



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Efecto de la desinfección química y calentamiento óhmico sobre biopelículas de *Salmonella enterica* en papaya (*Carica papaya* L.)

**Tesis**  
Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

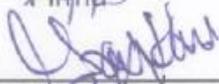
**Presenta:**  
Q.F.B. Beatriz Adriana Luz Martínez

**Dirigido por:**  
Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

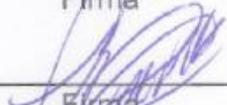
Dra. Montserrat Hernández Iturriaga  
Presidente

  
Firma

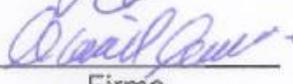
Dra. Marcela Gaytán Martínez  
Secretario

  
Firma

Dr. Ramón A. Martínez Peniche  
Vocal

  
Firma

Dr. Alejandro Castillo Ayala  
Suplente

  
Firma

Dra. Sofía María Arvizu Medrano  
Suplente

  
Firma

  
Dra. Silvia L. Amaya Llano  
Director de la Facultad

  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Diciembre, 2018

## RESUMEN

El consumo de papaya se ha relacionado con brotes de *Salmonella enterica*. Evaluaciones realizadas en otros frutos revelan que la desinfección química no logra la completa inactivación de microorganismos patógenos. Uno de los factores que puede influir en la eficacia de los desinfectantes es la formación de biopelículas bacterianas sobre la superficie del fruto. El objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad de tratamientos de descontaminación sobre células de *Salmonella enterica* libres y en biopelículas en papaya. Se evaluó la capacidad de *Salmonella* para formar biopelículas inoculando en el epicarpio de papaya 50  $\mu$ L ( $10^6$  Log UFC/mL) de un cóctel de cinco cepas. Las papayas se almacenaron a 97 % de humedad relativa y 25 o 30 °C durante 72 h. Periódicamente se realizaron las siguientes evaluaciones: 1) recuento de *Salmonella*; 2) cuantificación de biopolímeros y 3) microscopía electrónica de barrido. Se determinó la eficacia de desinfectantes químicos [cloro (200 ppm), ácido peracético (80 ppm), agua electrolizada neutra (50 ppm)] y calentamiento óhmico (55 y 65 °C por 60 y 90 s) y la combinación de ambos. A 25 °C y 24 h de incubación, la población aumentó 1.1 Log UFC/cm<sup>2</sup>; la densidad óptica (DO<sub>595nm</sub>) también aumentó 0.6 unidades. Después de 48 h, la población y los polímeros de *Salmonella* mostraron un aumento de 2.2 Log UFC/cm<sup>2</sup> y 1.31, respectivamente. No hubo diferencias estadísticamente significativas a las 72 h ( $p > 0.05$ ). Se observaron resultados similares a 30 °C. Las micrografías electrónicas mostraron agregados de células bacterianas incrustadas en material polimérico. Los tratamientos con desinfectantes químicos redujeron menos de 2 Log de carga bacteriana (células libres y en biopelícula), mientras que el calentamiento óhmico resultó ser eficaz a 65 °C por 60 y 90 s reduciendo más de 5 Log UFC/cm<sup>2</sup>. El calentamiento óhmico a 55 °C redujo alrededor del 40 % de la población y su eficacia incrementó a 44-50 % cuando se combinó con las soluciones desinfectantes. Ya que *Salmonella* puede formar biopelículas en el fruto y con ello incrementar su resistencia, el calentamiento óhmico es una buena alternativa para asegurar la inocuidad de productos frescos como la papaya.

**(Palabras clave:** biopelículas, agua electrolizada neutra, calentamiento óhmico, papayas, *Salmonella enterica*)

## SUMMARY

Papaya consumption has been linked to outbreaks of *Salmonella enterica*. Evaluations carried out in other fruits reveal that chemical disinfection does not achieve complete inactivation of pathogenic microorganisms. One of the factors that can influence the effectiveness of disinfectants is bacterial biofilms formation on the surface of the fruit. The objective of this work was to evaluate the effectiveness of decontamination treatments on free cells of *Salmonella enterica* and immerse into biofilms on papaya. The ability of *Salmonella* to form biofilms was evaluated by inoculating on the papaya epicarp 50  $\mu$ L ( $10^6$  Log CFU/mL) of a cocktail of five strains. Papayas were stored at 97% relative humidity and 25 or 30 °C for up to 72 h. The following evaluations were made periodically: 1) *Salmonella* quantification; 2) quantification of biopolymers and 3) scanning electron microscopy. The effectiveness of the chemical disinfectants [chlorine (200 ppm), peracetic acid (80 ppm), neutral electrolyzed water (50 ppm)] and ohmic heating (55 and 65 °C for 60 and 90 s) and combination of both was determined. At 25 °C, population increased 1.1 Log CFU/cm<sup>2</sup>; the optical density (OD<sub>595nm</sub>) also increased to 0.6 units. After 48 h, the *Salmonella* population and polymers showed an increase of 2.2 Log CFU/cm<sup>2</sup> and 1.31, respectively. There were no statistically significant differences at 72 h ( $p > 0.05$ ). Similar results were observed at 30 °C. The electron micrographs showed aggregates of bacterial cells embedded in polymeric material. The treatments with chemical disinfectants reduced less than 2 Log of bacterial load (free cells and into biofilm) compared to the ohmic heating that turned out to be effective in reducing more than 5 Log CFU/g at 65 °C for 60 and 90 s. Ohmic heating at 55 °C reduced around 40 % and its effectiveness increased to 44 - 50 % when it was combined with disinfectant solutions. Since *Salmonella* can form biofilms in the fruit and thereby increase its resistance, ohmic heating is a good alternative to guarantee safety of fresh produce such as papaya.

**(Keywords:** biofilms, neutral electrolyzed water, ohmic heating, papayas, *Salmonella enterica*)

## DEDICATORIAS

*A mi papá Francisco<sup>†</sup>, el hombre que me enseñó a ser fuerte, a nunca dejar de prepararme y alcanzar mis metas.*

*A mi mamá Irene y mis hermanos. A mi novio Gustavo. Los amo.*

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada para cursar un posgrado de calidad.

A la **Universidad Autónoma de Querétaro** y la **Facultad de Química** por darme la oportunidad de seguir creciendo en mi vida universitaria.

Al **Posgrado de Ciencia y Tecnología de Alimentos** y sus **docentes** por las enseñanzas, apoyo, consejos y siempre recibirme con los brazos abiertos.

A la **Dra. Montserrat Hernández Iturriaga** por guiarme desde el inicio de mi maestría. Siempre fueron buenos esos consejos, regaños, palabras de aliento cuando los experimentos no salían bien y el estrés me consumía. Gracias por recargarme la pila cada vez que nos reuníamos, gracias por su confianza, por creer en mí.

A los doctores integrantes de mi comité de tesis: **Dra. Marcela, Dr. Peniche, Dra. Sofi** y **Dr. Alex** por el aporte de sus conocimientos a mi proyecto, sus consejos y paciencia.

A **mi mamá** por ser el motor de mi vida, por confiar, por su apoyo, por ser tan fuerte e inspirarme a ser mejor. Mil gracias por todo te quiero mucho. A mis hermanos **Vane, Bryan, Homero, Juan** y **Paco** por hacer la vida más llevadera, por las risas, por los buenos y los malos momentos, por apoyarme. Los quiero mucho familia.

A mis amigos **Probióticos** y compañeros de generación **Rebe, Vane, Itzel, Beto, Raúl** e **Isac**. Porque fueron como mi familia desde que llegue a Querétaro sin conocer a nadie. Juntos fuimos poco a poquito y acompañándonos siempre, sufriendo con las exposiciones de Bioquímica y las tareas de Diseño de experimentos. Pero siempre encontrando el momento para divertirnos y celebrar. Gracias por su amistad.

A mis amigos y compañeros de laboratorio **Angie, Lalo, Carlos, Yuri** por su alegría, apoyo, consejos, por estar siempre. Por compartirme un pedacito de su vida, por todas esas vivencias fuera y dentro del laboratorio que nos hicieron un gran equipo, **#TeamInocuidad**, los quiero con todo mi corazón. A la **Sra Martha, Dulce y Marla** por apoyarme con sus conocimientos y enseñanzas en mi trabajo.

A mi mejor amigo y amor incondicional **Gustavo** por sus palabras, apoyo, buenos deseos, confianza, cariño. Porque estuviste siempre que te necesite, gracias por creer en mí, gran parte de este título te lo debo a ti porque me inspiraste con tus sueños. Gracias por consentirme, por tus abrazos que curan todo.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Papaya (Carica papaya L.).....</b>	<b>9</b>
2.1.1 Origen y descripción .....	9
2.1.2 Producción de papaya .....	10
2.1.3 Procesamiento de la papaya.....	11
<b>2.2 Microorganismos presentes en papaya .....</b>	<b>11</b>
2.2.1 Microbiota nativa y enfermedades .....	11
2.2.2 Microorganismos patógenos .....	12
2.2.3 Brotes asociados al consumo de papaya.....	14
<b>2.3 Métodos de control de microorganismos patógenos en frutas .....</b>	<b>15</b>
2.3.1 Tratamientos físicos .....	15
2.3.1.1 Calentamiento óhmico para la inactivación bacteriana .....	18
2.3.2 Tratamientos químicos.....	19
2.3.3 Factores que afectan la eficacia de los tratamientos de descontaminación	
20	
<b>2.4 Biopelículas bacterianas .....</b>	<b>21</b>
2.4.1 Formación de biopelículas bacterianas.....	22
2.4.2 Composición de las biopelículas.....	24
2.4.3 Resistencia adquirida en células inmersas en biopelículas .....	25
2.4.4 Formación de biopelículas en frutas .....	26
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>27</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>

<b>4.1</b>	<b>Objetivo general .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>28</b>
<b>5.</b>	<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1</b>	<b>Materiales.....</b>	<b>29</b>
5.1.1	Equipos .....	29
5.1.2	Medios de cultivo .....	29
5.1.3	Soluciones .....	30
5.1.4	Reactivos .....	31
<b>5.2</b>	<b>Material biológico.....</b>	<b>31</b>
5.2.1	Papayas .....	31
5.2.2	Cepas bacterianas .....	32
<b>5.3</b>	<b>Métodos .....</b>	<b>32</b>
5.3.1	Formación de biopelículas de <i>Salmonella</i> sobre la superficie de papayas. 32	
5.3.1.1	Activación de las cepas y preparación del inóculo.....	32
5.3.1.2	Preparación del epicarpio de papaya.....	33
5.3.1.3	Formación de las biopelículas.....	33
5.3.2	Evaluación de la eficacia de tratamientos de desinfección para inactivar células de <i>Salmonella</i> libres y en biopelícula formadas en papaya .....	35
5.3.2.1	Inoculación de la papaya .....	35
5.3.2.2	Aplicación de los tratamientos de desinfección química .....	35
5.3.2.3	Aplicación de calentamiento óhmico.....	36
5.3.2.4	Aplicación de calentamiento óhmico en combinación con soluciones desinfectantes .....	37
5.3.2.5	Vida de anaquel del fruto después de tratamientos con calentamiento óhmico	37

5.3.3	Diseño experimental y análisis estadístico.....	38
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
6.1	Capacidad de <i>Salmonella</i> para formar biopelículas en el epicarpio de papaya.....	39
6.2	Efecto de tratamientos de desinfección sobre células de <i>Salmonella</i> (libres y en biopelícula) en papaya .....	45
6.3	Efecto del calentamiento óhmico sobre células libres y en biopelícula de <i>Salmonella</i> en papaya.....	48
6.3.1	Efecto de la combinación de calentamiento óhmico y soluciones desinfectantes sobre <i>Salmonella</i> (células libres y en biopelícula) inoculada en papaya.....	50
6.4	Efecto del calentamiento óhmico sobre la calidad de la papaya .....	53
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>59</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>60</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>74</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales países productores de papaya en el mundo (miles de toneladas).....	10
Tabla 2. Crecimiento de <i>Salmonella</i> inoculada en papaya y almacenada a 25 y 30 °C durante 72 h. ....	40
Tabla 3. Reducción de la población de <i>Salmonella</i> después de tratamientos con desinfectantes y calentamiento óhmico en papaya (células libres y en biopelícula). .....	53
Tabla 4. Conteo de hongos en papaya después de tratamiento con calentamiento óhmico.....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Principales fuentes de contaminación de frutas y hortalizas .....	13
Figura 2.2. Etapas de la formación de biopelículas bacterianas. ....	23
Figura 5.1. Diagrama del sistema de calentamiento óhmico .....	36
Figura 6.1. Comportamiento de <i>Salmonella</i> en papaya almacenada a 25 (a) y 30 °C (b).....	40
Figura 6.2 Cuantificación de biopolímeros producidos por <i>Salmonella</i> en papaya almacenada a 25 °C.....	42
Figura 6.3 Población de <i>Salmonella</i> y biopolímeros formados en papaya almacenada a 25 °C.....	43
Figura 6.4 Micrografías electrónicas de barrido (x5000) de biopelículas de <i>Salmonella</i> formadas en la superficie de papaya almacenada durante 72 h. ....	44
Figura 6.5. Efecto del secado en la viabilidad de células de <i>Salmonella</i> inoculadas en papaya.....	46
Figura 6.6. Reducción de la población de <i>Salmonella</i> (células libres y en biopelícula) en papaya desinfectada. ....	47
Figura 6.7. Efecto de la aplicación de calentamiento óhmico sobre la población de <i>Salmonella</i> en papaya (células libres y en biopelícula).. ....	49
Figura 6.8 Efecto del calentamiento óhmico (55 °C) en combinación con desinfectantes sobre la población de <i>Salmonella</i> en papaya (células libres y en biopelícula).....	51
Figura 6.9. Firmeza (N) de frutos de papaya después de tratamiento con calentamiento óhmico almacenada a 17 °C durante 9 días.. ....	55

Figura 6.10. Papayas tratadas con calentamiento óhmico en combinación con desinfectantes después del almacenamiento durante 9 días a 17 °C..... 57

## 1. INTRODUCCIÓN

México es el quinto productor de papaya en el mundo con alrededor de 836,370 toneladas producidas en el año 2017. El consumo de papaya ha ocasionado problemas de seguridad alimentaria ya que durante su producción puede contaminarse con bacterias patógenas en diferentes puntos a lo largo de las etapas del cultivo y cosecha. Además, previo a su consumo se requiere manipulación (pelado y cortado) por lo que está fácilmente expuesta a condiciones medioambientales antihigiénicas que conllevan a la contaminación cruzada. Su consumo se ha relacionado con brotes de *Salmonella enterica* en Australia (2006) (Gibbs *et al.*, 2009) y Estados Unidos (EE. UU.). Específicamente en este último, en 2011 se reportaron casos de salmonelosis provocados por *S. Agona* (CDC, 2011) y más tarde en 2017 se reportó otro brote en donde estuvieron implicados nueve serovares de *Salmonella*: Urbana, Newport, Infantis, Anatum, Thompson, Kiambu, Agona, Gaminara, y Senftenberg. En estos brotes ocurridos en EE. UU. la fuente de contaminación fueron papayas importadas de México (CDC, 2017).

Las estrategias para evitar la presencia de microorganismos patógenos en frutos mínimamente procesados se enfocan en: 1) La prevención de la contaminación durante su producción en el campo mediante la implementación de Buenas Prácticas Agrícolas, y 2) La aplicación de tratamientos de descontaminación (físicos o químicos) durante su procesamiento.

Los tratamientos físicos y químicos de descontaminación, como el uso de luz ultravioleta (UV), radiación gamma, campos eléctricos pulsados y desinfectantes químicos se han aplicado a frutos buscando eliminar la presencia de patógenos como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. En el caso de los desinfectantes químicos se sabe que su eficacia en frutas frescas se ve influenciada por varios factores como el tipo y la concentración del desinfectante, el pH, la naturaleza de la superficie, la internalización y la formación de biopelículas por el patógeno (Petri *et al.*, 2015). Y

se sabe que la eficacia de los desinfectantes para eliminar completamente las bacterias patógenas en productos frescos es baja (Huang *et al.*, 2018).

La formación de biopelículas bacterianas en las superficies de los frutos puede proporcionar un ambiente protector para los microorganismos patógenos, reduciendo la eficacia de desinfectantes. Estas biopelículas se componen de comunidades complejas de bacterias donde las células se encuentran embebidas en una matriz autoproducida de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés), unidas entre ellas y adheridas a la superficie de los frutos (Yaron *et al.*, 2014). Las bacterias en las biopelículas son capaces de adaptarse rápidamente a las condiciones ambientales cambiantes. Las EPS pueden proporcionar una barrera física contra la difusión de agentes antimicrobianos y ofrecer protección contra factores de estrés ambiental tales como radiación UV, tensiones osmóticas y desecación (Coughlan *et al.*, 2016). La capacidad de algunos patógenos como *Salmonella* para formar biopelículas, representa un peligro ya que una vez que la biopelícula se encuentra en el epicarpio del fruto fresco, puede propiciar contaminación directa o cruzada a las superficies del equipo en la industria, a otros frutos y a productos mínimamente procesados (Janssens *et al.*, 2008).

Ante tal situación la implementación de nuevos métodos de descontaminación efectivos durante el procesamiento de fruto es indispensable para minimizar el riesgo de enfermar al consumidor. Tal es el caso del calentamiento óhmico que se ha aplicado en jugos de frutas dando buenos resultados para la inactivación de patógenos como *E. coli*, *L. monocytogenes* y *Salmonella*, además de mantener la calidad nutricional y organoléptica del producto. Sin embargo, éste no ha sido aplicado a frutas enteras.

En esta investigación se evaluó la eficacia de tratamientos de desinfección química (cloro, ácido peracético y agua electrolizada neutra) y calentamiento óhmico para inactivar células de *Salmonella* libres y en biopelículas formadas en la superficie de papayas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Papaya (*Carica papaya* L.).

#### 2.1.1 Origen y descripción

El papayo (*Carica papaya* L.) pertenece a la familia *Caricaceae*, que incluye 35 especies colocadas en seis géneros. Es un arbusto frutal tropical semileñoso que crece rápidamente, raramente se ramifica, con una fase juvenil corta de tres a ocho meses. La papaya es la única especie del género *Carica*, siendo también la más conocida y económicamente más importante dentro de la familia cultivándose extensivamente en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Ramos *et al.*, 2012). No hay evidencia arqueológica directa del centro de origen de la papaya, pero la presencia de poblaciones naturales en México y Centroamérica y su cultivo en México y Belice anteriores a los españoles sugieren un origen mesoamericano (Vanburen *et al.*, 2015). La fruta del papayo es una de las más nutritivas de las 35 frutas comúnmente consumidas basándonos en el porcentaje de la cantidad diaria recomendada de vitaminas A y C, folato, potasio, niacina, tiamina, hierro, riboflavina, calcio y fibra. La papaya también se cultiva por su látex que contiene la enzima proteolítica papaína utilizada para hidrolizar péptidos de cerveza, ablandamiento de carnes y aplicaciones medicinales (Ming *et al.*, 2007).

La clasificación taxonómica de la papaya es la siguiente (SIOVM, 2012):

REINO: *Plantae*

DIVISIÓN: *Magnoliophyta*

CLASE: *Magnoliopsida*

ORDEN: *Violales*

FAMILIA: *Caricaceae*

GÉNERO: *Carica* L., 1753

ESPECIE: *Carica papaya* L., 1753

### 2.1.2 Producción de papaya

En América, México es el segundo productor de papaya con alrededor de 836 370 toneladas cosechadas en el año 2017, y a nivel internacional ocupa el quinto lugar (SIAP, 2017) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Principales países productores de papaya en el mundo (miles de toneladas).

País	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
India	4,196	4,457.1	5,382	5,544	5,639.3	4,913	5,699
Brasil	1,871.9	1,854.3	1,517.6	1,582.6	1,603.3	1,481.1	1,424.6
Indonesia	675.8	958.2	906.3	909.8	840.1	851.4	904.2
Nigeria	750	760	775	800	850	870.8	836.7
México	616.2	634.3	712.9	764.5	836.3	883.5	951.9

(FAO, 2017)

Debido a que el papayo se reproduce por medio de semillas, se han desarrollado un gran número de variedades. Entre las más conocidas a nivel mundial se encuentran: 'Solo', 'Bluestem', 'Graham', 'Betty', 'Fairchild', 'Rissimee', 'Puna', 'Hortusgred', 'Higgins', 'Wilder', 'Hortus', 'Gold', 'Petersen', 'Zapote', 'Pusa', y 'Maradol'.

Por su importancia para nuestro país, destacan las siguientes variedades: 'Maradol': la fruta es alargada, cilíndrica, de gran tamaño, el color de su pulpa suele ser anaranjado y puede llegar a pesar entre 1 y 3 Kg. 'Solo': esta variedad produce frutos pequeños de forma aplanada y de cuello corto, con pulpa color salmón y peso entre los 400 y 800 g; se le conoce comúnmente como Hawaiana.

La papaya es cultivada en 19 entidades del país, siendo las cinco entidades más importantes Oaxaca, Colima, Chiapas, Veracruz y Michoacán. En lo que se

refiere a las exportaciones de papaya la SAGARPA indicó que para el 2016 representaron ingresos de 92.8 millones de dólares, 38.9 % más que en el 2013 (SAGARPA, 2017).

### 2.1.3 Procesamiento de la papaya

La papaya se expende en los mercados generalmente como fruto entero, previamente cosechadas, seleccionadas y lavadas. Además, en el mercado han surgido varias presentaciones del fruto para su consumo: puré, mermeladas, jugos, papaya deshidratada y fruta cortada mínimamente procesada. Por lo general, el procesamiento mínimo de la papaya incluye: clasificación, limpieza antes del procesamiento, lavado, pelado, corte en rodajas o cubos, uso de bajas temperaturas, tratamientos químicos, y envasado, antes de ser comercializadas en restaurantes, hoteles y público en general. Al ser un producto que se procesa ligeramente mantiene un estado fresco conservando la mayor parte de los nutrientes con él, por lo que el consumidor lo prefiere (Paull *et al.*, 1997).

Adicionalmente, durante el procesamiento mínimo, las cáscaras, las semillas y otras porciones no comestibles se eliminan. Por tanto, se reduce la carga no deseada durante su transporte, lo que es importante en el comercio de exportación para minimizar costos (Jayathunge *et al.*, 2014).

## 2.2 Microorganismos presentes en papaya

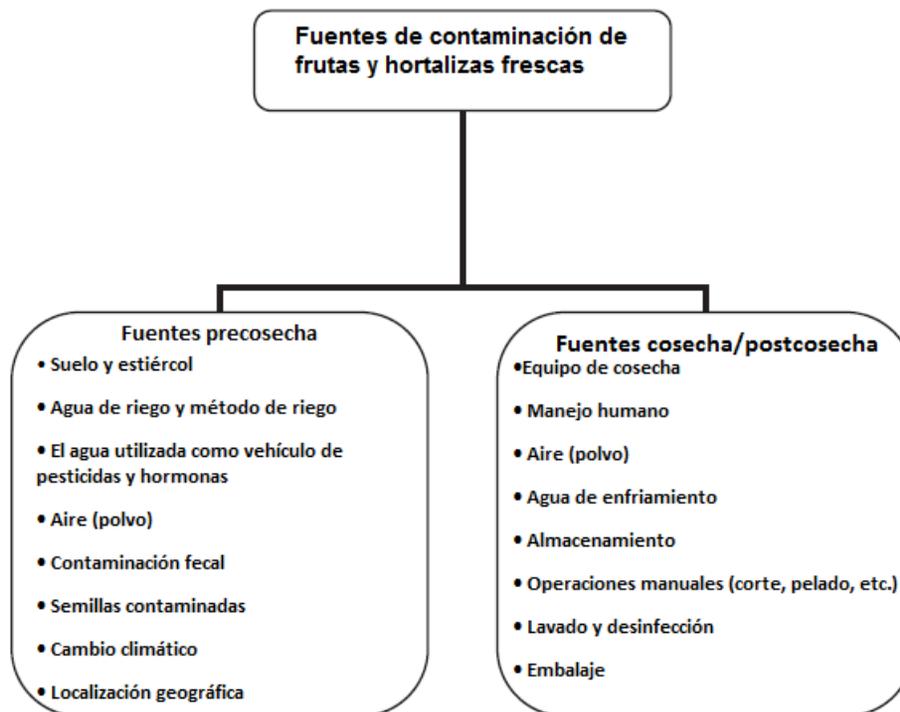
### 2.2.1 Microbiota nativa y enfermedades

Se ha caracterizado la diversidad de bacterias endófitas en el mesocarpio y semillas de variedades de papaya. Resultando que la variedad 'Red lady' posee especies de *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Acinetobacter*, la variedad 'Bangalore' tiene especies de *Bacillus* y *Kocuria* y la variedad 'Solo' especies de *Staphylococcus*,

*Acinetobacter*, *Bacillus* y *Enterobacter* (Krishnan *et al.*, 2012). También se ha encontrado que el crecimiento de la papaya está amenazado por una enfermedad viral causada por el virus de la papaya *ring spot* (PRSV) conocido comúnmente en México como “virus de la mancha anular”. Éste es un miembro del género, Potyvirus, y es transmitido por los áfidos (Wei *et al.*, 2006). A principios del siglo XX se identificaron especies del género *Erwinia* como patógenos en papaya; los síntomas típicos que produce en los cultivares son manchas en las hojas que evolucionan en lesiones foliares angulares (Gardan *et al.*, 2004).

### 2.2.2 Microorganismos patógenos

Los productos frescos pueden contaminarse con bacterias patógenas a través de diversas rutas en diferentes puntos a lo largo de las etapas del cultivo y en la cosecha (Figura 2.1). Las fuentes de contaminación en el campo incluyen el estiércol, el agua de riego, el suelo, la contaminación fecal, las semillas contaminadas y el cambio climático. Los pasos posteriores a la cosecha, incluyendo la recolección, el preenfriamiento, las operaciones de procesamiento, el lavado, la desinfección y almacenamiento pueden conducir a contaminación con microorganismos patógenos si no se utilizan adecuadamente de acuerdo con las Buenas Prácticas de Manufactura (Ölmez, 2016).



**Figura 2.1.** Principales fuentes de contaminación de frutas y hortalizas. Fuente: (Ölmez, 2016)

Se ha reportado la incidencia de microorganismos patógenos en la papaya. Un estudio realizado en Calcuta en donde colectaron muestras de papayas frescas cortadas (500 g) expandidas por vendedores ambulantes reveló que la fruta contenía poblaciones elevadas de bacterias mesófilas aerobias y coliformes, y detectaron la presencia de patógenos entéricos. De las treinta muestras de papaya tomadas durante un período de 3 meses, 48 % resultó positivo para *E. coli*, 17 % a *S. aureus*, 3 % a *Salmonella* y 3% a *Vibrio cholerae* (Mukhopadhyay et al., 2002).

Se ha demostrado que algunos microorganismos patógenos al hombre tienen la capacidad de desarrollar en papaya cortada. *E. coli* O157: H7 y *Salmonella* crecen rápidamente en papayas recién cortadas almacenadas a 25 °C, y sobreviven

durante la vida útil de las papayas cortadas mantenidas en refrigeración (4 °C) (Strawn *et al.*, 2010). *E. coli* O157: H7 puede crecer en jugo de papaya a 4 y 20 °C (Yigeremu *et al.*, 2001; Mutaku *et al.*, 2005) . Penteado *et al.* (2004) encontraron que la pulpa papaya es buen sustrato para la supervivencia y crecimiento de *S. Enteritidis* a 10, 20 y 30 °C, y que la baja temperatura (10 °C) retrasa pero no inhibe el crecimiento de esta bacteria. Varios estudios demostraron que *L. monocytogenes* puede sobrevivir y crecer en la papaya recién cortada (Penteado *et al.*, 2004a). Feng *et al.* (2015), demostraron que *S. aureus* era capaz de crecer en mango, papaya y piña cortados a 13 y 25 °C, y pudo sobrevivir durante la vida útil a 5 °C.

Estas investigaciones describen el potencial de supervivencia y crecimiento de microorganismo patógenos en papayas, destacando la importancia de prevenir su contaminación.

### 2.2.3 Brotes asociados al consumo de papaya

La papaya se consume principalmente como fruta fresca. Ahora bien, los frutos recién cortados listos para consumo pueden ser fácilmente expuestos a condiciones medioambientales antihigiénicas durante el procesamiento, como es en el pelado y el corte, lo que conduce a la contaminación directa o cruzada con bacterias patógenas del fruto mismo o del equipo. En todo el mundo, la proporción de brotes de alimentos atribuidos a las frutas y hortalizas ha aumentado en los últimos 20 años (Sharma *et al.*, 2011). En 1996, se produjo un gran brote de *Salmonella* en Singapur y por lo menos 116 trabajadores enfermaron. La cepa del brote de *Salmonella* se aisló de varias frutas frescas cortadas, incluida la papaya (Strawn *et al.*, 2010). En 2003 en EE.UU. ocurrió un brote de salmonelosis en el que estuvo implicada *S. Saintpaul*. En 2006 y 2007, 27 personas en los estados australianos de Queensland y Australia Occidental se enfermaron al comer papayas contaminadas con *S. Litchfield* (Gibbs *et al.*, 2009). Asimismo, en 2011 se reportaron un total de 106 casos de salmonelosis causados por *S. Agona* en los EE. UU. que

estuvieron relacionados con papayas importadas de México (CDC, 2011). Recientemente, en julio de 2017 se presentó un brote multiestatal en EE.UU. de infecciones causadas por nueve serovares de *Salmonella*: Urbana, Newport, Infantis, Anatum, Thompson, Kiambu, Agona, Gaminara, y Senftenberg, en el cual se reportó un total de 173 personas infectadas; la fuente de contaminación fueron papayas de la variedad 'Maradol' nuevamente provenientes de México (CDC, 2017).

### 2.3 Métodos de control de microorganismos patógenos en frutas

El lavado se utiliza como método primario para reducir la materia orgánica de los productos frescos. Sin embargo, el lavado y la desinfección pueden reducir los niveles de patógenos, pero no garantizan su total eliminación. El grado de reducción está influenciado por el antimicrobiano utilizado, las condiciones de aplicación y el tipo de producto al que se aplique, entre otros (Foong-Cunningham *et al.*, 2012). En general, los métodos tradicionales de descontaminación de las frutas y hortalizas frescas se pueden clasificar en: a) tratamientos físicos y b) tratamientos químicos.

#### 2.3.1 Tratamientos físicos

Se refieren a los métodos que hacen uso de calor, presión, irradiación, entre otros, para reducir los microorganismos patógenos en los alimentos (Krasaekoopt y Bhandari, 2010).

##### a) Luz ultravioleta (UV).

La luz UV es un tipo de radiación no ionizante con una longitud de onda que oscila entre 100 nm y 400 nm, que normalmente se clasifica en tres tipos: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) y UV-C (100-280 nm) (González-Aguilar *et al.*, 2010). El mecanismo generalmente reconocido de inactivación microbiana se

atribuye principalmente al daño directo producido en el ADN de los microorganismos. La luz UV induce la formación de fotoproductos de ADN que inhiben la transcripción y la replicación y conducen finalmente a mutagénesis y a muerte celular. Su pobre poder de penetración limita su aplicación en el campo de los alimentos (Liang *et al.*, 2017).

Esta tecnología se ha aplicado en el melón, el mango, la manzana, la sandía y la papaya recién cortados para prolongar su vida útil (Corbo *et al.*, 2010). También se ha reportado su efecto descontaminante sobre microorganismos patógenos. Yaun *et al.* (2004) aplicaron luz UV-C a las superficies de manzanas 'Red Delicious' inoculadas con *E. coli* O157:H7, y lograron reducir aproximadamente 3.3 Log UFC/g. Se ha reportado su eficacia contra *S. Poona* y *L. monocytogenes* inoculadas en papaya recién cortada (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2013).

#### b) Radiación gamma.

La irradiación de alimentos convencional y de uso más frecuente se refiere principalmente a la exposición a radioisótopos de cobalto-60 (o muy poco frecuente de cesio-137) (Farkas *et al.*, 2011). Durante la exposición del alimento al campo de irradiación, se debe medir la cantidad de energía absorbida (en Gray o kiloGray (kGy) para establecer el procedimiento correcto (Pinela *et al.*, 2017). La irradiación causa una modificación mínima en el sabor, el color, los nutrientes y otros atributos de calidad de los alimentos.

En mangos la aplicación de dosis bajas de radiaciones gamma (0.25, 0.35 y 0.45 kGy) fue eficiente para la eliminación de un hongo (*Lasiodiplodia theobromae*) (Santos *et al.*, 2015). Además, la radiación gamma logró una reducción de 1 Log de bacterias mesófilas en frambuesas (Cabo Verde *et al.*, 2013).

#### c) Altas presiones hidrostáticas.

Las altas presiones hidrostáticas constituyen una tecnología en la cual se somete a alimentos líquidos o sólidos, con o sin embalaje, a presiones entre 100 y 800 MPa (Castro y Saraiva, 2014). Ésta destruye los patógenos transmitidos por los alimentos e inactiva enzimas, no conduce a una modificación sustancial de las propiedades nutricionales, funcionales y organolépticas de los alimentos y aumenta la vida útil de frutas y verduras frescas mínimamente procesadas (Pinela *et al.*, 2017). Se ha reportado su eficacia en la inactivación de *S. Poona*, *S. Newport*, *S. Stanley* y *L. monocytogenes* en puré de melón (Mukhopadhyay *et al.*, 2016).

d) Campos eléctricos pulsados.

La tecnología de campos eléctricos pulsados (CEP) implica la aplicación de pulsos de alto voltaje (típicamente de 20 a 80 kV/cm) a alimentos colocados entre dos electrodos. La intensidad del campo se consigue almacenando energía en una batería de condensadores a partir de una fuente de alimentación, la cual es descargada en forma de impulsos de alta tensión (Ramaswamy *et al.*, 2005). Los CEP mantienen la calidad de los alimentos reduciendo los cambios perjudiciales en las propiedades sensoriales y físicas. Se ha demostrado que su aplicación induce un aumento en la permeabilidad en la membrana citoplasmática de los microorganismos que conlleva a su muerte (Saldaña *et al.*, 2011).

Se ha logrado la descontaminación efectiva utilizando CEP de un batido de frutas tropicales a base de piña, plátano y leche de coco inoculado con *E. coli* K12 (Walkling-Ribeiro *et al.*, 2008). También se ha reportado la inactivación de *S. aureus* y *L. monocytogenes* con este procedimiento (Saldaña *et al.*, 2011).

Kim *et al.* (2017) demostraron el efecto antibacteriano de diodos emisores de luz de  $405 \pm 5$  nm (LED) contra varios serovares de *Salmonella* (Typhimurium, Saintpaul, Newport y Agona) en papaya recién cortada.

Existen otras tecnologías que están en desarrollo como el calentamiento óhmico. Estas nuevas herramientas aplicadas a la industria de productos frescos

están enfocadas en prolongar la vida útil y asegurar la inocuidad de los alimentos sin comprometer las cualidades sensoriales y nutricionales.

#### 2.3.1.1 *Calentamiento óhmico para la inactivación bacteriana*

El calentamiento óhmico es una técnica innovadora en la cual el alimento se comporta como una resistencia eléctrica cuando se coloca entre dos electrodos y una corriente eléctrica alterna se pasa a través de él. Debido a la resistencia eléctrica, se genera calor a través de los alimentos lo que causa un incremento de temperatura. La generación de calor tiene lugar de forma volumétrica (Marcotte *et al.*, 2010).

El calentamiento óhmico no sólo puede evitar las limitaciones de la calefacción convencional, sino también puede mejorar la inactivación de los agentes patógenos en los alimentos debido a los efectos combinados de calor y electricidad (Park *et al.*, 2013). Ya se ha demostrado que el calentamiento óhmico es eficaz para inactivar *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 en alimentos líquidos, como jugo de naranja, jugo de tomate y jugo de manzana (Lee *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013). Esta tecnología proporciona un calentamiento rápido y uniforme con cambios estructurales, nutricionales y organolépticos mínimos en el alimento (Lee *et al.*, 2012).

El calentamiento óhmico se ha probado también en pulpa de papaya utilizando dos electrodos de acero inoxidable (SS 316) separados 3 cm, a tres gradientes de voltaje (6.66, 13.33 y 20 V/cm) y tiempos (1, 2 y 3 min). Siendo el gradiente de voltaje de 13.33 V/cm por 2 min el más efectivo para la pasteurización de la pulpa de papaya. Se comparó la pulpa tratada con pulpa no tratada. La pulpa que recibió tratamiento, retenía 86.4 % de licopeno, 87.1 % de  $\beta$ -caroteno y 85.2 % de ácido ascórbico además de que no hubo ningún daño estructural (Gomathy *et al.*, 2015).

### 2.3.2 Tratamientos químicos.

Se han utilizado diversos compuestos químicos para reducir las poblaciones bacterianas en las frutas frescas ya sea antes del procesamiento o durante las operaciones de pre y poscosecha (Corbo *et al.*, 2010).

#### a) Cloro.

El cloro es un tratamiento común de descontaminación para productos frescos a niveles de 50 a 200 ppm y a un pH de 6.0 a 7.5, con un tiempo de contacto de 1 a 2 minutos. Diversos estudios han descrito la eficacia del cloro, sin embargo, en presencia de materia orgánica en el agua, éste puede inactivarse y crear subproductos nocivos para el medio ambiente y la salud (Foong-Cunningham *et al.*, 2012). Vadlamudi *et al.* (2012), reportaron la eficacia del cloro en la inactivación de *S. Poona* en melones. El tratamiento con cloro ha logrado también inactivar *E. coli* O157:H7 en superficie de naranja (Yoo *et al.*, 2015).

#### b) Ácido peracético.

Se ha aplicado el ácido peroxiacético para lograr la desinfección de lechuga cortada e inoculada con *L. monocytogenes* (Beuchat *et al.*, 2004). También se ha usado para eliminar la microbiota nativa de verduras recién cortadas como zanahorias ralladas, col blanca y puerro (Vandekinderen *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2014). Asimismo, se ha evaluado su eficacia en la inactivación de *E. coli* O157:H7 sobre lechuga fresca y zanahorias (Petri *et al.*, 2015).

#### c) Agua electrolizada.

El agua electrolizada ácida (AEA) se produce al pasar una solución de sal diluida (el cloruro de sodio y el cloruro de potasio se utilizan con mayor frecuencia) a través de una célula electrolítica, dentro de la cual el ánodo y el cátodo están separados por una membrana. En el lado anódico de la célula electrolítica se

obtiene el AEA y varios compuestos de cloro e iones tales como HOCl, OCl<sup>-</sup> y Cl<sub>2</sub> gas (Gil *et al.*, 2015).

El AEA ofrece la capacidad potencial de inactivar microorganismos con mínimos efectos negativos sobre la salud humana y la calidad organoléptica y nutricional de los alimentos. El AEA se ha utilizado como una alternativa a la descontaminación con cloro con el propósito de garantizar la inocuidad y prolongar la vida útil de las frutas y hortalizas frescas (Park *et al.*, 2009).

Rahman *et al.* (2010) reportaron una reducción mayor de microorganismos indicadores (mesófilos aerobios, mohos y levaduras) y patógenos (*E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*) en espinacas frescas cortadas cuando aplicaron agua electrolizada ligeramente ácida en comparación con las tratadas con agua desionizada, ozono acuoso ó hipoclorito de sodio (NaOCl).

Una variante es el agua electrolizada neutra (AEN). El AEN se genera como AEA, pero parte del producto formado en el ánodo es entonces redirigido a la cámara del cátodo, dando lugar a una solución neutra (pH 8.0 ± 0.5) (Abadias *et al.*, 2008). Los resultados de los estudios actuales han mostrado una perspectiva prometedora del uso de AEN en industrias de frutos recién cortados. El éxito bactericida del AEN se debe principalmente a su alto potencial de oxidoreducción junto con la presencia de cloro libre disponible y una acción de tipo surfactante causada por la presencia de grupos OH libres (Monnin *et al.*, 2015). El brócoli recién cortado tratado con AEN mostró mejor retención de compuestos bioactivos (capacidad antioxidante, fenoles y enzimas antioxidantes) que el tratado con NaClO (Graça *et al.*, 2011).

### 2.3.3 Factores que afectan la eficacia de los tratamientos de descontaminación

Entre los factores que afectan la eficacia de los tratamientos de descontaminación se encuentran la dosis aplicada, el tiempo de exposición, la

humedad relativa (HR) y la temperatura (Netramai *et al.*, 2016). Por otro lado, la adhesión de las células bacterianas a sitios inaccesibles, como estomas y cavidades de las hojas y frutos, provoca ineficacia de los tratamientos de desinfección ya que pueden no tener acceso a los patógenos y además éstos pueden presentar resistencia debido al estrés oxidativo y capacidad mejorada de reparación del ADN, lo que representa otro reto para la industria de corte fresco (Ölmez, 2016).

Otros factores importantes que influyen en la capacidad de inactivación de los desinfectantes incluyen:

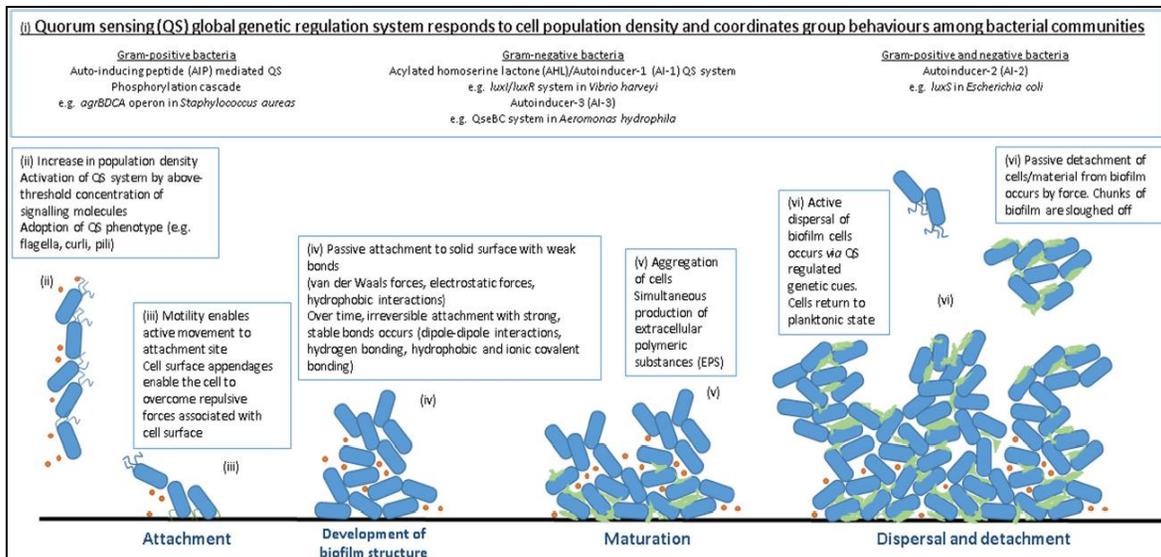
1. La materia orgánica. El aumento de esta puede reducir la eficacia de ciertos tratamientos antimicrobianos. Por ejemplo, en el caso de la aplicación de cloro para mantener los niveles de cloro activo, debe agregarse continuamente al agua para reemplazar el cloro perdido por reacciones con la materia orgánica, iones y microorganismos (Foong-Cunningham *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2011).
2. El tiempo de contacto del tratamiento antimicrobiano. Tiempos de aplicación más largos suelen dar como resultado tasas de muerte más altas (Zhou *et al.*, 2015).
3. Naturaleza de la superficie. Estudios han demostrado que la topografía superficial y la hidrofobicidad de los frutos afectan significativamente la eficacia de los desinfectantes sobre la remoción e inactivación de patógenos (Wang *et al.*, 2009).
4. El tipo de microorganismo. La presencia de biopelículas y de agregados bacterianos en la superficie de los frutos y de las hojas puede permitirles persistir durante más tiempo o protegerse de los desinfectantes (Behnke *et al.*, 2012; Netramai *et al.*, 2016).

#### 2.4 Biopelículas bacterianas

Las biopelículas son comunidades complejas de microorganismos en las que las células se encuentran unidas a una superficie y entre ellas, y a su vez están incrustadas en una matriz autoproducida de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Yaron *et al.*, 2014). Éstas pueden estar formados por una sola o múltiples especies bacterianas, como una sola capa o estructuras tridimensionales (Amrutha *et al.*, 2017).

#### 2.4.1 Formación de biopelículas bacterianas

La formación de biopelículas se produce en cinco etapas: el desarrollo de una película acondicionadora, la adhesión de células bacterianas, la producción de polímeros extracelulares por las células adheridas, la maduración y dispersión de la biopelícula (Figura 2.2). Las bacterias formadoras de biopelículas poseen apéndices para anclarse y moverse a través de un líquido. Los flagelos les sirven para fijarse a una superficie apropiada y también permiten la motilidad del microorganismo (Van Houdt *et al.*, 2010). Se cree que la etapa de adhesión celular bacteriana es reversible debido a interacciones débiles entre la célula bacteriana y la superficie sólida. En esta etapa, las bacterias se pueden eliminar fácilmente lavando suavemente (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).



**Figura 2.2.** Etapas de la formación de biopelículas bacterianas.

Fuente: (Coughlan *et al.*, 2016)

Una vez unidas, las bacterias proceden a colonizar la superficie a través de la formación de agregados celulares conocidos como microcolonias. Bajo condiciones ambientales permisivas, las microcolonias forman estructuras dinámicas bidimensionales a medida que aumenta el número de células. Este armazón madura adicionalmente en una arquitectura definida con células dispuestas en estructuras simples o elaboradas que son adecuadas para prosperar en su entorno particular (Coughlan *et al.*, 2016).

Posteriormente, la adhesión de las células bacterianas se vuelve irreversible debido a la adherencia intracelular por apéndices y la producción de EPS (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). La formación de la biopelícula madura incluye monocapas planas, estructuras tridimensionales “tipo hongo” o “tulipán” y canales de agua intermedios para el intercambio de nutrientes y residuos (Jahid *et al.*, 2012).

La etapa final en el ciclo de vida de la biopelícula implica el retorno de un número de células adheridas al entorno circundante. Las células desprendidas vuelven a su estado planctónico y dejan la biopelícula en respuesta a las señales celulares (animándolas a buscar un sitio adicional cuando las condiciones sean favorables). El desprendimiento se produce como resultado de cambios ambientales, como la disponibilidad de nutrientes, el movimiento del líquido circundante, erosión de partes de la biopelícula por uso de químicos o fuerza, entre otros (Kaplan, 2010).

Una amplia gama de tamaños de cúmulos se separa de la biopelícula, de células individuales a grandes grupos que contienen más de 1000 células, las proporciones son dependientes de las especies que la componen y las condiciones de crecimiento de la biopelícula (Behnke *et al.*, 2011). Los grupos aislados pueden comportarse de forma similar a los de la biopelícula cuando se exponen a desinfectantes, especialmente poco después del desprendimiento (Rollet *et al.*, 2009).

#### 2.4.2 Composición de las biopelículas

Las EPS pueden estar compuestas de polisacáridos, proteínas, lípidos, ADN extracelular, células bacterianas muertas y otras sustancias poliméricas hidratadas con 85 – 95 % de agua dependiendo del tipo de bacteria en la biopelícula. Las funciones que tienen los EPS en la biopelícula son: ofrecer estabilidad estructural y protección (Hall-Stoodley *et al.*, 2004), mantener las células juntas y también pueden agotar reactivamente los productos químicos descontaminantes y retardar su difusión a las células (contribuyendo a la resistencia) (Behnke *et al.*, 2012), concentrar los nutrientes del medio ambiente circundante dentro de la biopelícula, y evitan la desecación de la misma (Coughlan *et al.*, 2016).

La matriz de EPS puede cambiar con respecto a las propiedades de difusión o la viscosidad debido a la presencia de varias especies en la biopelícula causada por un cambio en los patrones de expresión génica. Otros mecanismos que se han observado en las biopelículas multiespecies son la transferencia conjugativa de los factores de tolerancia y la protección entre especie a través de la estrecha asociación espacial (Ghigo, 2001).

La expresión de las células que forman la biopelícula está bajo el control de un sistema de regulación genética global que responde a fluctuaciones en la densidad de población, conocido como detección del *quorum* (Fuqua *et al.*, 1994). Se ha descubierto que la detección del *quorum* es un factor clave en la formación de la biopelícula por patógenos transmitidos por los alimentos. Smith *et al.* (2004) señalan que en este sistema las células bacterianas interactúan entre ellas de tal manera que se benefician entre toda la población de la biopelícula. Además de que la señalización célula a célula incrementa la transcripción de genes responsables de la supervivencia al estrés oxidativo, alterando la composición y la viscosidad de las EPS, o influyendo en la arquitectura de la biopelícula y la distribución espacial de diferentes cepas (Burmølle *et al.*, 2006).

#### 2.4.3 Resistencia adquirida en células inmersas en biopelículas

Las bacterias presentes en una biopelícula muestran hasta 1000 veces mayor tolerancia a los antibióticos y biocidas que sus homólogos planctónicos (Ceri *et al.*, 1999). Estudios han demostrado que las bacterias en las biopelículas son capaces de adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes de una manera rápida tanto a nivel fenotípico y genotípico (Amrutha *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que las células de biopelícula expresan perfiles proteicos diferentes que las células planctónicas y también muestran diferentes tasas de crecimiento como resultado de la disponibilidad limitada de nutrientes y oxígeno que

pueden hacerlos más tolerantes (Walters *et al.*, 2003; Rani *et al.*, 2007). Las EPS pueden proporcionar una barrera física contra la difusión de agentes antimicrobianos y compuestos de la respuesta de defensa y ofrecen protección contra factores de estrés ambiental tales como radiación UV, tensiones osmóticas y desecación (Yaron *et al.*, 2014).

Se ha demostrado el crecimiento de *L. monocytogenes* en una biopelícula, con desarrollo de resistencia al hipoclorito de sodio (Norwood *et al.*, 2000). Además, se estima que el 99.9 % de las bacterias en la naturaleza están unidas a una superficie en forma de biopelícula (Murphy *et al.*, 2002)

#### 2.4.4 Formación de biopelículas en frutas

Durante el crecimiento y maduración de las frutas y hortalizas, así como durante su cosecha, transporte, procesamiento y almacenamiento, surgen oportunidades para el desarrollo de biopelículas en su superficie. La capacidad de formación de biopelículas de patógenos bacterianos está altamente correlacionada con la fuerza de adherencia y la persistencia en la superficie del producto fresco (Beuchat, 2002). La capacidad de algunos patógenos como *Salmonella* para formar biopelículas, representa un peligro ya que el desprendimiento de células que se encuentren inmersas en estas estructuras puede ser de manera intermitente y llegar a contaminar otros productos frescos y superficies de equipos en la industria (Murphy *et al.*, 2002).

### 3. JUSTIFICACIÓN

México es el quinto productor de papaya en el mundo, y su venta es una fuente importante de divisas. Desafortunadamente las papayas producidas en nuestro país y exportadas a EE. UU. han sido implicadas en brotes de salmonelosis. Esta situación coloca a las papayas como un fruto de riesgo a los consumidores.

Escasa es la información que existe con relación a la eficacia del uso de desinfectantes comúnmente usados en la industria de alimentos para inactivar a *Salmonella* en la papaya. Sin embargo, evaluaciones realizadas en otros frutos revelan que la desinfección química no logra la completa inactivación del patógeno. Uno de los factores que puede influir en la eficacia de los desinfectantes es la formación de biopelículas bacterianas sobre los frutos, ya que pueden servir como sitios protectores para los microorganismos patógenos, y generar un microambiente en el cual las células inmersas en él pueden adquirir resistencia ante los agentes químicos.

Ante esta situación, es necesario investigar la aplicación de nuevos métodos de descontaminación que garanticen la inocuidad y que no afecten la calidad del fruto entero o mínimamente procesado. El uso de desinfectantes como el agua electrolizada, el ácido peracético, y la aplicación de nuevas tecnologías como el calentamiento óhmico, pueden ser una buena alternativa para reducir el riesgo de enfermedad asociado al consumo de papaya.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Evaluar la efectividad de tratamientos de descontaminación químicos y calentamiento óhmico sobre células libres y en biopelículas de *S. enterica* inoculadas en papaya.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la capacidad de *S. enterica* para formar biopelículas sobre la superficie de papayas.
2. Determinar la eficacia de tratamientos químicos para inactivar células libres y en biopelícula de *S. enterica* inoculadas en papaya.
3. Determinar la eficacia del calentamiento óhmico para inactivar células libres y en biopelícula de *S. enterica* inoculadas en papaya cuando se aplica individualmente y en combinación con desinfectantes.
4. Evaluar el efecto del tratamiento con calentamiento óhmico en la calidad de la papaya durante su almacenamiento.

## **5. METODOLOGÍA**

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Equipos

Agitador mecánico, Vortex-Genie

Autoclave eléctrica de mesa, Market Forge

Balanza analítica digital, Precisa

Campana de flujo laminar, Veco

Centrifuga de mesa, Heraeus

Cuenta colonias, Reichert

Homogenizador de alimentos, Stomacher BagMixer

Incubadoras con refrigeración, Presicion ThermoScientific

Medidor de actividad de agua, AquaLab

Microscopio electrónico de barrido, EVO-50 Carl Zeiss

Potenciómetro, Jenway

Refrigerador, Velp Scientifica

Termo baño, Riossa

Texturómetro CT3 Texture Analyzer, Brookfield

Ultracongelador, REVCO, Thermo Scientific

Ultracentrífuga, Dynamica

#### 5.1.2 Medios de cultivo

Agar xilosa lisina desoxicolato de sodio (XLD), BD Bioxon

Agar lisina descarboxilasa, Difco

Agar soya tripticaseína (AST), Dibico

Agar sulfito bismuto (SB), BD Bioxon

Agar triple hierro azúcar (TSI), Difco

Caldo neutralizante (CN), Difco

Caldo tetrionato, BD Bioxon

Caldo Rappaport Vassiliadis, BD Bioxon

Caldo soya tripticaseína (CST), BD Bioxon, Dibico

Caldo urea, BD Bioxon

Diluyente de peptona 0.1% (DP), BD Bioxon, Dibico

Medio rappaport – vassiliadis, Difco

Medio tetrionato, Difco

Peptona de caseína, BD Bioxon

### 5.1.3 Soluciones

Agua activada, Desy

Ácido peracético, Saniper 20

Solución salina isotónica (NaCl 0.85%)

Rifampicina (200 ppm)

#### 5.1.4 Reactivos

Ácido acético glacial, Meyer

Ácido sulfúrico, Jalmek

Alcohol etílico, Golden Bell

Alcohol metílico, Golden Bell

Almidón, J.T. Baker

Antisuero polivalente (Poli A – I & Vi), Difco

Cacodilato de sodio 0.2 M

Cloro, Zeux

Cristal violeta, Hycel

Glutaraldehído al 3%

Permanganato de potasio, J.T. Baker

Sulfato de potasio, Golden Bell

Tetróxido de osmio al 1%

Yoduro de potasio, Golden Bell

#### 5.2 Material biológico

##### 5.2.1 Papayas

Las papayas cultivar 'Maradol' se adquirieron de mercados locales de la ciudad de Querétaro, Qro.

### 5.2.2 Cepas bacterianas

Se empleó una mezcla de cinco cepas de *S. enterica* (*S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 23595, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Thompson* ATCC 8391, *S. Montevideo* ATCC 8387) del cepario del Laboratorio para la Evaluación y Control de Riesgos Microbianos en Alimentos (LECRIMA) de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se indujo resistencia a rifampicina a las cepas utilizadas de acuerdo al método señalado por Kaspar y Tamplin (1993).

## 5.3 Métodos

### 5.3.1 Formación de biopelículas de *Salmonella* sobre la superficie de papayas.

#### 5.3.1.1 Activación de las cepas y preparación del inóculo

Cien  $\mu\text{L}$  de cada uno de los cultivos puros de las 5 cepas de *Salmonella* se inocularon por separado en 3 mL de caldo CST a 37 °C por 24 h. Posteriormente se hizo una transferencia a CST utilizando 100  $\mu\text{L}$  del cultivo anterior e inoculando en 3 mL de CST; se incubó a 37 °C por 18 h. Después de la incubación, los cultivos se lavaron centrifugando 1 mL de cada cultivo a 15 000 rpm por 2 min, se removió el sobrenadante y las células se resuspendieron al mismo volumen de solución salina isotónica (SSI), las suspensiones se homogenizaron y se centrifugaron nuevamente; el procedimiento se repitió dos veces. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en SSI. Se tomó un mL de cada cepa y se mezclaron en un tubo estéril. A partir de esta suspensión bacteriana se prepararon diluciones decimales en agua destilada estéril (ADE) y se realizó el recuento mediante la técnica de extensión en superficie en placas de AST adicionado de rifampicina (200 ppm). Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h.

### 5.3.1.2 Preparación del epicarpio de papaya

Las papayas se seleccionaron considerando a aquellas con características similares de peso, tamaño, madurez, color y ausencia de daño mecánico. Se lavaron con agua corriente antes de la inoculación, y se secaron a 22 °C durante 50 min en campana de flujo laminar.

### 5.3.1.3 Formación de las biopelículas

Se inocularon por goteo 50 µL de la suspensión de *Salmonella* (~1 x 10<sup>5</sup> UFC/mL) sobre 3 cuadrados de 3 x 3 cm marcados en la superficie de la fruta. Las papayas inoculadas se colocaron en contenedores de plástico con cierre hermético a una humedad relativa (HR) de 97 % ajustada mediante la adición de una solución saturada de sales de sulfato de potasio (Speranza *et al.*, 2017), se incubaron a 25 °C y 30 °C durante 72 h. Se tomaron muestras periódicamente a las 0, 24, 48 y 72 h, para lo cual se cortó la porción inoculada de la papaya. En cada uno de ellos se realizó: 1) recuento de la población; 2) cuantificación de biopolímeros; 3) y microscopia electrónica de barrido (SEM).

#### 5.3.1.3.1 Cinética de crecimiento de *Salmonella enterica*

Las células se recuperaron cortando la superficie marcada del fruto con un bisturí estéril. La porción de papaya de 1 g se colocó en una bolsa de polietileno con 9 mL de DP y se homogenizó en un homogenizador mecánico por un min. A partir del homogenizado se prepararon diluciones decimales en DP y el recuento de la población de *Salmonella* se llevó a cabo en AST suplementado con rifampicina (200 ppm), empleando la técnica de extensión en superficie. Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h.

#### 5.3.1.3.2 Cuantificación de biopolímeros.

Una porción de papaya inoculada se frotó con un hisopo humedecido con SSI, se colocó en un tubo estéril con 2 mL de SSI y se agitó durante un min en agitador mecánico. Posteriormente se retiró el hisopo y al sobrenadante, se agregó metanol (2 mL), se dejó reposar por 15 min; se descartó el líquido y se añadieron 2 mL de cristal violeta al 0.1 % dejando en reposo 5 min. Se lavó dos veces con 2 mL de ADE y se agregaron 2 mL de ácido acético glacial al 99.7 %; finalmente se transfirieron alícuotas de 200  $\mu$ L a una placa de 96 pocillos de fondo plano transparente y se midió la densidad óptica a 595 nm por espectrofotometría (Coffey *et al.*, 2014).

#### 5.3.1.3.3 Microscopía electrónica de barrido.

Las muestras destinadas a la observación de la formación de las biopelículas se prepararon retirando secciones (1 x 1 cm x 1 mm) del epicarpio de la papaya y a continuación se siguió el procedimiento descrito por Hernández-Iturriaga *et al.* (2007) con algunas modificaciones. Las muestras se fijaron durante 4 h en glutaraldehído al 3%, seguido de un lavado durante toda la noche con solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.2 M, posteriormente se trató con tetróxido de osmio al 1% durante 2 h y finalmente se lavó dos veces con solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.2 M durante 15 min. Los tejidos fijados se deshidrataron en una serie graduada de dos pasos de concentraciones de etanol a 4 °C. Después de la deshidratación, los tejidos se secaron a punto crítico, se montaron, se revistieron con oro y se examinaron con un microscopio electrónico de barrido (EVO-50 Carl Zeiss).

Se seleccionaron los niveles de temperatura y tiempo que generaron la mayor población y cantidad de biopolímeros de *Salmonella* para continuar con los experimentos sucesivos.

### 5.3.2 Evaluación de la eficacia de tratamientos de desinfección para inactivar células de *Salmonella* libres y en biopelícula formadas en papaya

#### 5.3.2.1 *Inoculación de la papaya*

##### a) Células libres:

Papayas enteras y lavadas (descrito en el apartado 5.3.1.2) se inocularon por goteo con 50  $\mu$ L de la suspensión bacteriana de *Salmonella* (gotas de 10  $\mu$ L de cada una) a una concentración final de aproximadamente  $10^6$  UFC/mL. Los frutos inoculados se secaron durante 50 min en una campana de bioseguridad.

##### b) Células en biopelícula:

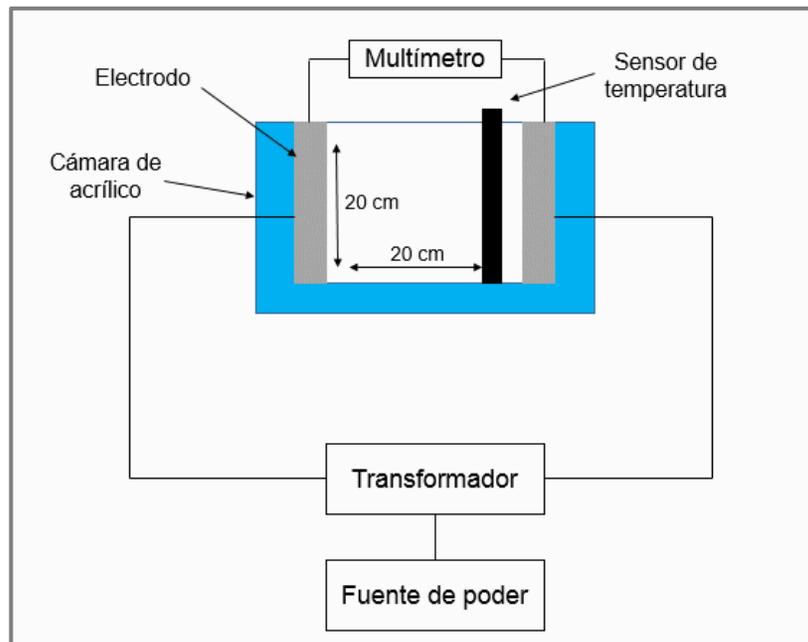
Se emplearon las papayas anteriormente inoculadas en donde se formaron previamente las biopelículas de *Salmonella*, almacenamiento durante 48 h a 25 °C (apartado 5.3.1.3.).

#### 5.3.2.2 *Aplicación de los tratamientos de desinfección química*

El día del experimento se prepararon las soluciones desinfectantes empleando agua destilada estéril: hipoclorito de sodio (200 ppm), ácido peracético (80 ppm), y agua electrolizada neutra (AEN) (50 ppm). Los desinfectantes se distribuyeron en bolsas estériles (100 mL) y su concentración se verificó mediante los métodos descritos en los Anexos A y B. Las papayas inoculadas con células libres y en las que se formaron las biopelículas, se sumergieron por separado en las soluciones desinfectantes y agua estéril (control) durante 5 min. Finalizado el tiempo de exposición las papayas se removieron de las soluciones germicidas y se neutralizaron con caldo neutralizante.

### 5.3.2.3 Aplicación de calentamiento óhmico

El experimento se llevó a cabo a escala de laboratorio utilizando un sistema de calentamiento óhmico especialmente diseñado para líquidos. El prototipo de calentamiento óhmico fue manufacturado en el Centro de Investigación de Ciencias Aplicadas y Tecnología Avanzada (CICATA) del Instituto Politécnico Nacional, *campus* Querétaro. El sistema consta de una celda de acrílico ( $20\text{ cm}^3$ ) la cual esta provista de dos electrodos de acero inoxidable ( $20 \times 20\text{ cm}$ ) por los que se hace pasar corriente eléctrica. La temperatura se midió con una sonda termopar tipo T de acero inoxidable aislada con vidrio y conectada a un medidor de temperatura (Digi-Sense) (Figura 5.1). El sistema de calentamiento óhmico posee un transformador variable que permite aplicar diferentes campos de fuerza eléctrica. Las papayas inoculadas con células libres y en las que se formó la biopelícula, previamente descrito en el apartado 5.3.2.1., se colocaron en la celda del equipo la cual contenía agua como líquido conductor. Se aplicó voltaje de  $15\text{ V/cm}$  a una temperatura de  $55\text{ }^\circ\text{C}$  y  $65\text{ }^\circ\text{C}$  durante  $60\text{ s}$  y  $90\text{ s}$  (Park *et al.*, 2013).



**Figura 5.1.** Diagrama del sistema de calentamiento óhmico

#### *5.3.2.4 Aplicación de calentamiento óhmico en combinación con soluciones desinfectantes*

Las papayas inoculadas y en las que se formó la biopelícula, previamente descrito en el apartado 5.3.2.1., se trataron con calentamiento óhmico en combinación con soluciones desinfectantes: hipoclorito de sodio 200 ppm, ácido peracético 80 ppm y AEN 50 ppm. Las papayas se colocaron en la celda del equipo de medidas 20 x 20 cm, la cual esta provista de dos electrodos de acero inoxidable por los que se hace pasar corriente eléctrica. El líquido conductor fueron las soluciones desinfectantes anteriormente mencionadas. Se aplicó voltaje de 15 V/cm. Los tratamientos se llevaron a cabo a 55 °C y 65 °C durante 60 s.

##### *5.3.2.4.1 Cuantificación de células sobrevivientes.*

Se cuantificaron las células de *Salmonella* en la papaya antes del secado, después del secado, y después de la aplicación de los tratamientos con los desinfectantes, con calentamiento óhmico y su combinación. Para ello, se cortó asépticamente el epicarpio de la papaya inoculada (1 g) y se colocó en una bolsa de polietileno, a la cual se le adicionaron 9 mL de caldo neutralizante (tratamientos con desinfectantes) y 9 mL de diluyente de peptona (antes del secado, después del secado y tratamientos con calentamiento óhmico). Las muestras se homogenizaron empleando un homogenizador mecánico a velocidad media durante 1 min. Posteriormente se realizaron las respectivas diluciones decimales en ADE, y se llevó a cabo el recuento en ASTR mediante la técnica de vaciado en placa. Las placas fueron incubadas a 35 °C por 24 h.

#### *5.3.2.5 Vida de anaquel del fruto después de tratamientos con calentamiento óhmico*

Las papayas tratadas (55 y 65 °C por 60 s) y un control (no tratado) se almacenaron durante nueve días a 17 °C. Se tomaron mediciones de la firmeza de la papaya en los días 1, 5 y 9. Además, se realizó el conteo de hongos después de los tratamientos con calentamiento óhmico.

a) Determinación de la firmeza en papaya entera

Las mediciones se tomaron de la parte central del fruto (ecuador) mediante ensayo de penetración utilizando una sonda de 3 mm de diámetro empleando un texturómetro. Se registró la fuerza de oposición del tejido a la penetración (7 mm de longitud) de la sonda insertada a una velocidad de 5.3 mm/s. Los resultados se expresaron en Newtons (N). El experimento se realizó tres veces y en cada repetición se analizaron tres muestras.

b) Cuantificación de hongos

Se cortó una porción de papaya (1 g) y se colocó en una bolsa de polietileno, a la cual se le adicionaron 9 mL de DP. Las muestras se homogenizaron empleando un homogenizador mecánico durante un min. Posteriormente se hicieron las respectivas diluciones decimales en DP y se colocó por duplicado en cajas Petri 1 mL de la dilución primaria. El procedimiento se repitió con las dos diluciones decimales siguientes. A las placas con las alícuotas se les vertió agar papa dextrosa acidificado (15 - 20 mL). Las placas fueron incubadas a 25 °C por cinco días.

### 5.3.3 Diseño experimental y análisis estadístico

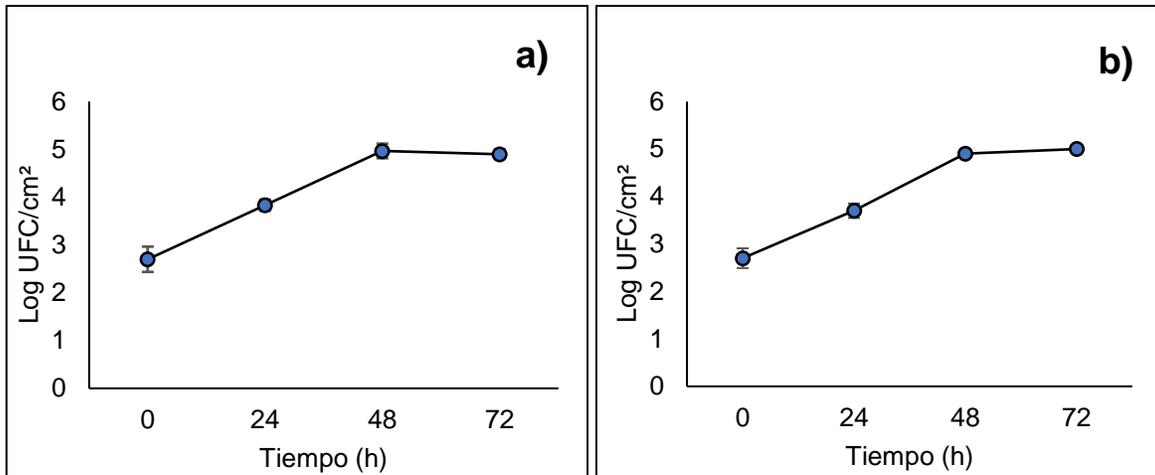
Se empleó un diseño experimental unifactorial completamente al azar, donde la unidad experimental representa una porción de 3 x 3 cm de la superficie de la papaya y las variables de respuesta fueron las células sobrevivientes (Log UFC/cm<sup>2</sup>) y la densidad óptica. Para los experimentos de vida de anaquel la unidad experimental representa una papaya y las variables respuesta fueron la firmeza (N)

y el conteo de hongos (UFC/g). Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los datos se analizaron por medio de un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey ( $p = 0.05$ ) usando el programa estadístico JMP versión 8.0.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Capacidad de *Salmonella* para formar biopelículas en el epicarpio de papaya

La población de *Salmonella* inoculada en el epicarpio de papaya almacenada a 25 °C después de 24, 48 y 72 h, se incrementó en 1.1, 2.1 y 2.1 Log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente (Figura 6.1a). Claramente se observa que las poblaciones de *Salmonella* después de 48 y 72 h de almacenamiento permanecieron prácticamente constantes. Con respecto al almacenamiento a 30 °C (Figura 6.1b) los resultados fueron similares a 25 °C y estadísticamente no significativos ( $p > 0.05$ ) (Tabla 2). Annous *et al.* (2004) reportaron incrementos semejantes de la población de *Salmonella* (2-3 Log UFC/cm<sup>2</sup>) en la cascara de melones inoculados después del almacenamiento durante 72 h. Los resultados obtenidos en nuestros ensayos demostraron que la superficie de la papaya es capaz de soportar el crecimiento del patógeno y que el incremento en el número de células podría contribuir a la formación de biopelículas (Figura 6.3). Debido a que el aumento de la población microbiana se asocia con la formación de biopelículas (Fu et al., 2016).



**Figura 6.1.** Comportamiento de *Salmonella* en papaya almacenada a 25 (a) y 30 °C (b). Los valores representan la media de nueve tratamientos  $\pm$  la desviación estándar.

**Tabla 2.** Crecimiento de *Salmonella* inoculada en papaya y almacenada a 25 y 30 °C durante 72 h.

Tiempo (h)	Log UFC/cm <sup>2</sup>	
	25 °C	30 °C
0	2.7 $\pm$ 0.26 <sup>c</sup>	2.7 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>
24	3.8 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	3.7 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>
48	4.9 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	4.9 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
72	4.9 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	5.0 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>

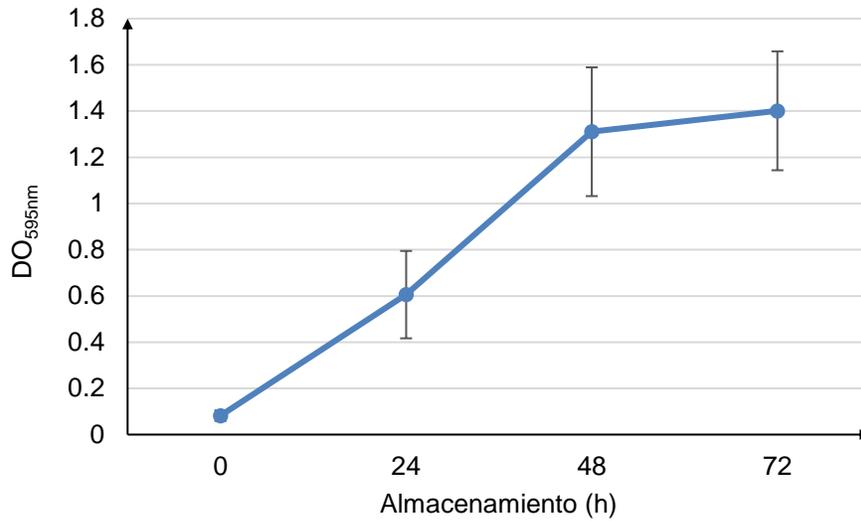
Entre columnas los valores representan la media de nueve tratamientos  $\pm$  la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

Para demostrar la presencia de biopelículas en la superficie del fruto se recuperaron los biopolímeros del epicarpio de la papaya y se sometieron al

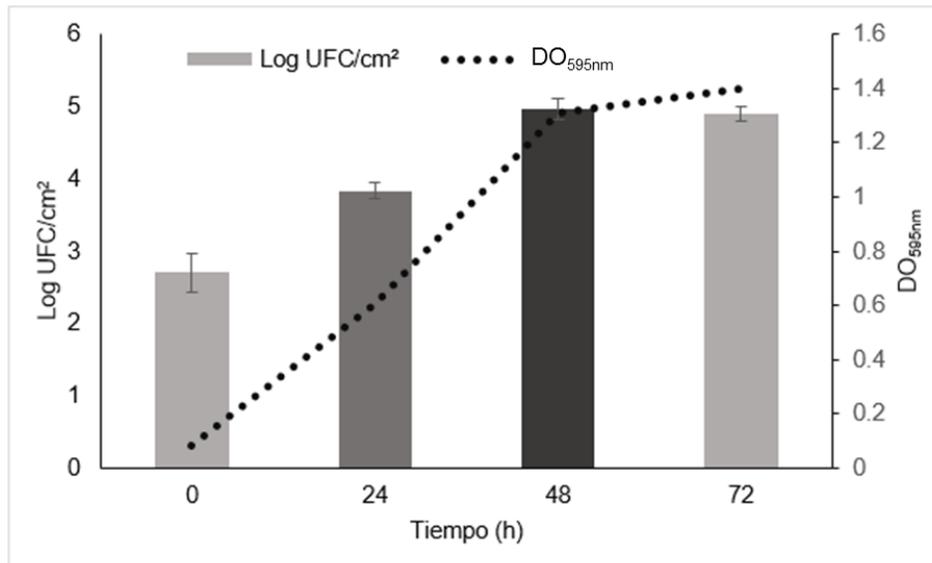
procedimiento de tinción con cristal violeta. Los valores medios de OD<sub>595nm</sub> aumentaron de 0.08 a 1.3 unidades después de 48 h de incubación lo que indica la síntesis de biopolímeros (Figura 6.2). El aumento en la producción de polímeros de las 48 a 72 h de incubación fue discreto dado que la biopelícula se encontraba en la etapa de maduración.

El valor de DO al tiempo 0 h resultó ser 0. Esto mostró que no había formación de biopelículas por *Salmonella* en el epicarpio de la fruta. Puesto que las células necesitan tiempo para adaptarse a las nuevas condiciones ambientales (Tang *et al.*, 2012). Las células bacterianas inoculadas requirieron tiempo para migrar sobre la superficie del producto y buscar sitios adecuados para adherirse. Y una vez que se unieron a la superficie del producto fresco, se rodearon de biopolímeros.

El método colorimétrico con cristal violeta utilizado es una técnica de uso frecuente con resultados reproducibles y que se realiza *in vitro* en una microplaca de poliestireno (Dimakopoulou-Papazoglou *et al.*, 2016; Lianou y Koutsoumanis, 2012). El ensayo de cristal violeta muestra la capacidad de formación de biopelículas de las cepas bacterianas (Xu *et al.*, 2016). Se ha reportado que las biopelículas están formadas de 50 a 90 % por componentes exopolisacáridos (Amrutha *et al.*, 2017).



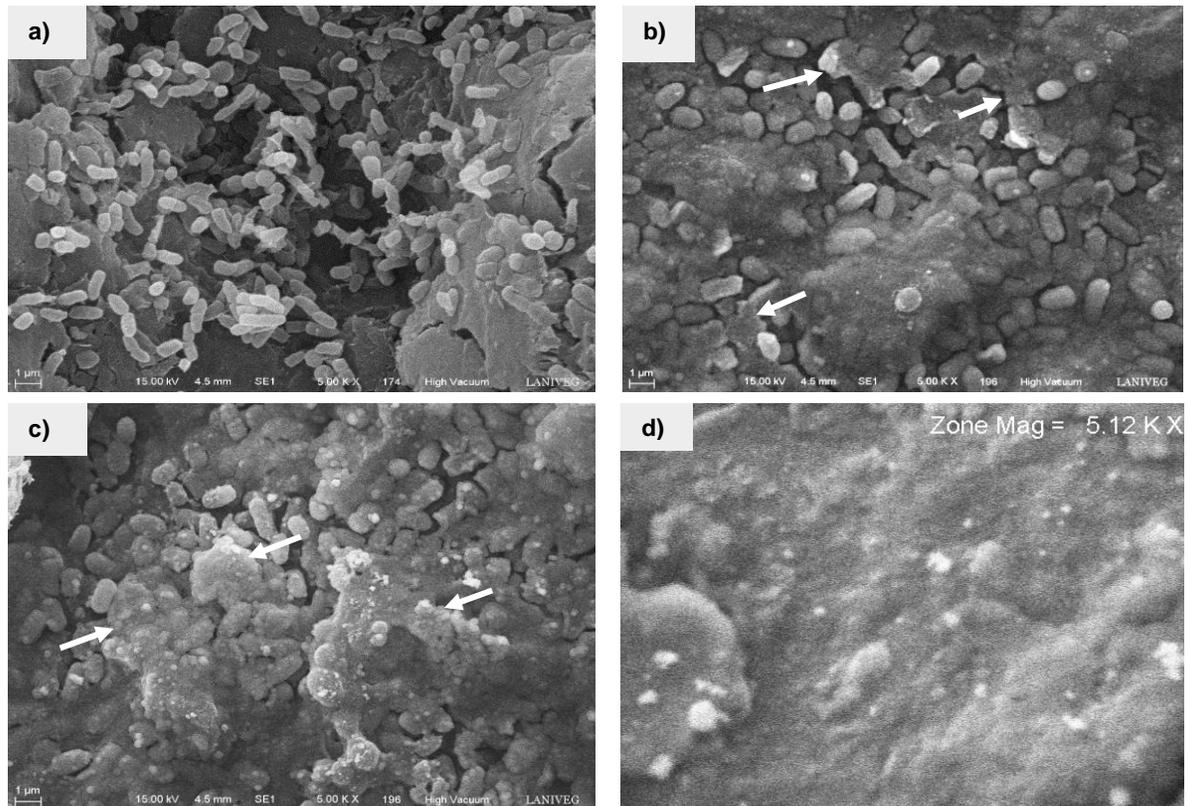
**Figura 6.2** Cuantificación de biopolímeros producidos por *Salmonella* en papaya almacenada a 25 °C. Los valores representan la media de nueve datos  $\pm$  la desviación estándar.



**Figura 6.3** Población de *Salmonella* y biopolímeros formados en papaya almacenada a 25 °C. Los valores representan la media de nueve tratamientos  $\pm$  la desviación estándar.

En la figura 6.4d se observa el epicarpio de la papaya que no fue inoculado, en el cuál podemos ver su estructura celulósica propia del tejido. Las micrografías realizadas del epicarpio inoculado mostraron la unión de las células mediante fimbrias y producción de polímeros desde las 24 h de incubación (Figura 6.4a) y después de 48 h las células se encontraban embebidas en material polimérico (Figura 6.4b). Los polímeros proporcionan una cubierta protectora para los microorganismos incluidos los patógenos y pueden ser un factor preponderante en la generación de resistencia contra desinfectantes acuosos (Fu *et al.*, 2016). Varios son los componentes estructurales de las biopelículas de *S. enterica*, incluyendo polímeros, fimbrias, proteínas de superficie, flagelos, celulosa y ácidos grasos. Entre estos componentes, los polímeros son los elementos fundamentales de la matriz extracelular de las biopelículas ya que dan como resultado la formación de una red

altamente hidrófoba de células firmemente compactas (Flemming y Wingender, 2010). Annous *et al.* (2005) observaron la formación de biopelículas de *S. enterica* en el epicarpio de melón, después de 24 h de almacenamiento a 10 y 20 °C las células se encontraban embebidas en material polimérico. Nuestra investigación coincide con estos hallazgos de que el patógeno es capaz de formar biofilms en los tejidos de los frutos.

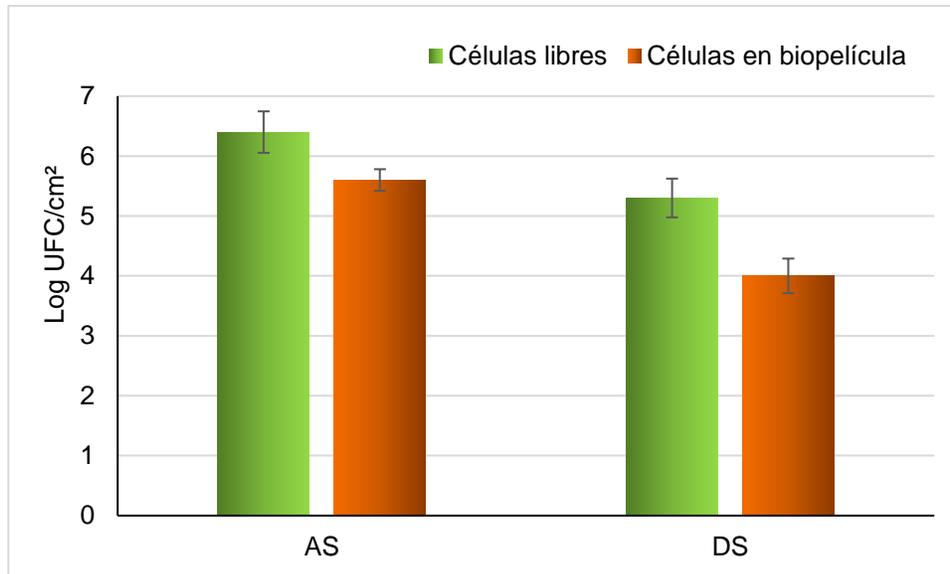


**Figura 6.4.** Micrografías electrónicas de barrido (x5000) de biopelículas de *Salmonella* formadas en la superficie de papaya almacenada durante 72 h. a) 24 h de incubación. b) 48 h de incubación. c) 72 h de incubación. d) Control no inoculado del epicarpio de papaya. Las flechas señalan los biopolímeros.

Una vez que se observó que desde las 48 h se formaban biopelículas en la papaya y que el aumento de la biomasa y la producción de biopolímeros es similar a las 72 h, se decidió continuar con el menor tiempo (48 h) para los experimentos sucesivos.

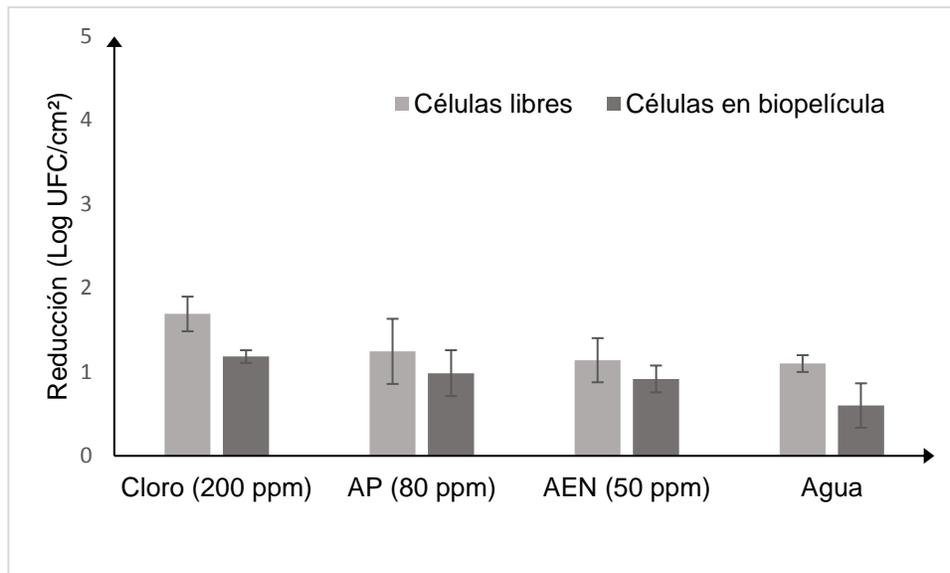
## 6.2 Efecto de tratamientos de desinfección sobre células de *Salmonella* (libres y en biopelícula) en papaya

En la primera etapa del trabajo se demostró que *Salmonella* es capaz de desarrollar y formar biopelículas en la superficie de papaya. Ahora bien, en este apartado se evaluó la eficacia de los desinfectantes cloro, AEN y ácido peracético. Para ello se utilizaron los frutos inoculados con células libres y en los que se formó biopelículas. Las poblaciones de *Salmonella* obtenidas de la papaya inoculada con células libres fueron 6.4 y 5.3 Log UFC/cm<sup>2</sup> antes del secado (AS) y después del secado durante 50 min en campana de flujo laminar (DS), respectivamente. Para los experimentos de células de *Salmonella* inmersas en biopelículas se obtuvieron valores de 5.6 y 4.0 Log UFC/cm<sup>2</sup> AS y DS, respectivamente (Figura 6.5). Lo anterior indica que se pierden entre 1.1 y 1.5 Log por efecto del secado. A pesar de esta pérdida, se obtuvo una población lo suficientemente grande (al menos 4 Log UFC/cm<sup>2</sup>) para poder evaluar el efecto de los desinfectantes.



**Figura 6.5.** Efecto del secado en la viabilidad de células de *Salmonella* inoculadas en papaya. AS: antes del secado; DS: después del secado. Los valores representan la media de nueve tratamientos  $\pm$  la desviación estándar.

La aplicación de los tratamientos descontaminantes con cloro (200 ppm), ácido peracético (80 ppm) y AEN (50 ppm) redujo la población de células libres de *Salmonella* en 1.7, 1.1 y 1.2 Log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente. La reducción en células en biopelícula fue de 1.2, 0.9 y 0.9 Log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente. La susceptibilidad de las bacterias dentro de las biopelículas se redujo en comparación con el efecto sobre las células libres (Figura 6.6).



**Figura 6.6.** Reducción de la población de *Salmonella* (células libres y en biopelícula) en papaya desinfectada. AP: ácido peracético; AEN: agua electrolizada neutra. Valores representan la media de nueve tratamientos  $\pm$  la desviación estándar.

Lapidot *et al.* (2006) reportaron que después de que se formaron biopelículas de *S. Typhimurium* en perejil las células fueron significativamente más resistentes a los tratamientos de desinfección con cloro a una concentración de 100 ppm (reducción  $<2$  Log UFC/g). También se ha estudiado el incremento en la resistencia de biopelículas de *S. Enteritidis* in vitro utilizando medio TSB diluido 20 veces cuando fueron tratadas con cloro a 50 ppm; los resultados mostraron que la temperatura ambiente y la baja disponibilidad de nutrientes mejoraron la resistencia de la biopelícula (Yang *et al.*, 2016).

Resultados similares se obtuvieron en nuestra investigación utilizando AEN, observándose reducciones de 1.1 y 0.9 Log UFC/cm<sup>2</sup> de células libres y en las biopelículas formadas en las papayas, respectivamente (Figura 6.6). No hubo diferencia estadística entre ambos tipos de células. A diferencia de otros estudios

en donde se ha demostrado la eficacia del AEN en la inactivación de células no procedentes de biopelículas (Afari *et al.*, 2015; Singh y Hung, 2018). Los autores concluyeron que era posible que los desinfectantes acuosos no penetraran eficazmente las capas de EPS de la biopelícula. El mecanismo de alta resistencia a los desinfectantes acuosos aún no ha sido completamente entendido (Pang *et al.*, 2017). Nuestros resultados concuerdan con lo descrito por Hawkins *et al.* (2016) quienes realizaron tratamientos con AEN (10 ppm) en carne de pollo y obtuvieron una reducción de 0.56 Log de *S. Typhimurium*.

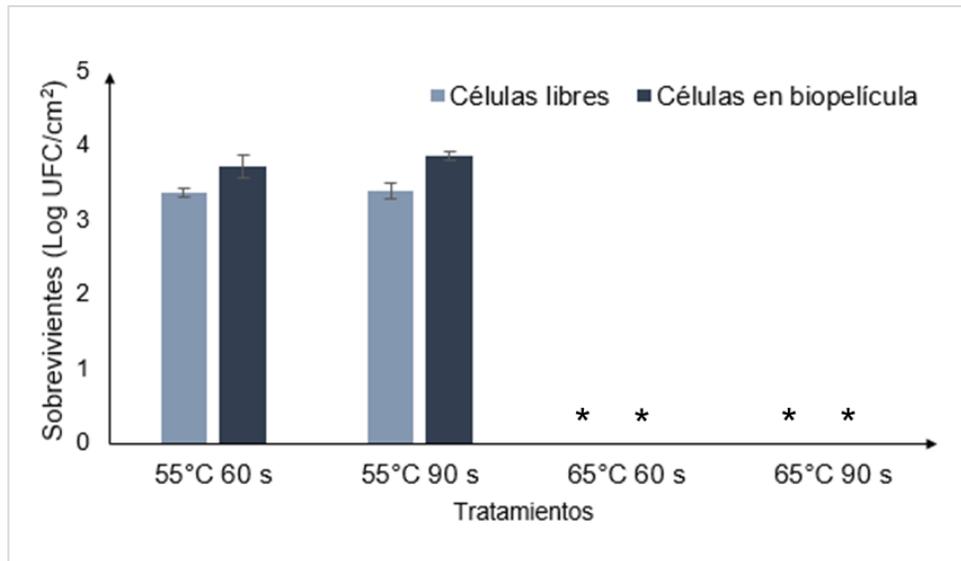
Independientemente del tipo de desinfectantes los porcentajes de reducción sobre las células libres o inmersas en biopelículas no fueron mayores a 33.3 y 23.9 %, respectivamente (Tabla 3). La *Food and Drug Administration* (FDA) de los EE.UU. establece que un desinfectante para considerarse efectivo debe de reducir la población de microorganismos representativos en al menos 5 Log o 99.999 % (FDA, 1998), lo cual es fundamental para garantizar la inocuidad de los productos frescos (Parish *et al.*, 2003). Evidentemente, tomando como referencia estos criterios, ninguno de los desinfectantes probados en este trabajo resultó efectivo para reducir el riesgo de la presencia de *Salmonella* en papaya a los consumidores.

### 6.3 Efecto del calentamiento óhmico sobre células libres y en biopelícula de *Salmonella* en papaya

Como alternativa a la desinfección química, se evaluó el efecto del calentamiento óhmico para inactivar a células de *Salmonella* libres, o bien inmersas en biopelículas formadas sobre la superficie de papaya bajo las condiciones previamente establecidas (48 h de almacenamiento a temperatura de 25 °C).

La aplicación del tratamiento óhmico a 55 °C durante 60 ó 90 s redujo 2.4 Log UFC/cm<sup>2</sup> en ambos tipos de células (libres y en biopelículas) (p > 0.5).

Por otro lado, cuando se utilizó una temperatura de 65 °C a los mismos tiempos de contacto (60 y 90 s) se logró la completa inactivación en ambos tipos de células (>5 Log UFC/cm<sup>2</sup>), lo que se traduce en un tratamiento eficaz para eliminar las bacterias patógenas en papaya (Figura 6.7).



**Figura 6.7.** Efecto de la aplicación de calentamiento óhmico sobre la población de *Salmonella* en papaya (células libres y en biopelícula). Los valores representan la media de nueve tratamientos  $\pm$  la desviación estándar. \*Valores no detectables, es decir, por debajo del límite de detección (<1 Log CFU/cm<sup>2</sup>).

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Park *et al.* (2017) quienes obtuvieron reducciones de más de 5 Log en jugo de manzana inoculado con *S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7 después de la aplicación de tratamiento con calentamiento óhmico aplicando 30 V/cm durante 60 s. Resultados similares se observaron en jugo de naranja y jugo de tomate aplicando 25 V/cm durante 30 s (Lee *et al.*, 2012).

El calentamiento óhmico consigue la inactivación bacteriana debido no solo al efecto térmico sino también al eléctrico, esto conduce a la descomposición de estructuras como la pared celular y la membrana citoplásmica causando rupturas y la filtración del contenido intracelular por consecuencia de la electroporación. Estas condiciones finalmente llevan a la muerte celular (Park y Kang, 2013).

Esta tecnología de procesamiento térmico es de reciente aplicación para inactivar patógenos transmitidos por los alimentos. Nuestro trabajo es el primero en explorar su eficacia en frutos enteros.

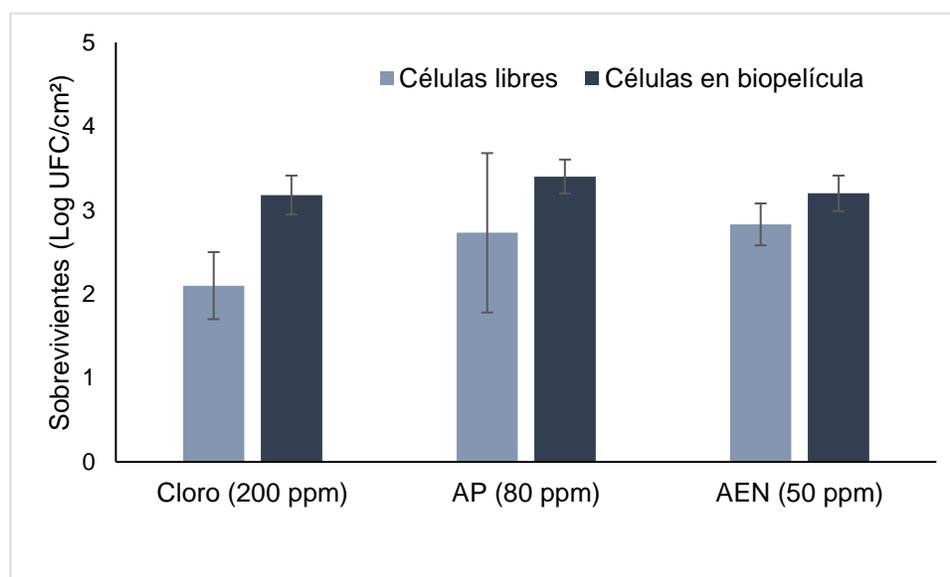
Los resultados obtenidos muestran que los niveles de reducción cuando se utiliza el calentamiento óhmico son buenos, empleando una temperatura de 55 °C se tienen reducciones de 44.9 y 40.5 % en células libres y en biopelícula, respectivamente (Tabla 3). Y todavía aún mejor, se lograron reducciones del 100 % de la población cuando se utilizó la temperatura de 65 °C incluso en el menor tiempo de contacto (60 s) y en ambos tipos de células.

#### 6.3.1 Efecto de la combinación de calentamiento óhmico y soluciones desinfectantes sobre *Salmonella* (células libres y en biopelícula) inoculada en papaya

Hoy en día los estudios de investigación se han centrado en técnicas de desinfección combinadas para obtener mejores eficiencias.

Ya que los resultados anteriores mostraron que los tratamientos a 55 °C no lograron la completa reducción de la población de *Salmonella* se pensó en incluir soluciones desinfectantes [cloro (200 ppm), ácido peracético (80 ppm) y AEN (50 ppm)] con la finalidad de explorar un efecto sinérgico que resultara positivo para la inactivación del patógeno.

Los resultados del tratamiento combinado de calentamiento óhmico (55 °C) con cloro (50 ppm) mostraron el efecto bactericida más alto contra *Salmonella* (Figura 6.8). Los tratamientos con AEN y ácido peracético mostraron resultados similares que cuando se utilizó únicamente el calentamiento óhmico (Tabla 3). Se esperaba lograr un mayor efecto de inactivación, sin embargo, no fue así probablemente porque estos desinfectantes requieren un mayor tiempo de exposición para ejercer su efecto bactericida. La reducción de las células en biopelícula fue menor que en las células libres debido a que las primeras son más resistentes a los desinfectantes químicos como se ha mencionado anteriormente.



**Figura 6.8** Efecto del calentamiento óhmico (55 °C) en combinación con desinfectantes sobre la población de *Salmonella* en papaya (células libres y en biopelícula). AP: ácido peracético; AEN: agua electrolizada neutra. Los valores representan la media de nueve valores  $\pm$  la desviación estándar.

Se ha constatado el efecto potencializador del tratamiento de calentamiento óhmico en combinación con carvacrol para la inactivación de *E. coli* O157: H7, *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* inoculadas en salsa de tomate. En los tratamientos individuales se inactivaron 0.6 y 2.1 Log UFC/g con carvacrol y

calentamiento óhmico, respectivamente. Con el tratamiento combinado los tres patógenos fueron inactivados por más de 5.0 Log UFC/g (Kim y Kang, 2017). En papaya cortada e inoculada con *Salmonella* se ha reportado el efecto sinérgico de tratamientos de luz UV-C y ácido málico; una reducción de 5.2 Log UFC/g fue alcanzada usando esta combinación (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2013). Por otro lado Huang *et al.* (2018) observaron una mayor reducción de *Salmonella* en moras azules cuando se utilizó el tratamiento combinado de luz UV y ácido peracético, que cuando se emplearon por separado.

Por su parte, los tratamientos con calentamiento óhmico a 65 °C en combinación desinfectantes lograron reducir el 100 % de la población de *Salmonella* (células libres y en biopelícula), resultados similares a los obtenidos con el tratamiento óhmico únicamente. Por lo que utilizando estas condiciones no es necesario utilizar desinfectantes. Lo que resulta beneficioso ya que representa un menor costo económico para la industria a gran escala. Además, desinfectantes como el cloro pueden formar subproductos tóxicos que pueden ocasionar posibles peligros para la salud (Yoo *et al.*, 2015; Feliziani *et al.*, 2016).

**Tabla 3.** Reducción de la población de *Salmonella* después de tratamientos con desinfectantes y calentamiento óhmico en papaya (células libres y en biopelícula).

Tipos de tratamientos	Condiciones	Células libres		Células en biopelícula	
		Reducción	% de reducción	Reducción	% de reducción
Desinfectantes	Cloro (200 ppm)	1.7 ± 0.18 <sup>d</sup>	33.3	1.2 ± 0.12 <sup>c</sup>	23.9
	AP (80 ppm)	1.1 ± 0.19 <sup>e</sup>	23.2	0.9 ± 0.39 <sup>c</sup>	19.2
	AEN (50 ppm)	1.2 ± 0.26 <sup>e</sup>	25.1	0.9 ± 0.18 <sup>c</sup>	18.1
CO	55°C 60 s	2.4 ± 0.05 <sup>c</sup>	41.9	2.3 ± 0.17 <sup>b</sup>	37.7
	55°C 90 s	2.4 ± 0.05 <sup>c</sup>	41.9	2.4 ± 0.19 <sup>b</sup>	40.5
	65°C 60 s	5.2 ± 0.46 <sup>a</sup>	100	4.8 ± 0.21 <sup>a</sup>	100
	65°C 90 s	5.8 ± 0.22 <sup>a</sup>	100	6.0 ± 0.05 <sup>a</sup>	100
*CO (55 °C) + desinfectantes	Cloro (200 ppm)	3.4 ± 0.40 <sup>b</sup>	61.7	2.6 ± 0.23 <sup>b</sup>	44.9
	AP (80 ppm)	2.8 ± 0.95 <sup>bc</sup>	50.2	2.3 ± 0.20 <sup>b</sup>	39.8
	AEN (50 ppm)	2.7 ± 0.25 <sup>bc</sup>	48.3	2.6 ± 0.21 <sup>b</sup>	44.7
*CO (65 °C) + desinfectantes	Cloro (200 ppm)	4.9 ± 0.16 <sup>a</sup>	100	4.8 ± 0.17 <sup>a</sup>	100
	AP (80 ppm)	4.9 ± 0.16 <sup>a</sup>	100	4.8 ± 0.17 <sup>a</sup>	100
	AEN (50 ppm)	4.9 ± 0.16 <sup>a</sup>	100	4.8 ± 0.17 <sup>a</sup>	100

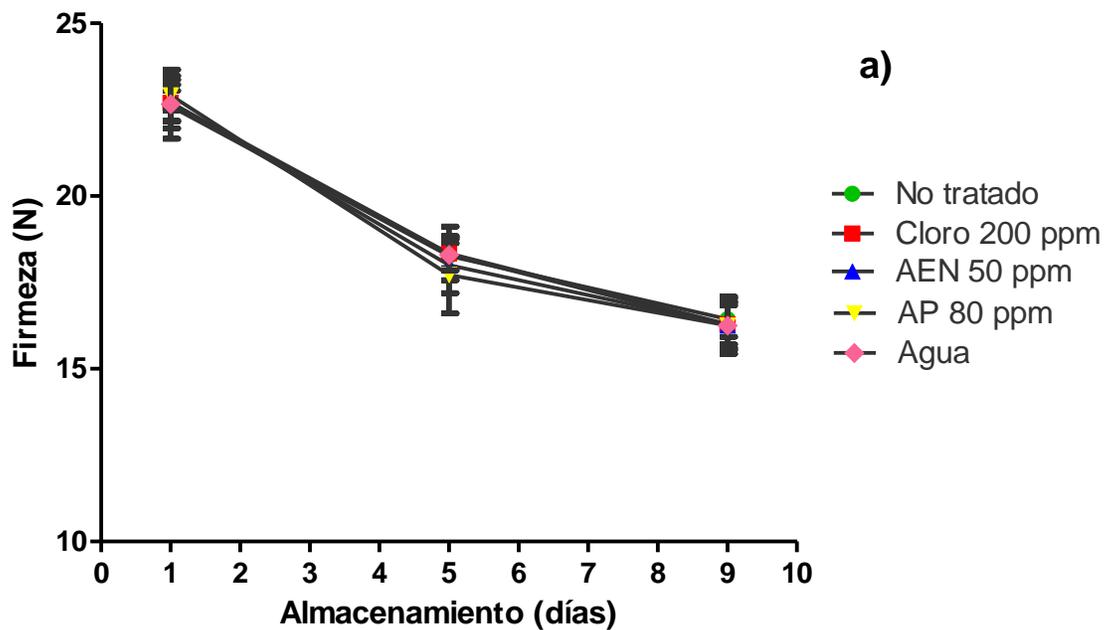
AP: ácido peracético; AEN: agua electrolizada neutra; CO: calentamiento óhmico.

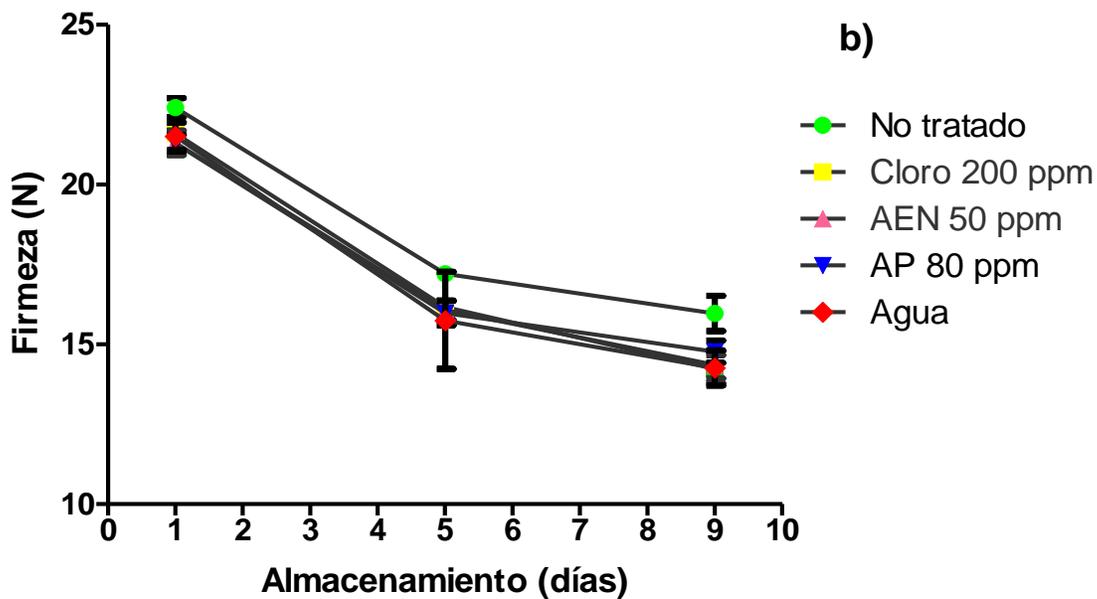
\*Tratamientos durante 60 s. Entre columnas los valores representan la media de nueve datos ± la desviación estándar. Valores en la misma columna seguidos de letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

#### 6.4 Efecto del calentamiento óhmico sobre la calidad de la papaya

Los tratamientos térmicos se han utilizado ampliamente para proporcionar seguridad fitosanitaria contra una serie de insectos plagas y hongos en frutas tropicales (Paull, 1995). Estos tratamientos utilizando calor se pueden lograr mediante inmersión en agua caliente, aire seco y tratamientos de calor de vapor (Singh y Rao, 2011). En nuestro trabajo los resultados obtenidos con los tratamientos a 55 °C (Figura 6.9a) muestran que la firmeza de la papaya fue de 22

N a 16 N después de nueve días de almacenamiento en todos los tratamientos. La fruta tratada con calentamiento óhmico no mostró diferencias significativas en la firmeza durante el almacenamiento en relación con la papaya no tratada ( $p > 0.05$ ). Estos resultados coinciden con lo reportado por Chávez-Sánchez *et al.* (2013), quienes demostraron que el tratamiento con agua caliente a 55 °C durante 3 min no afectó negativamente a los variables de calidad de la pulpa y la piel de la papaya en su etapa de madurez.





**Figura 6.9.** Firmeza (N) de frutos de papaya después de tratamiento con calentamiento óhmico almacenada a 17 °C durante 9 días. a) Papayas tratadas a 55 °C por 60 s en combinación con desinfectantes. b) Papayas tratadas a 65 °C por 60 s en combinación con desinfectantes. AP: ácido peracético; AEN: agua electrolizada neutra; Agua: calentamiento óhmico únicamente. Los valores representan la media de nueve tratamientos  $\pm$  la desviación estándar.

Cuando las papayas fueron sometidas al calentamiento óhmico a una temperatura de 65 °C durante 60 s la firmeza varió de 21 N a 14 N en los frutos tratados y de 22 N a 15 N en el control después de nueve días de almacenamiento, esto es que no hubo diferencia significativa en las frutas tratadas con calentamiento óhmico en comparación con las papayas no tratadas ( $p > 0.05$ ) (Figura 6.9b). Los frutos tratados no mostraron tejido del epicarpio lesionado por el calor, deterioro o magulladuras (Figura 6.10). Además, se considera que los valores obtenidos están dentro del rango del valor de firmeza de la papaya en condiciones comestibles que varía de 17.3 N a 13.2 N (Bhosale y Sundaram, 2015).

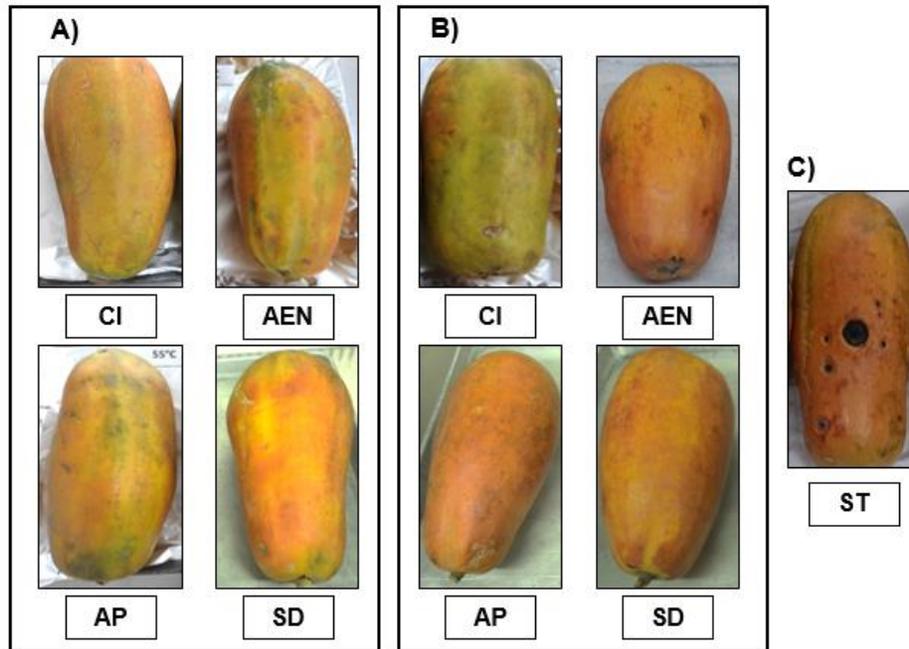
También se cuantificó el contenido de hongos después del tratamiento con calentamiento óhmico. Se observó una actividad antifúngica en las papayas que recibieron tratamiento, los conteos fueron de 10 UFC/g o se encontraban por debajo del límite de detección (<10 UFC/g) (Tabla 4). En el control no tratado se obtuvo mayor conteo de hongos en placa (30 UFC/g), además de que al final del almacenamiento (nueve días) presentó daños visibles en el epicarpio por hongos (Figura 6.10).

Cómo lo describieron Ayón-Reyna *et al.* (2017) quienes realizaron tratamientos con inmersiones en agua caliente (48 °C) y agua caliente en combinación con Ca, tanto el crecimiento micelial, como la germinación conidial de *Colletotrichum gloeosporioides* (antracnosis) se inhibieron y se redujo la incidencia del hongo en papaya. La pudrición de antracnosis, causada por este hongo es la principal enfermedad en poscosecha de la papaya. La infección ocurre en la fruta en desarrollo en el campo, pero permanece latente hasta que la fruta comienza a madurar. Por lo tanto, es difícil prevenir el desarrollo de la enfermedad y esto puede reducir significativamente la calidad y el valor comercial de la fruta durante el almacenamiento y transporte (Li *et al.*, 2013).

**Tabla 4.** Conteo de hongos en papaya después de tratamiento con calentamiento óhmico.

Condiciones	Desinfectante	UFC/g
55 °C, 60 s	Cloro (200 ppm)	<10
	AEN (50 ppm)	10
	AP (80 ppm)	10
	SD	10
65 °C, 60 s	Cloro (200 ppm)	<10
	AEN (50 ppm)	<10
	AP (80 ppm)	10
	SD	10
No tratado	SD	30

AEN: agua electrolizada neutra; AP: ácido peracético; SD: sin desinfectante



**Figura 6.10.** Papayas tratadas con calentamiento óhmico en combinación con desinfectantes después del almacenamiento durante 9 días a 17 °C. A) Papayas tratadas a 55 °C; B) Papayas tratadas a 65 °C; C) Control. CI: Cloro; AEN: agua electrolizada neutra; AP: ácido peracético; SD: sin desinfectantes ST: sin tratamiento.

Se ha reportado que los tratamientos térmicos poscosecha que se aplican a la papaya mejoran la tolerancia del fruto al enfriamiento (Singh y Rao, 2011). Adicionalmente, los tratamientos de exposición corta, como el que se presenta en este estudio, presentan ventajas con relación a los tratamientos comerciales más largos que van de 46 a 47.5 °C durante 40 a 90 min, ya que son más rápidos y menos costosos (Chávez-Sánchez *et al.*, 2013).

Los resultados de este estudio mostraron que los atributos de calidad propios del fruto no mejoran sustancialmente cuando se combina el calentamiento óhmico

con los desinfectantes (cloro, AP y AEN), por lo tanto, y dado que los desinfectantes presentan un efecto prácticamente nulo, resulta menos costoso aplicar únicamente el calentamiento óhmico con fines de preservar la papaya.

Se requiere mayor investigación para determinar el efecto de los tratamientos sobre otras variables físicas y químicas para la vida útil y la calidad de la papaya tales como índice de color, sólidos solubles totales, acidez total titulable, sabor, entre otros.

## 7. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio demostraron que *S. enterica* tiene la capacidad de formar biopelículas en el epicarpio de papaya después de 48 h de incubación, lo cual es preocupante ya que estas estructuras le permiten persistir sobre el fruto durante más tiempo. Las células inmersas en las biopelículas mostraron un aumento en la resistencia a cloro, ácido peracético y AEN con relación a las células libres.

El tratamiento con calentamiento óhmico a 65 °C resultó ser efectivo para inactivar a células de *Salmonella* libres o inmersas en biopelículas formadas en la cáscara del fruto íntegro de papaya, ya que cumple con los criterios establecidos por la FDA al inactivar más de 5 Log UFC del patógeno.

Se observó que el tratamiento óhmico aumenta la vida útil y preserva la calidad de la fruta. Por lo que esta tecnología resulta ser una alternativa rentable que eventualmente puede aplicarse en la industria de productos frescos a gran escala.

Este trabajo es el primero en explorar el calentamiento óhmico como una alternativa para inactivar células de *Salmonella* inmersas en biopelículas formadas en la cáscara del fruto íntegro. Los efectos de inactivación del calentamiento óhmico dependen del tiempo de tratamiento y de la temperatura.

## 8. REFERENCIAS

- Abadias, M., Usall, J., Oliveira, M., Alegre, I., & Viñas, I. (2008). Efficacy of neutral electrolyzed water (NEW) for reducing microbial contamination on minimally-processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1–2), 151–158.
- Afari, G. K., Hung, Y., & King, C. H. (2015). Efficacy of neutral pH electrolyzed water in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium DT 104 on fresh produce items using an automated washer at simulated food service conditions. *Journal of Food Science*, 80(8), 1815–1822.
- Amrutha, B., Sundar, K., & Shetty, P. H. (2017). Study on *E. coli* and *Salmonella* biofilms from fresh fruits and vegetables. *Journal of Food Science and Technology*, 54(5), 1091–1097.
- Annous, B. A., Solomon, E. B., Cooke, P. H., & Burke, and A. (2005). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on cantaloupe melons. *Journal of Food Safety*, 25, 276–287.
- Annous, B. a, Burke, A., & Sites, J. E. (2004). Surface pasteurization of whole fresh cantaloupes inoculated with *Salmonella* Poona or *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 67(9), 1876–85.
- Ayón-Reyna, L. E., López-Valenzuela, J. Á., Delgado-Vargas, F., López-López, M. E., Molina-Corral, F. J., Carrillo-López, A., & Vega-García, M. O. (2017). Effect of the combination hot water-calcium chloride on the in vitro growth of *Colletotrichum gloeosporioides* and the postharvest quality of infected papaya. *The Plant Pathology Journal*, 33(6), 572–581.
- Behnke, S., & Camper, A. K. (2012). Chlorine dioxide disinfection of single and dual species biofilms, detached biofilm and planktonic cells. *Biofouling*, 28(6), 635–647.

- Behnke, S., Parker, A. E., Woodall, D., & Camper, A. K. (2011). Comparing the chlorine disinfection of detached biofilm clusters with those of sessile biofilms and planktonic cells in single- and dual-species cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), 7176–7184.
- Beuchat, L. R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, 4(4), 413–423.
- Beuchat, L. R., Adler, B. B., & Lang, M. M. (2004). Efficacy of chlorine and a peroxyacetic acid sanitizer in killing *Listeria monocytogenes* on iceberg and romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. *Journal of Food Protection*, 67(6), 1238–1242.
- Bhosale, A. A., & Sundaram, K. K. (2015). Nondestructive method for ripening prediction of papaya. *Procedia Technology*, 19, 623–630.
- Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., & Kjelleberg, S. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3916–3923.
- Cabo Verde, S., Trigo, M. J., Sousa, M. B., Ferreira, A., Ramos, a C., Nunes, I., Botelho, M. L. (2013). Effects of gamma radiation on raspberries: safety and quality issues. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 76(4–5), 291–303.
- Castro, S. M., & Saraiva, J. A. (2014). High-pressure processing of fruits and fruit products. In *Emerging Technologies for Food Processing* (pp. 65–76). Elsevier Ltd.
- CDC. (2011). Multistate outbreak of human *Salmonella* Agona infections linked to whole, fresh imported papayas. Fecha de consulta: Mayo 16, 2017, página:

<https://www.cdc.gov/salmonella/2011/papayas-8-29-2011.html>

CDC. (2017). Multistate outbreak of *Salmonella* Kiambu infections linked to imported maradol papayas. Fecha de consulta: Diciembre 08, 2017, página: <https://www.cdc.gov/salmonella/kiambu-07-17/index.html>

Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., & Buret, A. (1999). The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1771.

Chávez-Sánchez, I., Carrillo-López, A., Vega-García, M., & Yahia, H. (2013). The effect of antifungal hot-water treatments on papaya postharvest quality and activity of pectinmethylesterase and polygalacturonase. *Journal of Food Science and Technology*, 50(1), 101–107.

Coffey, B. M., & Anderson, G. G. (2014). Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. In A. Filoux & J.-L. Ramos (Eds.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1149, pp. 631–641). New York: Springer US.

Corbo, M. R., Speranza, B., Campaniello, D., D'Amato, D., & Sinigaglia, M. (2010). Fresh-cut fruits preservation: current status and emerging technologies. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (pp. 1143–1154).

Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Alvarez-Ordóñez, A. (2016). New weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1–21.

Dimakopoulou-Papazoglou, D., Lianou, A., & Koutsoumanis, K. P. (2016). Modelling biofilm formation of *Salmonella enterica* ser. Newport as a function of pH and water activity. *Food Microbiology*, 53, 76–81.

- FAO. (2017). Crop Production. Fecha de consulta: Mayo 17, 2017, página: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Farkas, J., & Mohácsi-Farkas, C. (2011). History and future of food irradiation. *Trends in Food Science & Technology*, 22(2–3), 121–126.
- FDA. (1998). Guidance for industry guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables. Fecha de consulta: Agosto 16, 2018, página: <https://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM169112.pdf>
- Feliziani, E., Lichter, A., Smilanick, J. L., & Ippolito, A. (2016). Disinfecting agents for controlling fruit and vegetable diseases after harvest. *Postharvest Biology and Technology*, 122(2015), 53–69.
- Feng, K., Hu, W., Jiang, A., Xu, Y., Sarengaowa, Li, X., & Bai, X. (2015). Growth potential of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on fresh-cut tropical fruits. *Journal of Food Science*, 80(11), M2548–M2554.
- Flemming, H., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Publishing Group*, 8(9), 623–633.
- Foong-Cunningham, S., Verkaar, E. L. C., & Swanson, K. (2012). Microbial decontamination of fresh produce. In *Microbial Decontamination in the Food Industry* (pp. 3–29). USA: Woodhead Publishing Limited.
- Fu, Y., Deering, A. J., Bhunia, A. K., & Yao, Y. (2016). Pathogen biofilm formation on cantaloupe surface and its impact on the antibacterial effect of lauroyl arginate ethyl. *Food Microbiology*, 64, 139–144.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269–275.
- Gardan, L., Christen, R., Achouak, W., & Prior, P. (2004). *Erwinia papayae* sp. nov.,

- a pathogen of papaya (*Carica papaya*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1), 107–113.
- Ghigo, J.-M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412(6845), 442–445.
- Gibbs, R., Pingault, N., Mazzucchelli, T., O'Reilly, L., MacKenzie, B., Green, J. Van Buynder, P. (2009). An outbreak of *Salmonella enterica* serotype Litchfield infection in Australia linked to consumption of contaminated papaya. *Journal of Food Protection*, 72(5), 1094–1098.
- Gil, M. I., Gómez-López, V. M., Hung, Y. C., & Allende, A. (2015). Potential of electrolyzed water as an alternative disinfectant agent in the fresh-cut industry. *Food and Bioprocess Technology*, 8(6), 1336–1348.
- Gomathy, K., Thangavel, K., Balakrishnan, M., & Kasthuri, R. (2015). Effect of ohmic heating on the electrical conductivity, biochemical and rheological properties of papaya pulp. *Journal of Food Process Engineering*, 38(4), 405–413.
- González-Aguilar, G. A., Ayala-Zavala, J. F., Olivas, G. I., de la Rosa, L. A., & Álvarez-Parrilla, E. (2010). Preserving quality of fresh-cut products using safe technologies. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 5(1), 65–72.
- Graça, A., Abadias, M., Salazar, M., & Nunes, C. (2011). The use of electrolyzed water as a disinfectant for minimally processed apples. *Postharvest Biology and Technology*, 61(2–3), 172–177.
- Greenberg, A. E., Clesceri, L. S., & Eaton, A. D. (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. In *American Public Health Association* (18th ed., pp. 4–38). Washington, D.C: American Public Health Association.
- Greenspan, F., & Mackellar. (1994). FMC. Technical Bulletin 4, peracetic acid, 35%.

*Anal. Chem*, (902), 20, 1061.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(February), 95–108.

Hawkins, J. L., Vimini, B., Schwarz, J. G., & Nichols, P. (2016). Application of antimicrobial agents via commercial spray cabinet to inactivate *Salmonella* on skinless chicken meat. *Journal of Food Protection*, 79(4), 569–573.

Huang, R., Vries, D. De, & Chen, H. (2018). Strategies to enhance fresh produce decontamination using combined treatments of ultraviolet, washing and disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 283(June), 37–44.

Iturriaga, M. H., Tamplin, M. L., & Escartín, E. F. (2007). Colonization of tomatoes by *Salmonella* Montevideo is affected by relative humidity and storage temperature. *Journal of Food Protection*, 70(1), 30–4.

Jahid, I. K., & Ha, S. Do. (2012). A review of microbial biofilms of produce: Future challenge to food safety. *Food Science and Biotechnology*, 21(2), 299–316.

Janssens, J. C. A., Steenackers, H., Robijns, S., Gellens, E., Levin, J., Zhao, H., De Keersmaecker, S. C. J. (2008). Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6639–6648.

Jayathunge, K. G. L. R., Gunawardhana, D. K. S. N., Illeperuma, D. C. K., Chandrajith, U. G., Thilakarathne, B. M. K. S., Fernando, M. D., & Palipane, K. B. (2014). Physico-chemical and sensory quality of fresh cut papaya (*Carica papaya*) packaged in micro-perforated polyvinyl chloride containers. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 3918–3925.

Kaplan, J. B. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and

- potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, 89(3), 205–218.
- Kaspar, C. W., & Tamplin, M. L. (1993). Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8), 2425–2429.
- Kim, M. J., Bang, W. S., & Yuk, H. G. (2017). 405±5 nm light emitting diode illumination causes photodynamic inactivation of *Salmonella* spp. on fresh-cut papaya without deterioration. *Food Microbiology*, 62, 124–132.
- Kim, S., & Kang, D. (2017). Synergistic effect of carvacrol and ohmic heating for inactivation of *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, and MS-2 bacteriophage in salsa. *Food Control*, 73, 300–305.
- Krasaekoopt, W., & Bhandari, B. (2010). Fresh-Cut Vegetables. In N. K. Sinha (Ed.), *Handbook of Vegetables & Vegetable Processing* (1st ed., pp. 219–242). Wiley-Blackwell.
- Krishnan, P., Bhat, R., Kush, A., & Ravikumar, P. (2012). Isolation and functional characterization of bacterial endophytes from *Carica papaya* fruits. *Journal of Applied Microbiology*, 113(2), 308–317.
- Lapidot, A., Romling, U., & Yaron, S. (2006). Biofilm formation and the survival of *Salmonella* Typhimurium on parsley. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 229–233.
- Lee, H.-H., Hong, S.-I., & Kim, D. (2014). Microbial reduction efficacy of various disinfection treatments on fresh-cut cabbage. *Food Science & Nutrition*, 2(5), 585–90.
- Lee, S.-Y., Sagong, H.-G., Ryu, S., & Kang, D.-H. (2012). Effect of continuous ohmic heating to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in orange juice and tomato juice. *Journal of Applied*

*Microbiology*, 112(4), 723–731.

- Li, X., Zhu, X., Zhao, N., Fu, D., Li, J., Chen, W., & Chen, W. (2013). Effects of hot water treatment on anthracnose disease in papaya fruit and its possible mechanism. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 437–446.
- Liang, M., Zhang, M., Bhandari, B., & Gao, Z. (2017). Recent developments in novel shelf life extension technologies of fresh-cut fruits and vegetables. *Trends in Food Science and Technology*, 64, 23–38.
- Lianou, A., & Koutsoumanis, K. P. (2012). Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 160(2), 171–178.
- Marcotte, M., Ramaswamy, H. S., Karimi-Zindashty, Y., & Zareifard, M. R. (2010). Ohmic heating effects on rheological and functional properties of foods. In *Novel Food Processing. Effects on Rheological and Functional Properties* (pp. 21–34). United States: CRC Press.
- Ming, R., Yu, Q., & Moore, P. H. (2007). Sex determination in papaya. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 18(3), 401–408.
- Monnin, A., Lee, J., & Pascall, M. A. (2012). Efficacy of neutral electrolyzed water for sanitization of cutting boards used in the preparation of foods. *Journal of Food Engineering*, 110(4), 541–546.
- Mukhopadhyay, R., Mitra, A., Roy, R., & Guha, A. K. (2002). An evaluation of street-vended sliced papaya (*Carica papaya*) for bacteria and indicator microorganisms of public health significance. *Food Microbiology*, 19, 663–667.
- Mukhopadhyay, S., Sokorai, K., Ukuku, D., Fan, X., Juneja, V., Sites, J., & Cassidy, J. (2016). Inactivation of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in cantaloupe puree by high hydrostatic pressure with/without added ascorbic

- acid. *International Journal of Food Microbiology*, 235, 77–84.
- Murphy, T. F., & Kirkham, C. (2002). Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. *BMC Microbiology*, 2, 7.
- Mutaku, I., Erku, W., & Ashenafi, M. (2005). Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh tropical fruit juices at ambient and cold temperatures. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(2), 133–9.
- Netramai, S., Kijchavengkul, T., Sakulchuthathip, V., & Rubino, M. (2016). Antimicrobial efficacy of gaseous chlorine dioxide against *Salmonella enterica* Typhimurium on grape tomato (*Lycopersicon esculentum*). *International Journal of Food Science & Technology*, 51(10), 2225–2232.
- Ölmez, H. (2016). Foodborne pathogenic bacteria in fresh-cut vegetables and fruits. In *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods* (pp. 151–166). Turkey.
- Pang, X., Yang, Y., & Yuk, H. (2017). Biofilm formation and disinfectant resistance of *Salmonella* spp. in mono- and dual-species with *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 651–660.
- Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V, Harris, L. J., Garrett, E. H., Farber, J. N., & Busta, F. F. (2003). Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 161–173.
- Park, E. J., Alexander, E., Taylor, G. A., Costa, R., & Kang, D. H. (2009). The decontaminative effects of acidic electrolyzed water for *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on green onions and tomatoes with differing organic demands. *Food Microbiology*, 26(4), 386–390.

- Park, I., Ha, J., & Kang, D. (2017). Investigation of optimum ohmic heating conditions for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in apple juice. *BMC Microbiology*, 17(17), 1–8.
- Park, I. K., & Kang, D. H. (2013). Effect of electropermeabilization by ohmic heating for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in buffered peptone water and apple juice. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7122–7129.
- Paull, R. E. (1995). Preharvest factors and the heat sensitivity of field-grown ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 6, 167–175.
- Paull, R. E., & Chen, W. (1997). Minimal processing of papaya (*Carica papaya* L.) and the physiology of halved fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 12(1), 93–99.
- Penteado, A. L., & Leitão, M. F. F. (2004a). Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. *International Journal of Food Microbiology*, 92(1), 89–94.
- Penteado, A. L., & Leitão, M. F. F. (2004b). Growth of *Salmonella* Enteritidis in melon, watermelon and papaya pulp stored at different times and temperatures. *Food Control*, 15(5), 369–373.
- Petri, E., Rodríguez, M., & García, S. (2015). Evaluation of combined disinfection methods for reducing *Escherichia coli* O157:H7 population on fresh-cut vegetables. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(8), 8678–8690.
- Pinela, J., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Nonthermal physical technologies to decontaminate and extend the shelf-life of fruits and vegetables: Trends aiming at quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(10),

2095–2111.

Rahman, S. M. E., Ding, T., & Oh, D. H. (2010). Inactivation effect of newly developed low concentration electrolyzed water and other sanitizers against microorganisms on spinach. *Food Control*, 21(10), 1383–1387.

Ramaswamy, H., Chen, C., & Marcotte, M. (2005). Novel processing technologies for food preservation. In D. M. Barrett, L. Somogyi, & H. Ramaswamy (Eds.), *Processing Fruits: Science and Technology* (Second, p. 861). Florida, United States: Science and Technology.

Ramos, H. C. C., Pereira, M. G., Gonçalves, L. S. A, Berilli, P. C. G., Pinto, F. O., & Ribeiro, E. H. (2012). Multivariate analysis to determine the genetic distance among backcross papaya (*Carica papaya*) progenies. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 11(2), 1280–95.

Rani, S. A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R. A., Lewandowski, Z., Davison, W. M., Stewart, P. S. (2007). Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *Journal of Bacteriology*, 189(11), 4223–4233.

Raybaudi-Massilia, R., Calderón-Gabaldón, M. I., Mosqueda-Melgar, J., & Tapia, M. S. (2013). Inactivation of *Salmonella enterica* ser. Poona and *Listeria monocytogenes* on fresh-cut “Maradol” red papaya (*Carica papaya* L) treated with UV-C light and malic acid. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 8(1–2), 37–44.

Rollet, C., Gal, L., & Guzzo, J. (2009). Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: A comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 290(2), 135–142.

SAGARPA. (2017). Papaya Mexicana. Fecha de consulta: Abril 17, 2018, página:

[www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios.../PAPAYA2009.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios.../PAPAYA2009.pdf)

- Saldaña, G., Minor-Perez, H., Raso, J., & Alvarez, I. (2011). Combined effect of temperature, PH, and presence of nisin on inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(7), 797–802.
- Santos, A. M. G., Lins, S. R. O., Silva, J. M., & Oliveira, S. M. A. (2015). Low doses of gamma radiation in the management of postharvest *Lasiodiplodia theobromae* in mangos. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 46(3), 841–847.
- Sharma, M., Luo, Y., & Buchanan, R. (2011). Microbial safety of tropical and subtropical fruits. In *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits* (pp. 288–314). Maryland, USA: Woodhead Publishing Limited.
- SIAP. (2017). Atlas Agroalimentario 2017. Fecha de consulta: Junio 27, 2018, página: [http://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2017/Atlas-Agroalimentario-2017](http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2017/Atlas-Agroalimentario-2017)
- Singh, P., & Hung, Y. (2018). Efficacy of peracetic acid in inactivating foodborne pathogens on fresh produce surface. *Journal of Food Science*, 00(00), 1–8.
- Singh, S. P., & Rao, D. V. S. (2011). Papaya (*Carica papaya* L.). *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits: Volume 4: Mangosteen to white sapote*. India: Woodhead Publishing Limited.
- SIOVM. (2012). Carica papaya. Fecha de consulta: Marzo 11, 2018, página: [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20898\\_sg7.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20898_sg7.pdf)
- Smith, J. L., Fratamico, P. M., & Novak, J. S. (2004). Quorum sensing: A primer for food microbiologists. *Journal of Food Protection*, 67(June), 1053–1070.

- Speranza, B., Monacis, N., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2017). Approaches to removal and killing of *Salmonella* spp. biofilms. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), 1–9.
- Strawn, L. K., & Danyluk, M. D. (2010). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on fresh and frozen cut mangoes and papayas. *International Journal of Food Microbiology*, 138(1–2), 78–84.
- Vadlamudi, S., Taylor, T. M., Blankenburg, C., & Castillo, A. (2012). Effect of chemical sanitizers on *Salmonella enterica* serovar poona on the surface of cantaloupe and pathogen contamination of internal tissues as a function of cutting procedure. *Journal of Food Protection*, 75(10), 1766–1773.
- Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1117–1131.
- Vanburen, R., Zeng, F., Chen, C., Zhang, J., Wai, C. M., Han, J., Ming, R. (2015). Origin and domestication of papaya Y h chromosome. *Genome Research*, 524–533.
- Vandekinderen, I., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Ragaert, P., & Van Camp, J. (2009). Optimization and evaluation of a decontamination step with peroxyacetic acid for fresh-cut produce. *Food Microbiology*, 26(8), 882–888.
- Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D. A., Lyng, J. G., & Morgan, D. J. (2008). Inactivation of *Escherichia coli* in a tropical fruit smoothie by a combination of heat and pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 73(8), 395–399.
- Walters, M. C. , Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2003). Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 317–323.

- Wang, H., Feng, H., Liang, W., Luo, Y., & Malyarchuk, V. (2009). Effect of surface roughness on retention and removal of *Escherichia coli* O157:H7 on surfaces of selected fruits. *Journal of Food Science*, *74*(1), 1–8.
- Wei, X. D., Zou, H. L., Chu, L. M., Liao, B., Ye, C. M., & Lan, C. Y. (2006). Field released transgenic papaya affects microbial communities and enzyme activities in soil. *Plant and Soil*, *285*(1–2), 347–358.
- Xu, Z., Liang, Y., Lin, S., Chen, D., Li, B., Li, L., & Deng, Y. (2016). Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. *Current Microbiology*, *73*(4), 474–482.
- Yang, Y., Mik, M., Zheng, Q., Lee, S., Lee, S., & Yuk, H. (2016). Biofilm formation of *Salmonella* Enteritidis under food-related environmental stress conditions and its subsequent resistance to chlorine treatment. *Food Microbiology*, *54*, 98–105.
- Yaron, S., & Römling, U. (2014). Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microbial Biotechnology*, *7*(6), 496–516.
- Yaun, B. R., Sumner, S. S., Eifert, J. D., & Marcy, J. E. (2004). Inhibition of pathogens on fresh produce by ultraviolet energy. *International Journal of Food Microbiology*, *90*(1), 1–8.
- Yoo, S., Ghafoor, K., Kim, J. U., Kim, S., Jung, B., Lee, D.-U., & Park, J. (2015). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on orange fruit surfaces and in juice using photocatalysis and high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*, *78*(6), 1098–1105.
- Zhou, B., Luo, Y., Nou, X., Lyu, S., & Wang, Q. (2015). Inactivation dynamics of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157: H7 in wash water during simulated chlorine depletion and replenishment processes. *Food Microbiology*, *50*, 88–96.

## 9. ANEXOS

### Anexo A

#### 1. Valoración del cloro disponible (Greenberg *et al.*, 1992)

- Colocar 25 mL de la muestra
- Adicionar 10 mL de yoduro de potasio al 10% y 5 mL de ácido acético glacial, agitar
- Titular con solución valorada de tiosulfato de sodio 0.01 M hasta aparición de color amarillo pálido.
- Adicionar 1 mL de solución de almidón al 1%, agitar
- Titular con solución valorada de tiosulfato de sodio 0.01 M hasta desaparición de color azul

Cálculos:

$$\text{Cloro disponible (ppm)} = \frac{V_1 \times N_1 \times 3.55 \times 10^4}{m}$$

Donde:

V1 = Volumen de tiosulfato de sodio consumido en la titulación (mL)

N1 = Normalidad del tiosulfato de sodio

m = Cantidad de muestra

## Anexo B

### 2. Valoración del ácido peracético (*Greenspan & Mackellar, 1994*)

Determinación de la concentración de ácido peracético.

- Tomar una muestra de 50 mL de ácido peracético en un vaso de precipitados.
- Añadir 10 mL de ácido sulfúrico 2 N.
- Valorar con permanganato de potasio 0.1 N hasta una coloración rosa tenue y persistente (“a” mililitros consumidos de permanganato de potasio 0.1 N).
- Añadir 10 mL de yoduro de potasio al 10%.
- Valorar con tiosulfato de sodio 0.1 N, hasta que vire a color amarillo claro.
- Se añaden unas gotas de disolución de almidón al 1% con lo que se tornará oscura la solución.
- Valorar con tiosulfato de sodio 0.1 N, hasta que adquiera un aspecto incoloro (“b” mililitros consumidos de tiosulfato de sodio 0.1 N).

Cálculos:

Sean “a” los mililitros consumidos de permanganato de potasio.

$a \times 37 = \text{ppm de peróxido de hidrógeno (H}_2\text{O}_2)$

Sean “b” los mililitros consumidos de tiosulfato de sodio 0.1 N

$b \times 74 = \text{ppm de ácido peracético}$

