentaje de sal de 3 a 4 %, la tolerancia de la sal por parte de las bacterias aumenta con el aumento de la temperatura en el intervalo de 10 a 30 °C. Sin embargo, el fenómeno último va acompañado de una fase de latencia prolongada y de una tasa de crecimiento disminuida.

3.3.4 Refrigeración

Las *Salmonellas* tienen propiedades psicrotróficas, reflejadas en la capacidad de crecer en alimentos almacenados a temperaturas comprendidas entre 2 y 4 °C. Además, el acondicionamiento previo de las células a temperaturas bajas puede aumentar notablemente el crecimiento y la supervivencia de las *Salmonellas* en alimentos refrigerados. Estas características del crecimiento suscitan preocupaciones acerca de la eficacia de las temperaturas de refrigeración para garantizar la inocuidad de los alimentos por medio de la bacteriostasis (Dos Santos 2007).

3.4 Panorama de la seguridad alimentaria

Los beneficios asociados con el consumo normal de frutas y hortalizas frescas han sido claramente demostrados y fomentados por las autoridades nacionales e internacionales en nutrición y salud. Sin embargo, ha habido un incremento en el número de brotes de enfermedades asociadas con el consumo de productos frescos. Varios brotes han recibido amplia cobertura de los medios de comunicación, aumentando preocupaciones acerca de la seguridad potencial de frutas y hortalizas frescas. El hecho de que los productos frescos no sean procesados, es un paso que reduce o elimina los riesgos de seguridad, ha conducido a la industria, las autoridades reguladoras y la comunidad científica a enfocar los esfuerzos de investigación y educación sobre los pasos que previenen la ocurrencia de la contaminación que puede causar la enfermedad.

La producción de alimentos e industrias relacionadas con la agricultura juegan un rol importante en la economía de prácticamente todos los países. Los acontecimientos que impactan en forma negativa la salud o decisiones de compras de los consumidores pueden también impactar la rentabilidad de las industrias que proveen alimentos. Las consecuencias económicas pueden ser desastrosas, no solo debido a la pérdida inmediata de ingresos, pero porque la pérdida de trabajos para los trabajadores agrícolas e industrias afiliadas afecta a las familias y a la sociedad en general. Estos efectos pueden ser de largo plazo (Rushing 2012).

Las importaciones estadounidenses de mangos mexicanos subieron a un récord de 518,4 millones de libras en 2011 y, junto con grandes volúmenes de otros grandes proveedores, condujo el volumen anual de las importaciones a su mayor nivel del año pasado, un total de £ 810,4 millones. Como resultado, el mango fresco doméstico uso per cápita en 2011 también alcanzó un récord en 2,53 libras, frente a la anterior máximo de 2,23 libras en 2010. (USDA 2012).

La comercialización de estos productos en un gran mercado lo cual también implica grandes riesgos. En 31 estados, entre el 1 de enero y el 9 de octubre de 2007, se tomaron de personas enfermas por lo menos 152 aislados de *Salmonella entérica* serotipo I,4,[5],12:i:- con una inconfundible huella genética. Se han identificado casos de personas con salmonelosis causada por la cepa de *Salmonella* con esta huella genética en Arizona (1 persona), California (6), Connecticut (3), Delaware (5), Georgia (2), Idaho (6), Illinois (3), Indiana (3), Kansas (2), Kentucky (8), Massachusetts (5), Maryland (5), Maine (1), Michigan (3), Minnesota (6), Missouri (11), Montana (4), Nevada (6), New York (6), Ohio (8), Oklahoma (1), Oregon (2), Pennsylvania (13), Tennessee (5), Texas (4), Utah (2), Virginia (6), Vermont (2), Washington (2), Wisconsin (19), y Wyoming (2). Las edades de las personas afectadas oscilan entre menos de 1 año y 87 años, con una media de 20 años; el 49% de las personas enfermas son mujeres. Por lo menos 20 personas han sido hospitalizadas. No se ha reportado ninguna muerte (CDC 2012).

Más de 1,200 personas fueron hospitalizadas debido a brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos en el 2008. Esto equivale al 6% de todas las personas que se enfermaron por los brotes (un alto porcentaje si se compara con el promedio de 4% notificado entre el 2003 y el 2007. Es más, este fue el mayor número de hospitalizaciones relacionadas con enfermedades transmitidas por los alimentos reportadas desde que se puso en marcha el sistema de vigilancia de brotes en 1973. Las principales causas de hospitalización fueron:

- Salmonella* (62%)
- E. coli* productora de la toxina Shiga (17%)
- Norovirus* (7%)

El noventa por ciento de las enfermedades causadas por brotes de botulismo llevaron a hospitalización lo mismo que el 76% de las enfermedades relacionadas con brotes de listeria, 22 muertes se atribuyeron a enfermedades transmitidas por los alimentos. La *Salmonella* fue responsable de la mayoría de muertes (13) seguida por *Listeria* y *E. coli* (3 cada una) (CDC 2012).

Debido a todas estas circunstancias se han tomado medidas para el aseguramiento de la inocuidad de los alimentos tanto en EE.UU como otros países, un ejemplo de esto son las leyes aprobadas en el país mencionado para el control de los alimentos que pretenden ingresar a su territorio, lo cual autoriza a la FDA a cerrarle las puertas a cualquier país que no se someta a las revisiones necesarias. (FDA 2012).

Sin embargo este problema es bien difícil de controlar, recientemente el 29 de agosto de 2012, la FDA advierte a los consumidores sobre el riesgo de consumir mangos provenientes de Agrícola Daniella, un proveedor de mangos con múltiples plantaciones y una única planta de empaque ubicada en Sinaloa, México. Los análisis realizados por la FDA detectaron *Salmonella* en los mangos de este productor. Algunos lotes de mangos sólo de la marca Daniella fueron retirados del mercado por Splendid Products en Burlingame, California. Un importador de Canadá también inició un retiro voluntario del mercado sólo de los mangos de la marca Daniella en dicho país como resultado de la enfermedad ocasionada por *Salmonella Braenderup*. Además, diversas empresas que usaron mangos de la marca Daniella suministrados por Splendid Products en sus productos con fruta recién cortada, también iniciaron retiros del mercado de los productos mencionados. (FDA 2012).

En los productos recién cortados aumenta el riesgo de crecimiento bacteriano y la contaminación mediante la ruptura de la barrera exterior natural del producto (Ref. 6). La liberación de líquidos de la planta celulares cuando el producto es picado o desmenuzado proporciona un medio nutritivo en el cual los patógenos, si está presente, puede sobrevivir o crecer (Ref. 6). Por lo tanto, si los patógenos están presentes cuando la integridad de la superficie de la fruta o verdura es roto, el crecimiento de patógenos puede ocurrir y la contaminación puede extenderse. La elaboración de productos frescos sin procedimientos sanitarios adecuados en el entorno de procesamiento aumenta el riesgo de contaminación por agentes patógenos. (FDA 2008).

Ahora, la prevención, por supuesto, es posible en muchos puntos, pero habría que hablar de la porción inferior final allí donde la formación del manipulador de alimento entra en juego, lavado de manos, inspección de restaurantes, la educación del consumidor, es una especie de un acuerdo global, pero hay un número de puntos posible a lo largo de la cadena. (USDA 2002).

La seguridad alimentaria es una parte integral de la producción de todos los alimentos y la responsabilidad compartida de todos los segmentos de la cadena de suministro. En los últimos tiempos ha habido una creciente conciencia de la necesidad de evaluar las prácticas de seguridad alimentaria en la producción de productos agrícolas. Demandas de los consumidores por formas nuevas y convenientes de producción han conducido al desarrollo de "del campo a la mesa" prácticas de inocuidad de los alimentos en la industria de productos frescos. El uso de un programa de pruebas microbiológicas es una herramienta que se puede utilizar en el desarrollo y verificación de un programa de seguridad alimentaria (UFPA 2010).

3.5 Buenas Prácticas Agrícolas

La mejor forma de combatir la problemática de la contaminación de alimentos es la prevención, por lo cual es necesaria la aplicación correcta de los sistemas de calidad en toda la cadena alimenticia comenzando por el campo con las BPA. Buenas prácticas de manejo se refiere a las prácticas generales para reducir el riesgo microbiológico en los alimentos. El término puede incluir tanto las "Buenas Prácticas Agrícolas (GAPs)" que se emplean en el cultivo, recolección, selección, empaque y almacenamiento, como las "Buenas Prácticas de Manufactura (GMPs)" en el contexto de los procesos de selección, empaque, almacenamiento y transporte.

La calidad del agua, y la forma y el momento en que se usa, así como las características de la cosecha afectan la posibilidad de contaminación de las frutas y hortalizas. En general se

puede decir que la calidad del agua en contacto directo con la parte comestible de las frutas y hortalizas debe ser superior a la del agua que tiene contacto mínimo con dichas áreas.

También se tienen que tomar en cuenta aspectos como la higiene de los trabajadores, los cuales entran en contacto directo con las frutas, las instalaciones sanitarias deben de cumplir con las normas establecidas para reducir al mínimo los riesgos de contaminación, Las instalaciones de empaque deben de estar en condiciones optimas limpias. Se solicita a los operadores y a otras personas que participan en el transporte de frutas y hortalizas a que examinen el transporte de las mismas en todos los niveles del sistema, incluido el transporte desde la granja a la cámara refrigerante, las instalaciones de empaque y los centros de distribución y venta al por mayor o al por menor. El transporte adecuado de las frutas y hortalizas frescas ayuda a reducir el riesgo de contaminación microbiológica. Para asegurar el éxito de los programas destinados a entregar alimentos seguros al consumidor es necesario mantenerse en contacto directo y continuo con el personal encargado del transporte (CFSAN y FDA 1998).

3.6 Conservación de frutas

Se ha demostrado que la congelación rápida de los alimentos, conserva mejor la calidad inicial de los productos ello es debido a que con la congelación rápida se forman pequeños cristales de hielo, que respetan en gran medida la estructura original de los alimentos. Con una congelación lenta, se forman grandes cristales que producen una rotura celular. A la congelación rápida de productos alimenticios se le conoce actualmente como “ultracongelación”, y se realiza en solo unos minutos dependiendo de los sistemas empleados, que básicamente son dos:

- a) Ultracongelación por aplicación de gases criogénicos (nitrógeno líquido principalmente) a bajas temperaturas, con lo que el proceso puede tener lugar en tan solo 1 a 15 min.

- b) Ultracongelación con equipos mecánicos (compresores frigoríficos y otras maquinas auxiliares (Madrid *et al.* 2003).

En esta investigación se utilizó el método de congelación por aplicación de gases criogénicos (nitrógeno líquido) el cual se aplicó por medio de inmersión los cual presenta ciertas desventajas debido al costo ya que el nitrógeno liquido al entrar en contacto con la fruta pasa al estado gaseoso. A continuación se presentan las ventajas del uso de nitrógeno líquido:

- Menor deshidratación del producto durante la congelación.
- Menores perdidas de peso del producto al proceder a su descongelación (mejor retención del agua). Si el proceso se realiza bien las pérdidas se pierden completamente.
- Mejores características organolépticas (olor, color, sabor, textura). El color y el olor serán mas parecidos a los que tenia el producto inicialmente.
- Mejor calidad microbiológica (detención del desarrollo microbiológico y enzimático).
- Detención de los procesos de oxidación y enranciamiento, provocados por el oxigeno y el desarrollo microbiano (Madrid *et al.* 2003).

Según el Codex Alimentarius se entiende por fresas congeladas rápidamente el producto preparado con fresas frescas, limpias, sanas, maduras, sin tallo y de textura firme, que se ajusten a las características de las especies *Fragaria grandiflora L.* y *Fragaria vesca L.* (Codex Alimentarius 1981).

La congelación de frutas comenzó a escala comercial a inicios de este siglo en Estados Unidos de América. Se comenzó por congelar frutas que eran lavadas, preparadas y seleccionadas previamente. Unas variedades de fruta aguantan mejor el proceso de

congelación que otras. Para este proceso se debe de seguir un conjunto de pasos para que el mismo sea efectivo; se debe de lavar la fruta, se seleccionan las frutas que estén en un estado de maduración incipiente debido a que las que están muy maduras su estructura no resistirá la congelación. Se pueden añadir sustancias que ayuden a que la fruta soporte la congelación como el ácido ascórbico, el azúcar ya sea añadida directamente o diluida en un jarabe como lo es en el caso de esta investigación.

Dentro de las frutas, las fresas son las que más se someten a congelación por los buenos resultados que se obtienen. Las fresas se deben recoger cuando aun no han madurado completamente y se deben llevar rápidamente a la instalación congeladora, si es posible por transporte frigorífico. Entre las operaciones previas a su congelación destacan:

- Separación del cáliz y lavado de las fresas
- Escurrido de las fresas
- Selección de las fresas
- Alimentación de las fresas al congelador

El lavado de las fresas y su posterior escurrido aun deja una pequeña capa de humedad sobre ellas, lo que es muy conveniente ya que así se evita la desecación de las mismas durante la congelación (Madrid *et al.* 2003).

IV MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación y descripción del sitio de investigación

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de parasitología de la Universidad de Georgia, dentro del edificio de Tecnología Alimentaria ubicado en Griffin, Georgia, Estados Unidos de América. En el periodo comprendido entre Julio-Octubre del año 2012.

4.2 Materiales y equipo

Equipo:

- Auto clave
- Incubadora
- Estufa
- Baño María
- Mechero de bunsen
- Congelador T° -20°C
- Congelador T° -75°C
- Contador de colonias
- Balanza analítica

Materiales:

- Asas de siembra
- Espátulas
- Probetas
- Matraz Enlermeyer
- Pipetas (1ml, 5ml, 10ml)
- Cronometro
- Agar XLD
- Ácido Nalidíxico
- Caldo de Soja Tríptico (TSB)
- Navaja
- Esparcidores de vidrio
- Placas petri
- Tubos de ensayo
- Tubos de polietileno de 50 ml
- Microtubos 1 ml
- Mortero
- Agitador

4.3 Metodología

El trabajo consistió en contaminar las fresas y mangos con un inóculo elaborado a partir de un pool bacteriano de cinco cepas distintas de *Salmonella* (*Salmonella enteritidis*, *Salmonella Tennessee*, *Salmonella bairdson*, *Salmonella agona* y *Salmonella gaminara*). El inóculo para toda la investigación tanto en mangos y fresas fue 10µl de una concentración de 10⁷ UFC/20µl. Se utilizaron fresas enteras de aproximadamente 20-25 gr las cuales fueron inoculadas con el contaminante en toda su superficie, y expuestas a distintas temperaturas y tratamientos (21°C, 4°C, -20°C y NL que se almacenaba a -75°C), los tratamientos fueron azúcar refinada en toda la superficie de la fresa, inmersión en jarabe de azúcar refinada 8% y el nitrógeno líquido. Con los mangos se trabajó de forma parecida que las fresas, se obtuvo la pulpa la cual se pesó en pedazos de 20-25gr fue inoculada y almacenada a las mismas temperaturas que la fresa, con los mangos también se observó la contaminación cruzada que puede ocurrir al momento de cortar el mango para su consumo, luego de el almacenamiento se recuperaron las bacterias mediante un lavado tanto en las fresas y mangos para su siembra en placas y posterior conteo. Para cada experimento se utilizaban 12 muestras en el caso de las fresas una muestra era una fresa de 20-25 gr, para el experimento con mango se utilizó pulpa siempre con un peso aproximado de 25 gr, para la parte de contaminación cruzada en mango en la cual se analizó tanto pulpa como cascara se utilizó el mismo peso de muestra para la pulpa (25gr), las muestras de cascara pesaban entre 3-5 gr, por que se utilizó como muestra la cascara que cubría la muestra de pulpa.

4.4 Descripción de los experimentos

La investigación se dividió en dos etapas la primera fue el trabajo con fresas la cual abarco cuatro experimentos:

4.4.1 Fresas

En este primer experimento se trabajó con fresas, sin aplicar ningún tipo de tratamiento diferente a las diferentes temperaturas, los procedimientos tanto para este experimento como para todos los demás fue el mismo. Los cuales son descritos posteriormente que básicamente son la inoculación con el contaminante, almacenamiento a las distintas temperaturas, recuperación de las bacterias por medio de un lavado con agua peptonada 0.1%, seriado de dilución, la siembra tanto en placas como en tubos de enriquecimiento, incubación y el conteo de resultados. Cabe destacar que por cada uno de estos experimentos se utilizaban 12 fresas 3 por cada temperatura.

4.4.2 Fresas con azúcar

En este experimento se aplicó un tratamiento después de la inoculación y la hora que se esperaba para el debido secado del inóculo contaminante, el cual consistió en pasar las fresas antes de ser almacenadas a las distintas temperaturas por azúcar refinada para cubrir su superficie tratando de esta manera reducir el crecimiento de *Salmonella*.

4.4.3 *Salmonella* adaptada a la acidez con azúcar

Debido a que los conteos de las colonias en los primeros experimentos fueron sustancialmente bajos, se decidió realizar un proceso de adaptación a la acidez con las bacterias. Se comenzó la adaptación elaborando un puré de fresas, machacando las frutas con un mortero y diluyendo el puré con 10 ml de agua destilada, para facilitar la distribución en los tubos de ensayo, se midió el pH el cual siempre rondó entre 2.53-3, se colocaban 9 ml de puré por tubo con un total de 5 tubos de ensayo, en cada uno se añadía 1ml del inóculo contaminante 10^7 el mismo que se utilizó en los experimentos anteriores y que ha sido replicado para la viabilidad de las bacterias, luego los cinco tubos eran incubados a 37°C durante 24 horas, después de este tiempo se tomaba 1 ml de cada tubo para ser cultivado en 9 ml Caldo de Soja Tríplico suplementado con Ácido Nalidíxico de TSBNA el cual es un medio enriquecido para *Salmonella* contenido en otro tubo de ensayo,

lo mismo se hacia con los cinco tubos que contenían el puré, después los 5 tubos de ensayo que contenían el TSBNA con las bacterias debidamente rotulados indicando el numero de tubo se incubaban durante 24 horas, después de este tiempo, se sembraban 2 placas con el medio XLD por cada tubo, se utilizaban 250 µl por placa esto para observar el crecimiento y la adaptación de la bacteria a la acidez, luego se pasaba 1 ml de cada tubo de enriquecimiento a 5 nuevos tubos que contenían un puré nuevo, se volvía a incubar por el mismo tiempo y el mismo procedimiento se realizó cinco veces.

Las bacterias resultantes fueron las bacterias adaptadas al ácido que se utilizaron tanto para este experimento como para el experimento con jarabe de azúcar. Para poder utilizar estas bacterias se tomaron con un asa de siembra y con las condiciones de esterilidad adecuadas varias colonias de las distintas placas las cuales se disolvieron en 9 ml de TSBNA e incubaron durante 24 horas. Después del tiempo de incubación se obtenía un pool de 10^9 bacterias dicha concentración se comprobaba realizando la siembra en placa, a partir de este nuevo pool de *Salmonella* adaptadas al ácido se realizó el inóculo contaminante para este experimento. Los pasos para este experimento son los mismos que el anterior la única diferencia es que las bacterias pasaron por un proceso de adaptación a la acidez.

4.4.4 Fresas con jarabe de azúcar

En este experimento se siguieron utilizando las bacterias adaptadas, el tratamiento fue sumergir las muestras en un jarabe de azúcar refinada a una concentración del 8%, siempre después de la inoculación y del tiempo que se espera para el secado del inóculo contaminante (1 hora), siguiendo los pasos de los experimentos anteriores.

La segunda etapa del experimento fue el trabajo que se realizó con los mangos la cual abarco dos experimentos:

4.4.5 Pulpa de mango

En este experimento se utilizaron muestras de pulpa de mango de 20-25 gr (Figura 1) para observar la supervivencia de *Salmonella*, el inóculo fue el mismo que se utilizó con las fresas así como el procedimiento que se aplicó. Para los mangos se trabajó con las bacterias normales que no fueron sometidas a ningún proceso de adaptación a la acidez debido a que la diferencia entre las bacterias adaptadas al ácido y las que se utilizaron en el primer experimento no fue notable.

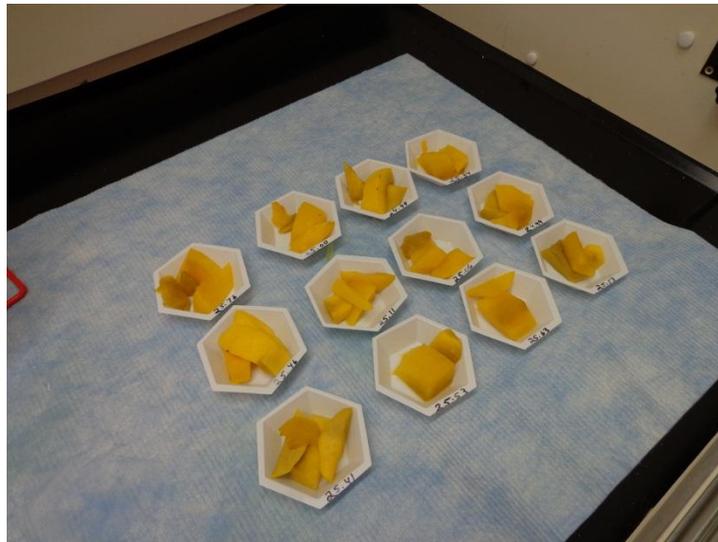


Figura 1. Muestras de mango inoculadas con *Salmonella*.

4.4.6 Contaminación cruzada

Con este experimento se buscaba observar la contaminación cruzada que podría ocurrir al momento de cortar el mango para su consumo, se cortó el mango en rodajas como se muestra en la Figura 2, las cuales fueron contaminadas con el mismo inóculo, se esperó que se secaran para realizar el corte de las muestras, una vez obtenidas las 12 muestras se separaban de la cascara y se analizaban por separado para ver que tantas bacterias se llevaron de la cascara hacia la pulpa al momento del corte y también para determinar las

cantidad de bacterias que se mantenían en la cascara. Los mismos pasos del experimento anterior se utilizaron para este.



Figura 2. Mango contaminado en la cascara para la observación de la contaminación cruzada al momento del corte para el consumo.

4.5 Manejo del experimento

4.5.1 Preparación de medios

El medio de cultivo que se utilizó para *Salmonella* fue agar XLD suplementado con ácido nalidíxico (50ug/ml). El cual era preparado con anticipación para cada semana de trabajo, la cantidad preparada era de aproximadamente 1.7 a 2 litros por semana, de los cuales se obtenían 180-200 placas listas para ser utilizadas. Para la preparación del medio los frascos eran debidamente esterilizados y rotulados con la respectiva información (medio XLD, fecha de elaboración, el suplemento añadido en este caso ácido nalidíxico). Se utilizaron beakers de 1000 ml la cantidad de medio era de 55gr por cada litro de medio, se disolvía todo el medio en agua destilada luego se calentaba en las estufas y se agitaban con perlas magnéticas hasta que estos alcanzaban la ebullición, luego se depositaban en el baño maría para controlar la temperatura la cual era 55°C la adecuada para añadir el antibiótico (ácido nalidíxico 1%), una vez añadido el antibiótico el medio se agitaba suavemente para tener

una distribución homogénea del antibiótico, luego se repartía en las placas como se muestra en la Figura 3, se esperaba a que el medio solidificara para luego almacenar las placas a temperatura de refrigeración hasta su uso.



Figura 2. Repartición en placas del medio agar XLD.

4.5.2 Preparación pool bacteriano

Se utilizaron 5 cepas (*Salmonella enteritidis*, *Salmonella Tennessee*, *Salmonella baidon*, *Salmonella agona* y *Salmonella gaminara*) (Figura 4), para la preparación de el pool bacteriano. Se realizó un solo pool, se cultivaron en cantidades iguales, el medio de cultivo a utilizar para el pool bacteriano fue caldo de soja tréptico suplementado con ácido nalidíxico (50ug/ml) (TSBNA). Cada cepa por separado a una concentración de 10^9 se mezcló en un solo tubo, 1 ml de cada cepa. Todo este proceso se realizó en un ambiente de esterilidad proporcionado por un mechero de bunsen.



Figura 3. Las cinco cepas de *Salmonella* y el pool bacteriano.

4.5.3 Preparación del inóculo contaminante

El inóculo contaminante que fue 10^7 UFC/20 μ l del cual se utilizaban 10 μ l para cada muestra (fresa, mango con peso 20-25 gr) se preparaba para cada experimento a partir del pool bacteriano que tiene una concentración conocida de 10^9 UFC/ml utilizando la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde: C_1 = concentración inicial

V_1 = volumen inicial

C_2 = concentración final

V_2 = volumen final

Para poder definir el inóculo final se realizaron una serie de pruebas las cuales consistieron en utilizar distintas concentraciones del inóculo contaminante, 10^4 , 10^5 , 10^6 10^7 . Inicialmente se trabajó con el inóculo 10^4 , se inocularon las fresas y se trataron con

escaldado y congelación sin obtener resultados en placas. El Cuadro 1 muestra los resultados obtenidos con el inóculo 10^4 .

Cuadro 1. Experimento con *Salmonella*, uso de escaldado y distintas temperaturas peso muestra= 20-25 gr concentración inóculo 10^4 .

	CL -20 °C						CR-80 °C						TA 4 °C		
	B			NB			B			NB			enri	confir	1/1
	enri	confir	1/1	enri	confir	1/1	enri	confir	1/1	enri	confir	1/1			
A	-		0	-		0	-		0	+	+				
B	-		0	-		0	-		0	+	+				
C	-		0	-		0	-		0	+	+				
+ posti													+		0

En estos resultados se observó que no hubo conteo, sin embargo los tubos de enriquecimiento fueron positivos para la temperatura -80°C sin escaldado, por lo cual se confirmó si había presencia de *Salmonella* sembrando en placas la cual resultó positiva. Este experimento se repitió dos veces obteniendo los mismos resultados.

Con el inóculo que se obtuvieron los mejores resultados fue 10^7 , después de realizar el lavado en las frutas y recuperar las bacterias se realizaron una serie de diluciones para identificar con cuales se establecía un conteo que sirviera como patrón en nuestro experimento. Los resultados se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Diluciones para la concentración 10^7 utilizado como inóculo peso muestra 20-25gr.

	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
A	15/26	2/0	0/0	0/0
B	19/13	1/0	0/0	0/0
C	40/16	4/3	0/0	0/0

En el cuadro anterior se puede observar que con la dilución 10^{-3} se obtuvo un conteo adecuado por lo cual se decidió utilizar esa dilución incluyendo 10^{-1} y 10^{-2} .

4.5.4 Control pool bacteriano e inculo contaminante

Para tener un control, semanalmente después que se replicaban las cepas y se preparaban tanto el pool bacteriano como el inculo, se sembraba en placas para cerciorarse que el conteo de 10^9 UFC/ml en el pool y 10^7 UFC/ml en el inculo era correcto. Para el inculo se realizaba una serie de diluciones hasta 10^{-7} de las cuales se sembraban las ultimas tres, 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} , el primer tubo de dilución contenía 980 μ l de agua peptonada al cual se le añadían 20 μ l del inculo contaminante los cuales contenían 10^7 UFC para así tener esta concentración en 1 ml, todos los demás tubos contenían 900 μ l a los cuales se transferían 100 μ l de un tubo al siguiente tubo, se sembraban 2 placas por dilución siendo un total de 6 placas para el control del inculo, para el control del pool se realizaba una serie de diluciones hasta 10^{-9} de las cuales también se sembraban las ultimas tres 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} , se sembraban la misma cantidad de placas.

4.5.5 Replicación de las cepas bacterianas

A partir de la primer preparación las cepas se estuvieron replicando cada semana para asegurar su viabilidad, pasando 100 μ l de cada cepa a tubos de enriquecimiento nuevos con 9 ml de TSBNA e incubando durante 24 horas, posteriormente también se preparaba un nuevo pool para repetir el proceso de preparación de inculo.

4.5.6 Inoculación del contaminante

El inculo contaminante a una concentración de 10^7 UFC/20 μ l del cual se utilizaban 10 μ l por cada muestra tanto para mango como para fresa, se esparcía homogéneamente sobre toda la superficie mediante la técnica de spot la cual consiste en usar una micro pipeta y repartir todo el inculo en la superficie de la fresa de una forma homogénea, el cual queda

en pequeñas gotas, se esperaba una hora para que se secaran completamente, después de este tiempo se aplicaban los distintos tratamientos (azúcar refinada, jarabe de azúcar 8%), luego cada muestra se colocaba en sus respectivas bolsas de ziplock etiquetadas con la temperatura, y la muestra(A, B o C) (Figura 5), a excepción de las tres muestras que primero se congelaban rápidamente con el nitrógeno líquido y luego se depositaban en las ziplock, por último son almacenadas a sus respectivas temperaturas. Se refrigeraban un tiempo de 18-24 horas.

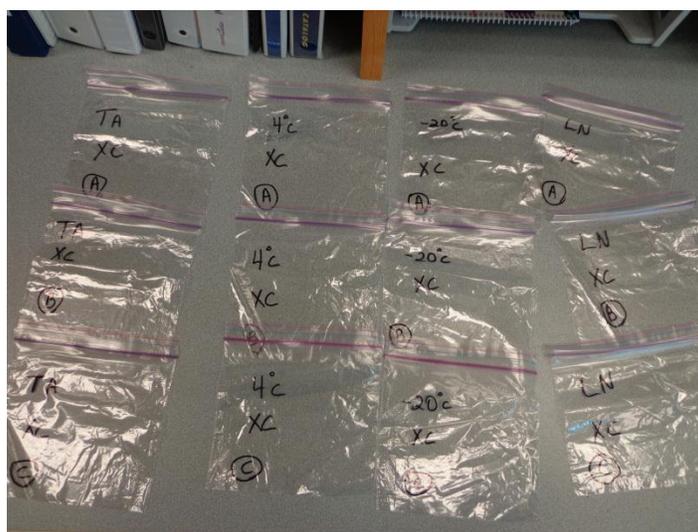


Figura 4. Bolsas ziplock utilizadas para el almacenamiento de las frutas.

4.5.7 Recuperación de las bacterias inoculadas en las frutas

Para esta etapa del experimento se tuvo que definir la solución que se utilizaría para el lavado, debido a que en los primeros experimentos en los que se estaba tratando de definir el inculo se utilizó agua peptonada, con estas pruebas se comparo el agua peptonada 0.1% y el 2XDE, en el experimento se utilizaron dos fresas para cada solución contaminándolas con inculo 10^4 . Los resultados se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Comparación de la eficiencia de recuperación en el lavado entre el agua peptonada 0.1% y el 2XDE peso por muestra fresa (20-25 gr), Inoculo= *Salmonella* 10⁴.

	Agua peptonada 0.1%		2XDE	
	dilucion			
	directa	10 ⁻¹	directa	10 ⁻¹
A	0,0	0,0	0,0	1,0
B	0,1	0,0	0,0	0,0

No se encontró diferencia entre estas dos soluciones referente a la eficiencia de recuperación de *Salmonella*, por lo cual se decidió seguir trabajando con el agua peptonada debido a la facilidad en su preparación en comparación con el 2XDE.

El lavado consistió en utilizar 40 ml de agua peptonada 0.1% para cada muestra después de que estas permanecieron 18-24 horas en sus respectivas temperaturas de almacenamiento, así como se observa en la Figura 6, para cada experimento se utilizaban doce tubos de polietileno de 50 ml uno para cada muestra. El agua peptonada era depositada dentro de las bolsas ziplock las cuales contenían la muestra de fruta, con un cronometro se media el tiempo el cual era de un minuto para cada muestra, utilizando el equipo necesario de protección personal mascara guantes y gabacha se comenzaba el lavado repartiendo el minuto de la siguiente manera: los primeros 15 segundos se agita la bolsa, los siguientes 30 segundos la fruta se frotaba con los dedos y los últimos 15 segundos se agitaba nuevamente. El lavado que se obtenía era depositado de nuevo en los tubos de 50 ml para su posterior dilución y siembra. Este mismo proceso se realizaba con todas las muestras.



Figura 5. Lavado de pulpa de mango mismo utilizado para las fresas y la cascara.

4.5.8 Dilución de las soluciones de lavado

Una vez recuperadas las bacterias y teniendo las soluciones en cada tubo de 50 ml se procedía a realizar el seriado de diluciones ya definido anteriormente. Se utilizaron microtubos de 1 ml dos para cada tubo de 50 ml, los microtubos contenían 900 μl de agua peptonada, la dilución se realizaba de la siguiente manera; de un tubo de 50 ml con una micropipeta se pasaban 100 μl al primer microtubo el cual pasaba a ser la dilución 10^{-1} , se cambiaba el tip de la micropipeta para evitar errores en las diluciones, luego se agitaba el microtubo de la primer dilución y se tomaban 100 μl para el segundo tubo el cual seria la dilución 10^{-2} .

4.5.9 Siembra en Placas Petri

El día anterior a este paso las placas se dejaban a temperatura ambiente, para evitar retrasos en el secado al momento de extender las bacterias, debido a la humedad que estas tenían por el tiempo que pudieron haber permanecido en el cuarto frio. Se sembraban 6 placas por muestra (2 por dilución) como se representa en la Figura 7. Por lo tanto el total de placas por experimento era de 72, y cada experimento se repetía 3 veces, siendo un total de 216 placas por cada experimento, normalmente esto se realizaba en una semana. Una vez

teniendo las placas rotuladas con los siguientes datos: temperatura, corrida experimental o muestra (A, B o C), y la dilución (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), se procedía a realizar la siembra en superficie, se utilizaban 100 μ l por placa. Las placas en las que se sembraba directamente la solución de lavado contenida en los tubos de 50 ml, pasaban a ser la dilución 10^{-1} , las que eran sembradas con las diluciones contenidas en los microtubos 10^{-1} pasaban a ser la dilución 10^{-2} , así mismo las que fueron sembradas con las diluciones de los microtubos 10^{-2} en placas eran la dilución 10^{-3} . Cuando se terminaba de transferir las soluciones de lavado a sus respectivas placas estas eran extendidas homogéneamente en toda la superficie del medio contenido en las placas utilizando esparcidores de vidrio debidamente esterilizados, finalmente se incubaban las placas a una temperatura de 37°C durante aproximadamente 18-24 horas para su posterior lectura.

-20°C

Bolsas ziplock contenedoras de las muestras de fruta almacenadas a las distintas temperaturas

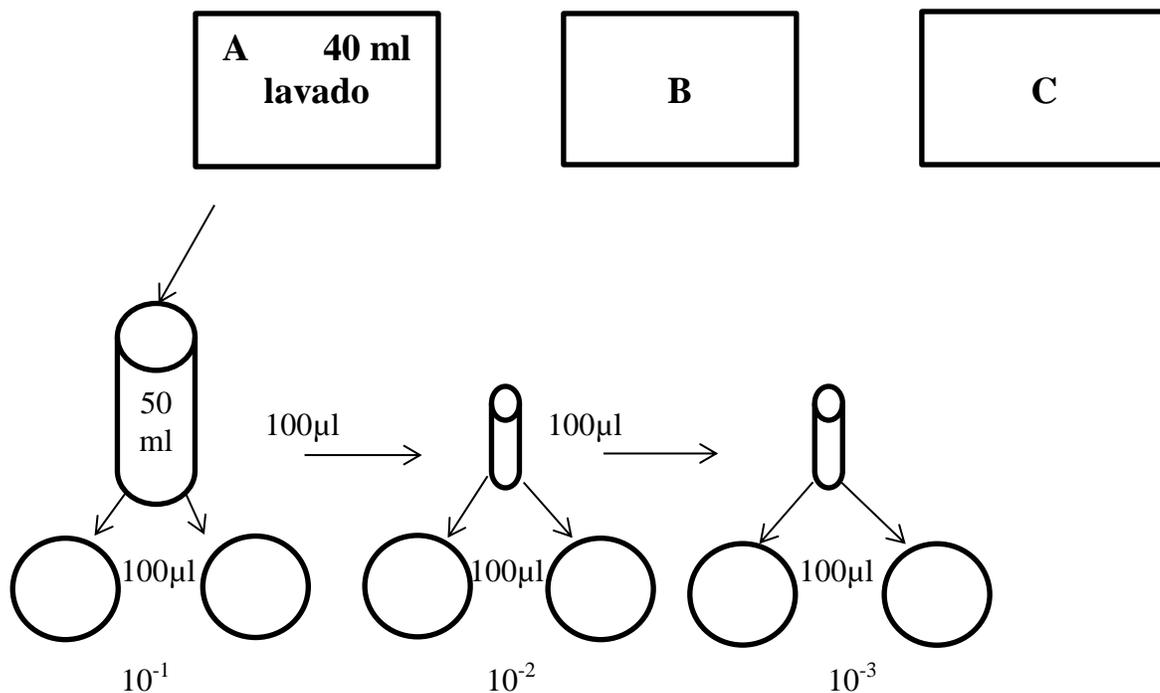


Figura 6. Esquema de las diluciones realizadas y la siembra en placas.

4.6 Lectura de resultados

Después de las 24 horas de inoculación las colonias bacterianas eran lo suficientemente grandes para su conteo, se utilizó un contador de bacterias tradicional (Figura 8), las colonias de *Salmonella* por lo general son redondas, grisáceas, y planas, si se tenían duda de algunas colonias y la cantidad era considerable se realizaba una aglutinación la cual es una prueba serológica antígeno-anticuerpo. Los datos se ingresaban en una tabla en la cual están indicados los datos como temperaturas, corrida, y diluciones. Anexo 1.



Figura 7. Conteo de colonias de *Salmonella*.

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Supervivencia de *Salmonella* en fresas y mangos

Una vez concluidos los experimentos, se promediaron los resultados de cada uno, expresándolos en LOG10, mostrando la cantidad de bacterias presente en las frutas después de los distintos tratamientos tal y como se muestra en el Cuadro 4 A partir de estos resultados se realizaron distintos gráficos para la interpretación de los resultados.

Cuadro 4. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos con fresas y mangos, expresados en LOG10.

FRESAS	21 °C		4°C		-20°C		NL	
	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD
Fresa	5.05	0.23	4.14	0.26	2.25	0.63	2.49	0.7
Fresa con azúcar	4.17	0.36	3.96	0.21	3.73	0.69	2.66	0.5
S. adaptada azucar	4.25	0.4	4.23	0.3	3.68	0.29	3.09	0.31
S. adaptada con jarabe	4.29	0.37	4.17	0.17	3.81	0.27	3.83	0.27
MANGOS	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD
pulpa	4.47	0.28	4.34	0.15	3.49	0.97	3.24	0.91
xcascara	5.1	0.19	3.98	0.37	3.05	0.31	3.02	0.4
xpulpa	2.39	1.15	1.02	0.79	0.81	0.54	0.7	0.46
placas	8/9		9/9		4/9		6/9	
tubos TSBNA	9/9		9/9		9/9		9/9	

Al analizar los resultados de la Figura 9 se observa que en general ninguno de los tratamientos a las distintas temperaturas fue efectivo en fresas, *Salmonella* fue capaz de resistir las distintas temperaturas, la congelación rápida con nitrógeno líquido, sin embargo en unos experimentos el crecimiento fue menor que en otros, como lo es en el caso que se obtuvo menor crecimiento con la temperatura de -20 °C y las fresas sin ningún tratamiento. Las temperaturas de mayor interés para el estudio fueron la de -20 °C que es la congelación convencional que utilizan las personas en sus casas y la congelación con nitrógeno líquido que es utilizada por la industria alimentaria, obteniendo levemente mejores resultados con el nitrógeno líquido, en el gráfico se puede observar que el uso del azúcar fue sustancialmente más efectivo que el uso del jarabe en las temperaturas mencionadas, esto puede ser debido a que cuando se utilizó azúcar directamente la concentración en la superficie de las fresas era mayor, lo cual pudo aumentar el efecto de la presión osmótica sobre las bacterias, también podemos observar que no hubo una diferencia considerable entre el uso de bacterias que pasaron por un proceso de adaptación a la acidez y las bacterias normales.

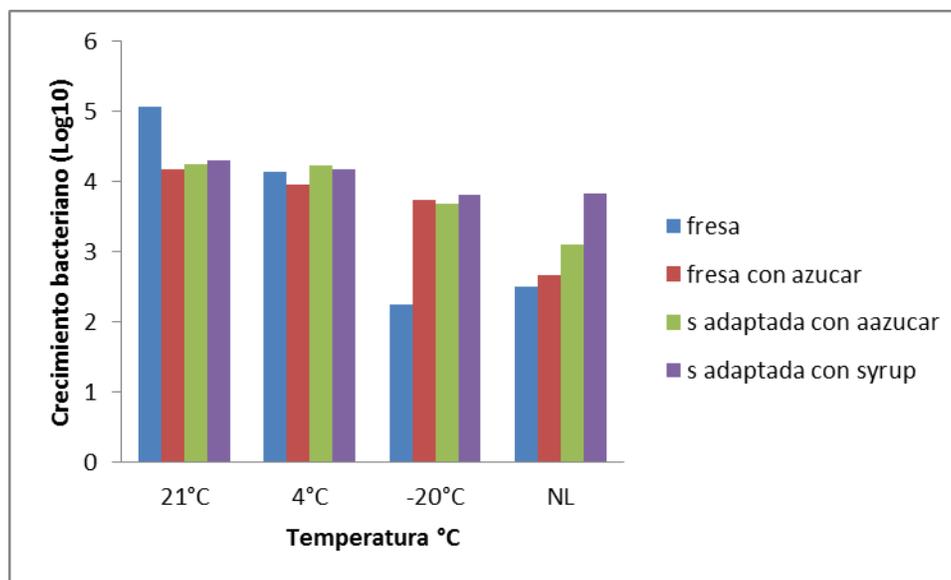


Figura 8. Gráfico en el que se muestran los resultados de los experimentos con fresa a las distintas temperaturas.

En la Figura 10 se puede observar que al igual que las fresas, el mango presenta las condiciones adecuadas para el crecimiento de *Salmonella* que a pesar de ser expuesta a distintas temperaturas tanto en pulpa de mango como en la cascara sobrevivió, lo cual muestra su resistencia a las bajas temperatura. También se observa una mayor prevalencia de *Salmonella* en la pulpa que fue contaminada directamente en comparación con la cascara. Al igual que con las fresas el nitrógeno líquido fue mas efectivo pero la diferencia se redujo casi al punto de igualdad. En cuanto a la parte de contaminación cruzada en todas las ocasiones ocurrió el transporte de bacterias desde la cascara hacia la pulpa, aunque en algunos casos no hubo crecimiento en placas, si lo hubo en todo momento en los tubos de enriquecimiento, en algunas ocasiones las cantidades no fueron tan altas, el problema es que *Salmonella* es un microorganismo altamente patógeno, no se ocupa una cantidad de células tan alta para provocar una infección, es por eso que en los alimentos se exige ausencia de este microorganismo.

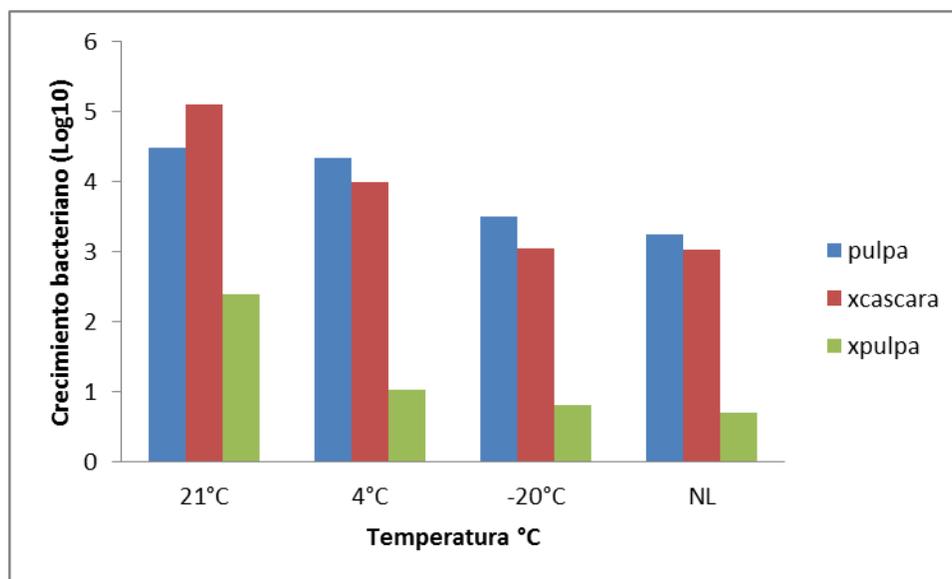


Figura 9. Gráfico de los resultados obtenidos en pulpa de mango y la contaminación cruzada tanto en cascara (xcascara) y pulpa (xpulpa).

La Figura 11 muestra que la mayor supervivencia de *Salmonella* se dio en mangos, esto posiblemente por las condiciones para el crecimiento bacteriano de cada fruta, ya que la fresa es más ácida que el mango, sin embargo las cantidades recuperadas en ambas frutas a las distintas temperaturas no son aceptables es necesario la ausencia de este microorganismo. En fresas el crecimiento fue menor en la temperatura -20°C pero la diferencia no es significativa por lo cual se prefiere el uso de nitrógeno líquido por sus ventajas en la conservación de las características organolépticas.

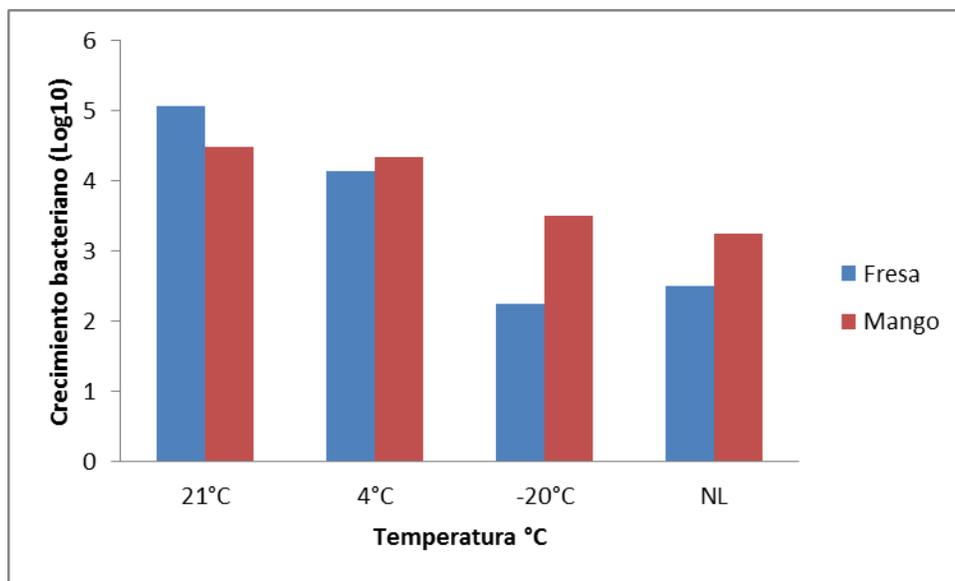


Figura 10. Gráfico comparativo del crecimiento de *Salmonella* entre fresas y mangos.

VI CONCLUSIONES

El efecto de los distintos tratamientos utilizados no fue el suficiente para la eliminación total de *Salmonella* en las distintas frutas, lo cual es necesario para la comercialización de cualquier alimento. Esto mostró la gran resistencia que muestra *Salmonella* a las temperaturas bajas.

El uso de azúcar directamente sin disolverla en un jarabe, presentó mejores resultados, en cuanto al efecto sobre la supervivencia de *Salmonella*. Pero no fue un efecto significativo, su función fue más la conservación de la textura.

El mango presenta mejores condiciones para el crecimiento de *Salmonella* en comparación con las fresas, esto posiblemente debido a las características de las dos frutas, como la acidez, la fresa tiene un pH más bajo que el mango.

La contaminación cruzada con *Salmonella* en mangos de la cascara hacia la pulpa, al momentos de realizar cortes para el consumo, es en la mayoría de los casos inevitable si no se toman las medidas necesarias de higiene.

VII RECOMENDACIONES

Para los investigadores que quieran incursionar en esta área, sería muy interesante modificar los factores a estudiar como por ejemplo: el tiempo de almacenamiento que en este caso solo fue de un día.

El buen cumplimiento y mejoramiento en las actividades tanto de poscosecha como en planta, ya que esta es la mejor manera de combatir esta bacteria evitando la contaminación.

Para las industrias que elaboran mango mínimamente procesado o productos derivados del mango, tomar en cuenta la contaminación cruzada que ocurre al momento de la manipulación del mango.

La realización de investigaciones para observar si es posible el paso de *Salmonella* de la cascara del mango hacia la pulpa a través de los estomas.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Organización Mundial de la Salud (OMS). Inocuidad de los alimentos, consultado el 7 de junio 2012. Disponible en: http://www.who.int/topics/food_safety/es/

Hernández, A; Valdés-Dapena, V; Zuazo Silva, J. 2001. Microbiología y Parasitología Medicas, Editorial de Ciencias Médicas, Ciudad de la Habana, 141 p.

García, R y Zurera, G. 2004. Modelización Predictiva de Desarrollo Bacteriano en los Alimentos. Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Campus Rabanales. Universidad de Córdoba. Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía oriental. Anales - vol. 17(1).

García, A y Rodríguez F. 2010. Enterobacterias. Albacete España Medicine. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Servicio de Medicina Interna. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete.10 (51):3426-31.

Dos Santos, E. 2007. Estudio del Comportamiento Cinético de Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos Universidad Autónoma de Barcelona, departamento de ciencia animal y de los alimentos , área de nutrición y bromatología

Méndez, A. 2010. Caracterización microbiológica de *Salmonella* en alimentos de venta callejera en un sector universitario de Bogotá, Colombia. Médicas uis revista de los estudiantes de medicina de la universidad industrial de Santander

Madrid, A; Gómez J.M; F. Santiago; Madrid J.M; Cenzano J.M. 2003. Refrigeración, congelación y envasado de los alimentos, Madrid, España

Rushing, W. 2012. MEJORANDO LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE FRUTAS Y HORTALIZAS FRESCAS, Universidad de Maryland.

CDC (Centro para el control y prevención de enfermedades), 2012. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Consultado en línea el 6 de Diciembre del 2012 disponible en: <http://www.cdc.gov/spanish/Datos/BrotesEnfermedades/>.

National Center for Health. Investigación sobre brote de infecciones en humanos causadas por la *Salmonella entérica* serotipo I,4,[5],12:i:-. National Center for Zoonotic, Vector Borne, and Enteric Disease. Consultado en línea el 5 de Diciembre: www.cdc.gov/spanish/especialesCDC/salmonella_map.html

Administración de Alimentos y Drogas (FDA) 2012. Ley de Modernización de Seguridad Alimentaria. Departamento de Salud y Servicio Humano. Consultado el 7 de diciembre del 2012 disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FSMA/ucm239554.htm>.

FDA 2012. COMUNICADO DE PRENSA DE LA FDA, Mangos Contaminados con *Salmonella* provenientes de México. Consultado en línea el 7 de Diciembre del 2012 disponible en la página web de la FDA en el siguiente link: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm319540.htm>.

Food and Drug Administration (FDA) 2008. Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut Fruits and Vegetables. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Food Safety and Applied Nutrition.

USDA. 2002. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. PATHOGEN REDUCTION: A SCIENTIFIC DIALOGUE, Georgetown University Conference Center, 3800 Reservoir Road, Washington, D.C. 20057.

Codex Alimentarius 1981, NORMA DEL CODEX PARA LAS FRESAS CONGELADAS RAPIDAMENTE CODEX STAN 52-1981.

Perez A. 2012. Fruit and Tree Nuts Outlook, USDA (United States Department of Agriculture).

FDA. 2012. Bad Bug Book - Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins - Second Edition

United Fresh Produce Association (UFPA). 2010. Microbiological Testing of Fresh Produce, A White Paper on Considerations in Developing and Using Microbiological Sampling and Testing Procedures if Used as Part of a Food Safety Program for Fresh Fruit and Vegetable Products.

ANEXOS

Anexo 1 Cuadro de resultados utilizada en todos los experimentos.

	21 °C			4 °C			-20 °C			NL		
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
A												
B												
C												