



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA
REPÚBLICA (PROPAC)**

“Comportamiento de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* adheridas
a jitomate *cherry* y su tolerancia a desinfectantes”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

ANDREA LOO ESTRADA

DIRIGIDA POR:

DRA. SOFIA MARIA ARVIZU MEDRANO

QUERÉTARO, QRO. A DICIEMBRE DEL 2017.



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

Comportamiento de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* adheridas a
jitomate *cherry* y su tolerancia a desinfectantes

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Andrea Loo Estrada

Dirigido por:

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

SINODALES

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Presidente

Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Secretario

Firma

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Vocal

Firma

Dr. Ramón Álvar Martínez Peniche
Suplente

Firma

M. en C. Beatriz L. Álvarez Mayorga
Suplente

Firma

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad

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

Centro Universitario
Diciembre 2017
Querétaro, Qro. México

RESUMEN

El jitomate es una de las hortalizas más producidas a nivel mundial y ha sido implicado en brotes de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. El jitomate *cherry* se consume principalmente crudo y el único tratamiento antimicrobiano que se aplica suele ser la desinfección química. El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* adheridas a jitomate *cherry* y su tolerancia a diversos desinfectantes. Se utilizaron cepas de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* resistentes a rifampicina; previo a su uso en estudios de desinfección y comportamiento en jitomate *cherry* se valoraron diferencias en el desarrollo de cada cepa en caldo soya tripticasa (CST) diluido (0.1, 1 y 10 %), con pH modificado (4, 5 y 6) y con adición de NaCl (1, 1.5 y 2%). También se comparó la susceptibilidad de las cepas resistentes y no resistentes a rifampicina a: NaOCl (30 ppm), agua electrolizada (EW) 30 ppm y ácido acético comercial (2 % para *Salmonella* y 4 % para *Listeria monocytogenes*). Se almacenaron jitomates inoculados con ambos patógenos en 4 (7 días) y 22 °C (5 días). Se cuantificaron periódicamente las células débilmente adheridas (CDA) y las células fuertemente adheridas (CFA) a la superficie del fruto, y se evaluó la eficiencia de la desinfección con NaOCl (60 ppm) y EW (60 ppm) después del almacenamiento. No se encontraron diferencias ($\alpha \leq 0.05$) entre cepas resistentes y no resistentes a rifampicina en las diferentes condiciones de desarrollo, ni en la susceptibilidad a desinfectantes. *Salmonella* y *L. monocytogenes* fueron capaces de adherirse a la superficie del jitomate. La tendencia de ambos patógenos adheridos a jitomate fue a sobrevivir independientemente de la temperatura; el mayor desarrollo se observó a 22 °C con *Listeria monocytogenes* (~1 Log UFC/jitomate de incremento). La mayor proporción de CFA se encontró en los jitomates inoculados con *L. monocytogenes* y almacenados a 4 °C (~3 Log UFC/jitomate) La susceptibilidad a los desinfectantes de *Salmonella* inoculada en el fruto estuvo influenciada por la interacción entre la intensidad de adhesión (CDA y CFA) y la temperatura, la mayor susceptibilidad se observó en las CDA almacenadas a 22 °C (~3.24 Log UFC/jitomate); mientras que para *L. monocytogenes*, el factor relevante fue el tipo de población, Las células fuertemente adheridas fueron las más tolerantes a los desinfectantes. La adhesión de *L. monocytogenes* y *Salmonella* al jitomate *cherry* favorece su sobrevivencia ante los desinfectantes; por ello la desinfección no es suficiente para asegurar la inocuidad del fruto y es necesario minimizar la exposición del fruto a fuentes de contaminación a lo largo de la producción, comercialización y consumo.

(**Palabras clave:** adhesión, desinfección, jitomate *cherry*, *Salmonella*, *L. monocytogenes*)

SUMMARY

The tomato is one of the vegetables more produced worldwide however it also has been implicated in outbreaks of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. Cherry tomato is specially eaten raw and the only antimicrobial treatment prior to consumption is usually chemical disinfection. The aim of this work was to evaluate the behaviour of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* cells adhered to cherry tomato and their tolerance to diverse disinfectants. Rifampicin-resistant strains were used, previously, their behaviour between resistant and parental strains were compared. The evaluation of the growth of each strain were made in tripticase soy broth (TSB) diluted (0.1, 1 and 10%), with modified pH (4, 5 and 6) and with the addition of NaCl (1, 1.5 and 2%). Also the susceptibility to disinfectants was tested: NaOCl (30 ppm), electrolyzed neutral water (EW 30 ppm) and comercial acetic acid (2% for *Salmonella* and 4% for *L. monocytogenes*). The inoculated tomatoes were stored at 4 (7 days) and 22 °C (5 days). Both, the weakly adhered (CDA) and the strongly adhered cells (CFA) to the surface of the tomatoes were counted after the storage. They were also disinfected with NaOCl (60 ppm) and EW (60 ppm). No differences were found ($\alpha < 0.05$) between the resistant and parental strains in the diferent growing conditions or in the susceptibility to disinfectants. *Salmonella* and *L. monocytogenes* were capable to adhere and survive on the tomato surface at 4°C for 7 days. No mater wich storage temperature was used, the trend of both adhered microorganisms to tomatoes was to survive; the greatest increment was observed with *L. monocytogenes* at 22°C (~1 Log CFU/tomato). The biggest rate of CFA was found in the tomatoes inoculated with *L. monocytogenes* and stored at 4°C (~3 Log UFC/tomato). The susceptibility of *Salmonella* to disinfectants was influenced by the interaction between the type of population (CDA and CFA) and temperature, the CDA stored at 22°C were more susceptible (~3.24 Log UFC/jitomate). For *L. monocytogenes*, the most important factor was the type of population, the CFA were more tolerant to disinfectants than CDA. The attachment of *L. monocytogenes* and *Salmonella* to *cherry* tomato improve the tolerance to disinfectants; therefore disinfection does not guaranty the produce safety and it is necessary to minimize the exposition of the tomato to sources of contamination through production, comercialization and consumption.

(Key words: adhesión, disinfection, cherry tomato, *Salmonella*, *L. monocytogenes*)

Dedico este trabajo a Dios por llenarme de bendiciones y guiarme a lo largo de mi vida.

A mi mamá por su amor y apoyo incondicional a lo largo de mi vida y en cada decisión que he tomado.

A mi angelote en el cielo, mi papá, te extraño.

A mi esposo por su cariño y por creer en mí desde el principio y siempre.

A mi familia porque a pesar de los obstáculos que se nos presenten seguiremos unidos, los amo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para la realización de los estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República.

A Dios, por la fortaleza que me ha dado para salir adelante porque yo sé que sin su amor incondicional no soy nada.

A mi papá que aunque ya no esté conmigo físicamente yo sé que siempre me acompaña, ¡te quiero papá!. A mi mamá que siempre me ha apoyado, escuchado y dado consejos cuando más lo he necesitado, ¡te quiero mamá!

A Pepe Toño que siempre me apoyó y ayudó durante la maestría, gracias por acompañarme en las noches de desvelo, por escucharme y escuchar mis presentaciones miles de veces y además echarme porras para levantar mi ánimo.

A mis hermanos, Kary, Chucho, por ser siempre los mejores hermanos, gracias también porque me dieron a esas personitas que tanto alegran mi vida y me animan a ser mejor persona día a día, Alli, Pepito, Jessie y Juan Pi.

A mis amigas Lucy e Iri porque siempre me ayudaban cuando no entendía algo y por las horas de pláticas, a mis amigos del lab, Marce, Alex y Dalia porque me animaban, enseñaban y corregían cuando era necesario.

A la Doctora Sofi y a la maestra Bety porque confiaron en mí desde el principio y me han apoyado desde entonces.

TABLA DE CONTENIDO

	RESUMEN	3
	SUMMARY	4
	Dedicatorias	5
	Agradecimientos	6
	Tabla de contenido	7
	Índice de tablas	11
	Índice de figuras	12
1.	Introducción	14
2.	Revisión de la literatura	16
2.1	Hortalizas.....	16
2.1.1	Inocuidad de hortalizas.....	16
2.2	Jitomate.....	17
2.2.1	Producción de jitomate.....	18
2.2.2	Estadística de brotes asociados a jitomate.....	18
2.3	<i>Salmonella</i> spp.....	20
2.3.1	Características generales.....	20
2.3.2	Factores de virulencia.....	21
2.3.3	Epidemiología.....	21
2.3.4	Comportamiento en hortalizas.....	22
2.3.5	Salmonelosis.....	22
2.4	<i>Listeria monocytogenes</i>	24
2.4.1	Características generales.....	24
2.4.2	Factores de virulencia.....	24
2.4.3	Epidemiología.....	25
2.4.4	Comportamiento en hortalizas.....	25
2.4.5	Listeriosis.....	26
2.5	Lavado y desinfección de hortalizas.....	27
2.5.1	Generalidades.....	27
2.5.2	Cloro.....	28

2.5.3	Agua electrolizada.....	29
2.5.4	Ácidos orgánicos.....	30
2.6	Factores que intervienen en la eficacia de la desinfección.....	31
2.6.1	Adhesión microbiana.....	32
2.7	Resistencia a rifampicina.....	33
3.	Objetivos	35
3.1	Objetivo general.....	35
3.2	Objetivos particulares.....	35
4.	Metodología	36
4.1	Materiales.....	36
4.1.1	Material biológico.....	36
4.1.2	Equipos.....	36
4.1.3	Medios de cultivo.....	37
4.1.4	Reactivos.....	37
4.1.5	Desinfectantes.....	38
4.2	Métodos.....	38
4.2.1	Estudios del comportamiento de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes in vitro</i>	38
4.2.1.1	Selección de cepas resistentes a rifampicina.....	38
4.2.1.1.1	Activación y lavado de cepas.....	39
4.2.1.1.2	Evaluación del desarrollo en diferentes concentraciones de nutrientes, NaCl y niveles de pH	39
4.2.1.2	Evaluación de la tolerancia a desinfectantes.....	40
4.2.2	Desinfección de CDA en jitomate <i>cherry</i> (sin almacenamiento).....	41
4.2.2.1	Activación y lavado de cepas.....	41
4.2.2.2	Preparación del inóculo.....	42
4.2.2.3	Inoculación del jitomate <i>cherry</i>	42
4.2.2.4	Evaluación de los desinfectantes.....	42
4.2.2.5	Recuento de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> posterior a los tratamientos.....	42

4.2.3	Comportamiento de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> adheridas en jitomate <i>cherry</i>	43
4.2.3.1	Activación de las cepas y lavado de cepas.....	43
4.2.3.2	Preparación del inóculo.....	43
4.2.3.3	Inoculación del jitomate <i>cherry</i>	43
4.2.3.4	Almacenamiento de los jitomates <i>cherry</i> inoculados	43
4.2.3.5	Cuantificación de CDA.....	44
4.2.3.6	Cuantificación de CFA.....	44
4.2.3.7	Selección de condiciones del sonicador para el recuento de CFA.....	45
4.2.3.7.1	Recuento de células débilmente adheridas (CDA).....	45
4.2.3.7.2	Recuento de células fuertemente adheridas (CFA).....	46
4.2.4	Evaluación de la tolerancia a desinfectantes.....	46
4.2.4.1	Preparación de desinfectantes.....	46
4.2.4.2	Desinfección de CDA y CFA en jitomate <i>cherry</i>	47
4.2.4.2.1	Recuento de células débilmente adheridas (CDA)	47
4.2.4.2.2	Recuento de células fuertemente adheridas (CFA)	47
4.2.5	Diseño experimental y análisis estadístico.....	48
5.	Resultados y discusión	50
5.1	Comparación del desarrollo de cepas de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> resistentes y no resistentes a rifampicina.....	50
5.1.2	Comparación de células en diferentes sustratos.....	50
5.1.3	Evaluación de la susceptibilidad de las cepas a desinfectantes.....	50
5.2	Comportamiento de células fuertemente adheridas (CFA) y células débilmente adheridas (CDA) de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> en condiciones de almacenamiento a 4°C y 22°C.....	64
5.2.1	Selección de condiciones del sonicador para el recuento de CFA.....	64
5.2.2	Comportamiento de <i>Salmonella</i> en jitomate <i>cherry</i>	65
5.2.3	Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> en jitomate <i>cherry</i>	68
5.3	Desinfección de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> en jitomate <i>cherry</i>	71
5.3.1	<i>Salmonella</i>	71

5.3.2	<i>L. monocytogenes</i>	74
6.	Conclusiones	80
7.	Referencias	81
	Anexo 1	89
	Anexo 2	90

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Clasificación de microorganismos patógenos comúnmente encontrados en frutas y hortalizas.....	17
Tabla 2.2	Brotos multi-estatales asociados al consumo de jitomates crudos, Estados Unidos, 1973-2010.....	19
Tabla 4.1	Condiciones de uso del sonicador.....	46
Tabla 5.1	Tiempo de detección (h) de cuatro cepas de <i>Salmonella</i> resistentes a rifampicina y su contraparte no resistente en diferentes sustratos.....	52
Tabla 5.2	Densidad Óptica Máxima de cuatro cepas de <i>Salmonella</i> resistentes a rifampicina y su contraparte no resistente en diferentes sustratos.....	53
Tabla 5.3	Estimación de la velocidad de desarrollo de <i>Salmonella</i> en diferentes condiciones de desarrollo.....	54
Tabla 5.4	Tiempo de detección (h) de cuatro cepas de <i>L. monocytogenes</i> resistentes a rifampicina y su contraparte no resistente en diferentes sustratos.....	58
Tabla 5.4	Densidad Óptica Máxima de cuatro cepas de <i>L. monocytogenes</i> resistentes a rifampicina y su contraparte no resistente en diferentes sustratos.....	59
Tabla 5.5	Estimación de la velocidad de desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> en diferentes sustratos	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Electrólisis de la solución de NaCl para la generación de agua electrolizada ácida y alcalina.	30
Figura 4.1	Distribución de los medios de cultivo de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i>	40
Figura 4.2	Diagrama de la evaluación de la tolerancia de cepas de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> (resistentes y no resistentes a rifampicina) ante cloro (CL), agua electrolizada (EW) y vinagre (V)	41
Figura 4.3	Diagrama del comportamiento de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> en jitomate <i>cherry</i>	45
Figura 4.4	Diagrama de la evaluación de la tolerancia a la desinfección de CDA y CFA de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> en jitomate <i>cherry</i>	48
Figura 5.1	Comportamiento en medio de cultivo de células de <i>Salmonella</i> resistentes y no resistentes a rifampicina. (A) Desarrollo de <i>Salmonella</i> en CST condición óptima de desarrollo. (B) Desarrollo de <i>Salmonella</i> en CST al 0.1% condición limitante de desarrollo.....	51
Figura 5.2	Comportamiento en medio de cultivo de células de <i>L. monocytogenes</i> resistentes y no resistentes a rifampicina. (A) Comportamiento de cepas (389 y ATCC) de <i>L. monocytogenes</i> en NaCl 1% condición óptima de desarrollo. (B) Desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> en CST al 1% condición limitante de desarrollo.....	55
Figura 5.3	Comportamiento en medio de cultivo de células de <i>L. monocytogenes</i> resistentes y no resistentes a rifampicina (A) Comportamiento de cepas (LCDC y Scott A) de <i>L. monocytogenes</i> en NaCl 1% condición óptima de desarrollo. (B) Desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> en CST al 1% condición limitante de desarrollo.....	56
Figura 5.4	Efecto <i>in vitro</i> de los desinfectantes contra <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i>	63
Figura 5.5	CFA recuperados mediante sonicación a las diferentes condiciones.....	64
Figura 5.6	Interacción entre la potencia y el tiempo para el desprendimiento de CFA.....	65
Figura 5.7	Comportamiento de CFA y CDA de <i>Salmonella</i> en jitomate <i>cherry</i> almacenado a 4°C.....	66

Figura 5.8	Comportamiento de CFA y CDA de <i>Salmonella</i> en jitomate <i>cherry</i> almacenado a 22°C.....	67
Figura 5.9	Comportamiento de CFA y CDA de <i>L. monocytogenes</i> en jitomate <i>cherry</i> almacenado a 4°C.....	69
Figura 5.10	Comportamiento de CFA y CDA de <i>L. monocytogenes</i> en jitomate <i>cherry</i> almacenado a 22°C.....	70
Figura 5.11	Desinfección de jitomates <i>cherry</i> inoculados con <i>Salmonella</i> sin almacenamiento.....	71
Figura 5.12	Desinfección de CDA y CFA de <i>Salmonella</i> en jitomate <i>cherry</i> almacenado a 22°C.....	72
Figura 5.13	Desinfección de CDA y CFA de <i>Salmonella</i> en jitomate <i>cherry</i> almacenado a 4°C.....	73
Figura 5.14	Interacción entre la intensidad de adherencia de <i>Salmonella</i> en el jitomate <i>cherry</i> con la temperatura de almacenamiento.....	74
Figura 5.15	Desinfección de jitomates <i>cherry</i> inoculados con <i>L. monocytogenes</i> sin almacenamiento.....	75
Figura 5.16	Desinfección de CDA y CFA de <i>L. monocytogenes</i> en jitomate <i>cherry</i> almacenado a 4°C.....	76
Figura 5.17	Desinfección de CDA y CFA de <i>L. monocytogenes</i> en jitomate <i>cherry</i> almacenado a 22°C.....	77
Figura 5.18	Efecto de la intensidad de adherencia en la desinfección de <i>L. monocytogenes</i> en jitomate <i>cherry</i>	79

1. INTRODUCCION

El interés actual de la población por llevar una vida saludable y prevenir enfermedades como la obesidad, diabetes, afecciones cardíacas y cáncer, ha promovido el consumo de frutas y hortalizas. Los jitomates son altamente preferidos debido a su sabor y a que aportan una gran cantidad de nutrientes, vitaminas y minerales.

A pesar de sus características sensoriales y nutricionales, las hortalizas pueden ser un riesgo para la salud humana, debido a que durante su producción y manejo en poscosecha se exponen a diversas fuentes de contaminación microbiana; habiéndose visto implicadas en brotes causados por bacterias, virus y parásitos; entre las bacterias más relevantes se encuentran *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7.

Particularmente el jitomate tipo *cherry*, que se distingue de las demás variedades por su color intenso, tamaño pequeño y sabor dulce, ha incrementado su producción y consumo en México. En otros países se ha visto involucrado en brotes, particularmente de *Salmonella* y *L. monocytogenes*.

Los microorganismos patógenos pueden contaminar el alimento desde el campo o por un mal manejo durante su empaque y comercialización. La desinfección suele ser el tratamiento antimicrobiano que se aplica en algún punto de la cadena de producción. La eficiencia de la desinfección está afectada por una diversidad de factores, como el tipo de desinfectante, la concentración, el tipo de microorganismo y su adhesión al fruto, entre otros. Existen estudios sobre el comportamiento de patógenos y su susceptibilidad a desinfectantes en diversas hortalizas, incluido el jitomate; sin embargo, éstos se han enfocado principalmente en la variedad *saladette*.

En estos estudios de comportamiento de microorganismos patógenos y de la evaluación de la efectividad de los tratamientos de desinfección en los alimentos, se utilizan comúnmente cepas resistentes a rifampicina, las cuales nos permiten cuantificar únicamente a los microorganismos inoculados independientemente de los que se encuentran naturalmente en el alimento. Pocos son los estudios sobre la comparación del comportamiento de estas cepas en este tipo de estudios y si estas podrían afectar los resultados obtenidos.

Por ello el objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento de *Salmonella* y *L. monocytogenes* adheridas a jitomate *cherry*, así como la importancia de los tratamientos de desinfección realizados en poscosecha después de su almacenamiento.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Hortalizas

Según la FAO las hortalizas se pueden clasificar de acuerdo al órgano que se consume en: frutas (tomates y calabazas), hojas (amaranto y repollo), raíces (zanahoria y nabo), tallos (apio, espárrago) y flores (brócoli y coliflor) (FAO, 2016).

Dentro de lo que se considera una alimentación saludable se recomienda el consumo de al menos 400 gramos o cinco porciones de frutas y hortalizas al día, ya que tienen un alto valor nutritivo, como la presencia de vitaminas A, B y C, minerales como calcio y hierro; y contienen celulosa la cual facilita la digestión (OMS, 2015; Callejón *et al.*, 2015).

Principalmente se recomienda que el consumo de las hortalizas sea en fresco, esto quiere decir que no tengan ningún proceso de cocción, principalmente por la pérdida de vitaminas y de sus cualidades organolépticas que éste ocasiona. Sin embargo, el consumo en fresco favorece el riesgo de enfermar para la población (Berger *et al.*, 2010; Ziuzina *et al.*, 2014).

2.1.1 Inocuidad de hortalizas

Los microorganismos patógenos pueden contaminar las frutas y hortalizas a través del contacto del alimento con heces de animales, agua, tierra de cultivo, composta y/o semillas, en la Tabla 2.1, se muestra la clasificación de los microorganismos patógenos que se encuentran comúnmente en hortalizas. Dada las fuentes y la ubicuidad de *Salmonella* y *L. monocytogenes*, éstos pueden contaminar hortalizas por un mal manejo desde el campo hasta el consumo (Suslow *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2017).

Gracias a diversos estudios se ha tratado de tener un mejor manejo de las hortalizas desde el campo, y algunos países han tomado medidas para disminuir el riesgo de su consumo en fresco (Berger *et al.*, 2010; Ziuzina *et al.*, 2014).

Tabla 2.1 Clasificación de microorganismos patógenos comúnmente encontrados en frutas y hortalizas.

Categoría	Microorganismo
Bacterias	<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Clostridium botulinum</i> .
Parásitos patógenos	<i>Cryptosporidium</i> , <i>Cyclospora</i> .
Virus patógenos	Hepatitis A, enterovirus y virus Norwalk.

(Suslow *et al.*, 2003)

2.2 Jitomate

El jitomate pertenece de la familia de las *Solanaceae*, es originario de América del Sur, de la región andina, sin embargo, se domesticó en México y se ha convertido en un elemento fundamental de la dieta del mexicano (SAGARPA, 2010).

Los jitomates se clasifican en varios tipos, tales como (SAGARPA, 2010):

- Jitomate *cherry* o cereza: pequeño y de epidermis delgada, se agrupa en ramilletes. Tiene sabor dulce y puede ser de color rojo o amarillo.
- *Saladette* o Roma: es una variedad italiana para conserva de jitomate pelado, es un fruto pequeño en forma de pera.
- *Beef*: fruto de gran tamaño y poca consistencia, con una producción rápida.

2.2.1 Producción de jitomate

El jitomate es la principal hortaliza que se produce en México. Entre 2013 y el estimado 2016, la producción de jitomate aumentó en 35 por ciento, pasando de dos millones 52 mil toneladas a dos millones 769 mil toneladas, la producción al decimoprimer mes de 2016 alcanzó los 20 mil 640 millones de pesos. Asimismo, es el principal producto que México exporta, principalmente a Estados Unidos, Canadá y Japón. En 2015 se reportaron exportaciones por mil 773 millones de dólares, valor equivalente a 15.7 % del total de las exportaciones agropecuarias mexicanas (SAGARPA, 2017).

Las principales variedades que se producen son el jitomate *saladette* con el 52.2 % de la producción seguido del jitomate bola el cual representó el 45.9% de la producción, en tanto que el 1.9 % correspondió a jitomate *cherry* (SAGARPA, 2013).

Durante 2012, el consumo nacional interno de jitomate se ubicó en 1.37 millones de toneladas. Lo anterior representa 48.2 % del total de la producción nacional. Las variaciones en el consumo nacional dependen de las fluctuaciones de la producción, así como del nivel de las exportaciones. Es por esto que el consumo *per capita* de jitomate en México se ubica en alrededor de 16 kilogramos por año, que es inferior al consumo promedio mundial de 18 kilogramos *per capita* (SAGARPA, 2017).

2.2.2 Estadística de brotes de *Salmonella* spp. asociados a jitomate

El alto nivel de consumo de esta hortaliza se ha relacionado con varios brotes de salmonelosis (Mukhopadhyay *et al.*, 2014).

Frecuentemente, los brotes de *Salmonella* spp. asociados con jitomate se han configurado en restaurantes, hospitales y guarderías (Tabla 2.2) estos brotes

han ocurrido durante más de dos décadas. En algunas ocasiones, la contaminación proviene desde la granja o desde las empacadoras; sin embargo, el manejo en el sitio de preparación puede favorecer el ingreso, sobrevivencia o incluso multiplicación del patógeno. Dependiendo de las prácticas llevadas a cabo pueden incrementar el riesgo del consumo de este alimento (Lamikanra, 2002; Bennett *et al.*, 2014).

Tabla 2.2 Brotes multi-estatales asociados al consumo de jitomates crudos, Estados Unidos, 1973-2010.

Año	Serotipo <i>Salmonella</i>	Número enfermos /hospitalizados (número estados involucrados)	Tipo de Tomate	Lugar de preparación	Lugar de contaminación
1990	Javiana	176/18 (4)	Bola	Restaurante, casa y guarderías	Empacadora
1993	Montevideo	100/16 (4)	Bola	Restaurante, casa	Empacadora
1998	Baildon	86/19 (8)	Bola	Restaurante	Empacadora o lugar de cultivo
2000	Thompson	43/15 (10)	NE	Restaurante, casa	Empacadora o lugar de cultivo
2002	Newport	8/2 (2)	Uva	Restaurante, casa	Empacadora o lugar de cultivo
2004	Braenderup	125/25 (16)	Roma	Restaurante	Empacadora o lugar de cultivo
2004	Multiple	429/129 (5)	Roma	Restaurante	Empacadora o lugar de cultivo
2005	Newport	72/8 (16)	Bola	Restaurante	Empacadora
2005	Enteriditis	77/7 (8)	NE	Restaurante	Empacadora o lugar de cultivo
2005	Braenderup	82/29 (8)	Roma	Restaurante	Empacadora
2006	Newport	115/37 (19)	Bola	Restaurante	Empacadora o Lugar de cultivo
2007	Typhimurium	190/24 (21)	Bola	Restaurante	Empacadora o Lugar de cultivo
2010	Newport	65/11 (18)	Bola	Restaurante	Empacadora o Lugar de cultivo
2010	Newport	51/4 (9)	Bola	Restaurante	Lugar de cultivo

Fuente: (Bennett *et al.*, 2014)

En 1999 se presentó un brote de jitomates crudos que se sirvieron en restaurantes o en guarderías, se rastrearon los jitomates y se observó que la contaminación del producto se debió a un mal manejo en el campo; al estar el fruto caliente se enjuagó en agua fría, con lo cual el agua conteniendo *Salmonella* penetró los jitomates, después de esta contaminación resultó difícil eliminar al microorganismo en el producto fresco (Cummings *et al.*, 2001; Callejón *et al.*, 2015).

Muchos de los brotes de jitomates han tenido lugar en sitios donde se tiene una manipulación previa como en restaurantes, lo que puede deberse a que vienen contaminados desde el campo y las condiciones de manipulación o de almacenamiento permite la proliferación de los patógenos (Behravesch *et al.*, 2012).

En 2014 se configuró un brote de *L. monocytogenes* en ensaladas listas para consumir, este microorganismo se encontró en el campo de cultivo y debido a un mal manejo del agua de lavado se contaminó la lechuga de estas ensaladas (Stephan *et al.*, 2015).

2.3 *Salmonella* spp.

2.3.1 Características generales

Bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia de las *Enterobacteriaceae*, puede o no tener flagelos, es anaerobio facultativo; fermenta la glucosa generando ácido y gas, crece en citrato como única fuente y energía, descarboxila la lisina y la ornitina, suele producir sulfuro de hidrógeno y no hidroliza la urea, la mayor parte no fermenta la lactosa ni la sacarosa (Pérez *et al.*, 2014).

El género *Salmonella* se encuentra compuesto por dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*. *S. enterica* se subdivide en seis subespecies: *Enterica* (I),

Salamae (II), *Arizonae* (IIIa), *Diarizonae* (IIIb), *Houenae*(IV), e *Indica* (VI) (Tindall *et al.*, 2005; Benjamin *et al.*, 2013).

Este microorganismo se clasifica de acuerdo a las reacciones con anticuerpos específicos en 2400 serotipos, y esta clasificación se basa en los antígenos que producen los microorganismos: somático (O), flagelar (H) y de envoltura, pero este último se encuentra sólo en algunos serotipos como *S. Typhi* y *S. Dublin* (Strawn *et al.*, 2013)

Se conoce que la temperatura óptima de desarrollo de *Salmonella* la cual oscila entre 35 a 37 °C, pero existen serotipos que pueden crecer entre 7 y 44 °C, incluso *Salmonella* *Infantis*, puede crecer a 5 °C (Insunza y Soto, 1998), de la importancia de no romper la cadena de frío de los alimentos y mantener los alimentos a menos de esa temperatura (Sim *et al.*, 2013).

2.3.2 Factores de virulencia

Salmonella spp. tiene una mezcla de factores de virulencia que la hacen un enteropatógeno muy complejo, cuando se encuentra fuera del humano sufre condiciones de estrés como la falta de nutrientes, estrés osmótico, variaciones en temperatura y pH; y es cuando se ha observado que desarrolla el estado-viable-pero-no-cultivable. Cuando encuentra las condiciones óptimas deja este estado y empieza a desarrollar (Winfield and Groisman, 2003, Pérez *et al.*, 2014).

2.3.3 Epidemiología

Salmonella spp. representa un problema para la salud pública debido a que de acuerdo a la CDC cada año existen 1.2 millones de enfermos y 450 muertes en los Estados Unidos (CDC, 2012).

Es el primer causante de gastroenteritis y está relacionado con el consumo de frutas y hortalizas por su capacidad de colonizar semillas, hojas y frutas. Esta bacteria sobrevive en las plantas alimentándose de las raíces que son ricas en carbohidratos y posteriormente pueden colonizar las superficies de las hojas en donde usan los nutrientes del medio para su suministro de energía (Barak *et al.*, 2012).

Las fuentes de contaminación de este microorganismo son el suelo, inadecuado manejo de la composta, agua de riego o de lavado, el manejo durante la cosecha y el contacto con otras superficies (Kroupitski *et al.*, 2009; Ziuzina *et al.*, 2014).

2.3.4 Comportamiento en hortalizas

Además *Salmonella* spp. tiene la capacidad de desarrollar en la superficie de los jitomates a temperaturas menores a 12 °C y puede sobrevivir en temperaturas menores a 10 °C (Vandamm *et al.*, 2013) además, se ha postulado que el ácido cítrico, el cual es el principal ácido presente en jitomates, no es capaz de inhibir a este patógeno en un pH de 4.0 (Asplund *et al.*, 1991; Sim *et al.*, 2013).

2.3.5 Salmonelosis

Salmonella spp. causa diferentes infecciones intestinales conocidas como salmonelosis, la cual se divide en dos síndromes:

- La fiebre entérica, que incluye la fiebre tifoidea y la fiebre paratifoidea causadas por *S. Typhi* y por *S. Paratyphi* respectivamente, tienen sintomatología similar entre ellas aunque con menor intensidad para el caso de la fiebre paratifoidea, *Salmonella Typhi* causa la fiebre tifoidea en humanos que son los únicos hospedantes, esta enfermedad prevalece en países en vías de desarrollo, hay aproximadamente 17 millones de casos

anuales con casi 600,000 muertes en Asia y África. Las más altas incidencias se encuentran en Indonesia y en algunas partes del sureste asiático (OMS, 2008; Pegues *et al.*, 2014).

- La gastroenteritis que es el síndrome más común causada por una diversidad de serotipos, el periodo de incubación es de 12 a 36 horas y su duración entre uno a cuatro días (Yousef, 2003; Pegues *et al.*, 2014).

Un alimento conteniendo una concentración de 10^5 a 10^8 células de *Salmonella* viables tienen la capacidad de colonizar el intestino. El periodo de incubación es de 8 a 48 h después de la ingesta. Constituye una de las causas más comunes de gastroenteritis, la mayoría de los casos ocurren durante los meses del verano y en casos específicos, pueden presentarse brotes epidémicos (Baron, 1996; Gal-Mor *et al.*, 2014).

Los síntomas aparecen cuando el patógeno coloniza el epitelio intestinal, y los síntomas consisten en: fiebre, diarrea, cólicos abdominales, dolor de cabeza, pueden presentarse náuseas, vómitos y pérdida de apetito (Gal-Mor *et al.*, 2014). Los síntomas suelen durar entre cuatro y siete días. Las consecuencias pde esta enfermedad pueden ser más graves en las personas inmunocomprometidas como los ancianos, niños pequeños y personas con enfermedades crónicas (Gal-Mor *et al.*, 2014).

2.4 *Listeria monocytogenes*

2.4.1 Características generales

Cocobacilo gram positivo, sobrevive a altas concentraciones de sal (10 % p/vol) y es capaz de desarrollar en un amplio rango de pH (4.7 a 9.2) y de temperaturas, incluyendo las de refrigeración (-0.5 a 9.3 °C) (Ferreira *et al.*, 2013).

Estas características permiten a este microorganismo sobrevivir en el ambiente de las industrias de alimentos y proliferar en éstos. Se ha aislado de diferentes productos como: lácteos, embutidos, huevos, productos del mar, hortalizas y alimentos listos para su consumo (Ferreira *et al.*, 2013).

Se ha aislado de suelo, agua de enjuague, drenaje y heces humanas y animales, es frecuente encontrarla en el ambiente debido a su capacidad de adaptarse a diferentes condiciones de estrés (Oliere *et al.*, 2002).

2.4.2 Factores de virulencia

Entre los factores de virulencia de *L. monocytogenes* se encuentran: las proteínas de superficie internalinas (InA, InB) que favorecen la invasión celular donde la bacteria se hunde progresivamente en la superficie celular; la listeriolisina O y fosfolipasas que permiten lizar y escapar de las vacuolas fagocitarias una vez internalizada en la célula; la proteína polimerizadora de actina, ActA necesaria para la motilidad en el citoplasma celular e intercelular; y transportadores de hexosa fosfato que le permiten utilizar azúcares en el citosol celular durante su replicación intracitoplasmática (Ártola *et al.*, 2010; Lomonaco *et al.*, 2015).

L. monocytogenes utiliza para regular la expresión de los productos de sus genes de virulencia es el control transcripcional del gen *prfA*. La exposición de la bacteria a determinadas condiciones de estrés desencadena la expresión de los

genes de virulencia (Lomonaco *et al.*, 2015).

2.4.3 Epidemiología

De acuerdo a la CDC (Estados Unidos), aproximadamente cada año existen 1,600 enfermos y 260 muertes en los Estados Unidos por listeriosis (CDC, 2017). Aunque no es un patógeno con una gran cantidad de enfermos es importante en la inocuidad de alimentos debido a la tolerancia cero que se tiene de este microorganismo en cualquier alimento (Gombas *et al.*, 2003; CDC, 2013).

En Estados Unidos *L. monocytogenes* se ha aislado principalmente de alimentos listos para consumir, en algunos estudios se han encontrado hasta 2 Log (UFC/g) en ensaladas, esta población no cambió a pesar de la estación del año en que se tomaron las muestras (Gombas *et al.*, 2003; Sant'Ana *et al.*, 2012). Este microorganismo se ha aislado con mayor frecuencia del ambiente de producción que de las mismas granjas (Kathariou, 2002, Ferreira *et al.*, 2013).

2.4.4 Comportamiento en hortalizas

L. monocytogenes puede desarrollar en hortalizas, esto depende de la temperatura de almacenamiento y de la microbiota que se encuentre presente, la cual puede afectar a este microorganismo y no permitir que se adhiera a la superficie de las hortalizas (Delaquis *et al.*, 2011; Sant'Ana *et al.*, 2012).

Este microorganismo tiene la capacidad de desarrollar en alimentos refrigerados y que además se encuentran listos para su consumo como algunas hortalizas que forman parte de ensaladas preparadas (Kathariou, 2002; Sant'Ana *et al.*, 2012).

2.4.5 Listeriosis

Esta enfermedad puede ocurrir en individuos sanos, aunque la mayoría de las veces ocurre en niños, adultos mayores o personas inmunocomprometidas , como mujeres embarazadas (Ferreira *et al.*, 2013).

Se manifiesta como septicemia, meningitis y de manera general infecciones en el sistema nervioso central y en el caso de mujeres embarazadas puede causar aborto espontáneo o muerte fetal (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Knabel *et al.*, 2012).

Entre los síntomas más comunes se encuentra la fiebre y la diarrea, pero este tipo de listeriosis difícilmente es diagnosticada. Cuando el patógeno ya coloniza el intestino dependerá del estado de la persona los síntomas que presentará (Ferreira *et al.*, 2013):

En mujeres embarazadas: se presentan síntomas similares a la gripe, como fiebre, fatiga y dolor muscular. Sin embargo, como ya se ha mencionado puede ocasionar aborto, parto prematuro o infecciones en el neonato.

Mujeres no embarazadas e individuos en general: los síntomas pueden ser fiebre, dolor muscular dolor de cabeza, de cuello, confusión, pérdida del equilibrio y convulsiones.

Los individuos con listeriosis invasiva reportan síntomas de 1 a 4 semanas después del consumo del alimento contaminado con *L. monocytogenes*, inclusive pueden tardar hasta 70 días después de la exposición (Ferreira *et al.*, 2013).

2.5 Lavado y desinfección de hortalizas

2.5.1 Generalidades

El lavado es una de las primeras operaciones del procesamiento de frutas y hortalizas. En pequeña escala, esta actividad se realiza en agua que circula o en agua estática que se reemplaza periódicamente. Esta operación consiste en eliminar la suciedad que se encuentra en la superficie del fruto. El lavado debe llevarse a acabo con agua limpia, y si es posible con la adición de hipoclorito de sodio a 10 ppm, asimismo se recomienda un tallado para eliminar la suciedad (FAO,1993; Shen *et al.*, 2012).

La desinfección consiste en reducir el número de microorganismos presentes en las frutas y hortalizas, así como en los utensilios que entran en contacto con las mismas, por medio de agentes químicos o métodos físicos, a un nivel que minimice los riesgos a la salud del consumidor (NOM-EM-034-FITO-2000). El lavado debe preceder al proceso de desinfección para favorecer una mayor eficiencia en la inactivación de los microorganismos.

Se han estudiado una gran cantidad de productos de desinfección para frutas y hortalizas, entre los cuales se encuentran: cloro, agua electrolizada (ácida, alcalina o neutra), ácidos orgánicos, biocontrol con bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras, ozono e irradiación (Newell *et al.*, 2010; Olaimat *et al.*, 2012).

Gurtler *et al.* (2012) compararon tratamientos antimicrobianos en jitomates, observando un reducción de 2.5 Log (200 ppm de HOCl, pH 6,5), 1.3 Log (87 ppm ácido peracético), 3.7 Log (1200 ppm cloruro de sodio acidificado, pH 2.5) y 5.6 Log CFU/tomate (ClO₂/1 h) de *Salmonella* spp.

La eficacia del proceso de desinfección depende de cuatro factores (Fernández, 2008; Shen *et al.*, 2013): el tipo y número de microorganismos, el

sustrato en el cual se encuentran, la estructura del material (el cual debe permitir el acceso directo del germicida sobre los microorganismos) y la concentración, tiempo de contacto y temperatura a la cual se aplica el germicida.

La adhesión microbiana puede causar la formación de biopelículas, la cual es una fuente de contaminación que deteriora alimentos y puede provocar la transmisión de enfermedades, asimismo, los microorganismos que se encuentran adheridos son difíciles de eliminar mediante desinfección (de Oliveira *et al.*, 2010; Corcoran *et al.*, 2014).

2.5.2 Cloro

El cloro es una sustancia de amplio uso debido a su eficacia, y su bajo costo a pesar de que puede formar trihalometanos, los cuales son compuestos carcinogénicos (López-Velasco *et al.*, 2012). En productos listos para su consumo se utilizan en una concentración de 50 a 200 ppm, con un tiempo de contacto de 1-2 min (Beuchat *et al.*, 1998).

La actividad desinfectante de esta sustancia depende de la cantidad de cloro libre, en forma de ácido hipocloroso (HOCl) que se encuentra presente en el agua, y que entra en contacto con las células bacterianas. La disociación del HOCl depende del pH y de que entre en contacto con material orgánico, asimismo, pierde su actividad al estar expuesto al aire, luz, metales y cuando se encuentra en contacto con materia orgánica (Estrela *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2013).

Una desventaja del uso del cloro es que reacciona con la materia orgánica produciendo compuestos tóxicos como cloroformo, cloraminas y trihalometanos, es la razón por la cual en algunos países europeos se ha restringido su uso (Mukhopadhyay *et al.*, 2014).

2.5.3 Agua electrolizada

El agua electrolizada se genera por la electrólisis de una solución diluida de NaCl que pasa por una cámara cuyos electrodos separados por una membrana semipermeable (Figura 2.1). Cuando existe esta membrana se forman dos tipos de agua. En el lado del ánodo se forma el agua electrolizada ácida (AEW) con un valor de pH de 2.3-2.7, conteniendo cloro libre (HOCL y OCL-) y teniendo un potencial de óxido reducción alto (ORP; >1100 mV). Por otro lado, se forma el agua electrolizada alcalina con un pH 11-11.7, un bajo ORP (-800 to -900 mV) y no se forma cloro libre. En el caso de la electrólisis sin la membrana, se forma agua electrolizada neutra (EW), la cual tiene un pH de 8.0-8.5, ORP de 650-750 mV y se forma cloro libre (Len *et al.*, 2002; Gómez-López *et al.*, 2015).

En esta sustancia existe el equilibrio de las distintas especies (gas de cloro, ácido hipocloroso e hipoclorito), aunque prevalece la presencia del ácido hipocloroso, que es la forma con mayor actividad antimicrobiana; además el equilibrio del agua electrolizada neutra depende del pH y no de la concentración inicial de la solución de NaCl (Abadias *et al.* 2008; Gómez-López *et al.*, 2015).

Se ha comprobado que la aplicación de agua electrolizada en productos frescos no afecta la epidermis del producto, ni la apariencia de su superficie o la aceptación del consumidor (Deza *et al.*, 2003; Vázquez-López *et al.*, 2016); además tiene la ventaja de no ser corrosiva, por ello es más seguro y fácil de manejar. Se han observado reducciones de hasta 6 Log (UFC/g) de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. con agua electrolizada neutra en ensaladas de hojas verdes (Ignat, 2015).

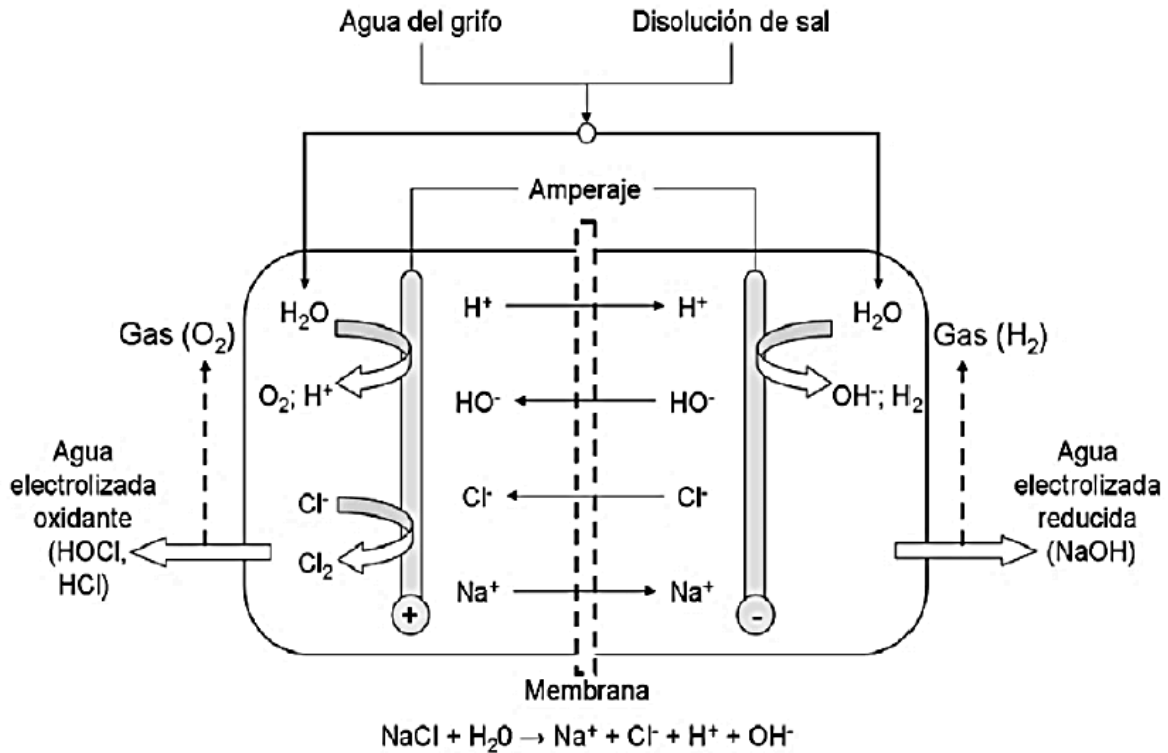


Figura 2.1 Electrólisis de la solución de NaCl para la generación de agua electrolizada ácida y alcalina.

2.5.4 Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son considerados ácidos débiles, esto significa que no se disocian completamente en el agua, pero que si lo hacen a niveles de pH inferiores a 7 (Taylor *et al.*, 2012).

La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos está relacionada con el pH del alimento, el cual debe de ser menor que el pKa del ácido para que la molécula no se disocie. El pKa se define como la constante de disociación del ácido. La reducción en el pH resulta en una mayor concentración del ácido protonado, disminuyendo la polaridad de la molécula y aumentando la difusión del ácido a través de la membrana hacia el citoplasma. La sustitución de un protón donable, por un catión monovalente (Na⁺, K⁺) o multivalente (Ca²⁺) aumenta la solubilidad de los ácidos orgánicos en sistemas acuosos. Pero debe hacerse un

balance entre la necesidad de mantener la solubilidad del ácido y el mantener la actividad por la reducción del pH (Taylor *et al.*, 2012).

El efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos tiene dos mecanismos de acción (Taylor *et al.*, 2012): por la acidificación del citoplasma con un subsecuente desacoplamiento de producción y regulación de energía, y por la acumulación de aniones ácidos disociados hasta niveles tóxicos.

La difusión de un ácido disociado a través de la membrana microbiana en un alimento, donde el pH del citoplasma celular es mayor al pH que se encuentra en el ambiente, favorece el establecimiento de un gradiente transmembranal (Gould, 1989; Davidson *et al.*, 2013).

Cuando el ácido protonado se difunde a través de la membrana, el ambiente alcalino que encuentra favorece su disociación en un anión y un protón libre. La célula reaccionará tratando de eliminar el protón, cambiando el protón por otro catión. Se propone que la membrana microbiana es impermeable a protones, requiriendo un transporte activo para sacar los protones y mantener un pH que permita mantener la homeostasis en el interior de la célula (Mani-López *et al.*, 2011; Davidson *et al.*, 2013).

Al cambiar el pH intracelular, por la presencia de ácidos orgánicos a niveles elevados, cambia la actividad enzimática óptima, la síntesis de proteínas, ADN y ARN, así como la producción de energía (Mani-López *et al.*, 2011; Davidson *et al.*, 2013).

2.6 Factores que intervienen en la eficacia de la desinfección

Existen una serie de factores que afectan la eficacia del desinfectante, primero la estructura del alimento, la cual afecta la forma en que el desinfectante entra en contacto con el microorganismo debido a que éste puede ser protegido

por el mismo. La concentración, tiempo de contacto y temperatura a la cual se aplica el desinfectante, estos factores pueden afectar o bien incrementar el efecto antimicrobiano de algunos desinfectantes. Algunos microorganismos son más susceptibles a algunos desinfectantes, esto dependiendo del modo de acción del mismo, asimismo es importante la carga microbiana del alimento, debido a que mayor carga microbiana no se obtendrá una desinfección adecuada. La adhesión microbiana también interviene en la eficacia de los desinfectantes y es que las células que pudieran estar adheridas fuertemente a los alimentos o superficies son más difíciles de desprender y eliminar (Newell *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2013).

2.6.1 Adhesión microbiana

La adhesión de microorganismos a superficies de hortalizas o superficies inertes causa que estas células estén sometidas a estrés lo cual puede producir la formación de una biopelícula con la consecuente resistencia al estrés ambiental así como resistencia a antimicrobianos (Young *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2013).

Con el fin de adherirse a las superficies vegetales, *Salmonella* puede usar una combinación de celulosa, flagelo, incluso su antígeno-O (Silagyi *et al.*, 2009; Corcoran *et al.*, 2014).

La presencia de sustancias extracelulares puede influir en la hidrofobicidad y carga de las células bacterianas (Ryu *et al.*, 2004, Chamdit *et al.*, 2014). Las bacterias que poseen características hidrofóbicas pueden adherirse a la cutícula de la planta que está compuesta por ácidos grasos, polisacáridos y ceras (Di Ciccio *et al.*, 2015). En caso de que existiera una herida en el fruto, ésta podría exponer nutrientes que la bacteria puede utilizar para colonizar. En la superficie del fruto los microorganismos epifitos pueden encontrarse en microcolonias o biopelículas, ya se ha demostrado que *Salmonella* puede sobrevivir un mayor tiempo cuando se asocia a otras bacterias (Warner *et al.*, 2008; Corcoran *et al.*, 2014).

Liao *et al.* (2000), observaron la reducción de *Salmonella* Chester de 1-2 Log en discos de manzana tratados con peróxido de hidrógeno, hipoclorito de calcio e hipoclorito de sodio, debido a la adhesión de la bacteria en las superficies y al desarrollo de la resistencia a desinfectantes.

2.7 Resistencia a Rifampicina

En estudios de desinfección y de comportamiento de microorganismos patógenos en alimentos es común el uso de cepas resistentes a rifampicina, esto con el fin de poder cuantificar el microorganismo inoculado de los que pudieran encontrarse en la matriz alimentaria.

Cuando un microorganismo cuenta con la resistencia a algún antibiótico, ésta puede afectar el proceso fisiológico normal (Wichelhaus *et al.*, 2002), debido a que se alteran secuencias conservadas en su código genético, comprometiendo la eficiencia de la transcripción y causando una reducción en el “fitness” de la célula (Bjorkman *et al.*, 2000; Colicchio *et al.*, 2015).

Entre los cambios que se han observado en las cepas resistentes a rifampicina se encuentran: una tasa de crecimiento reducida, poca invasividad y pérdida de la virulencia (Korsak *et al.*, 2016). Pocos estudios se han realizado con el fin de observar si existen diferencias en el uso de cepas resistentes con su contraparte no resistente.

La rifampicina se une a la ARN polimerasa bacteriana y previene la iniciación de la transcripción, pero no inhibe la transcripción después de la eliminación del promotor. En todas las bacterias, las mutaciones relacionadas con la resistencia a rifampicina están relacionadas con el cambio de aminoácidos que unen al antibiótico con la RNA polimerasa y están agrupadas en tres diferentes sitios: conglomerado I, II y III, que se encuentran en el segmento central de la cadena de la ARN polimerasa (Jin *et al.*, 1988; Korsak *et al.*, 2016).

De hecho, en *Escherichia coli* se ha visto una relación directa entre el costo del “fitness” de la mutación del gen *rpoB* y sus efectos en la transcripción, de manera particular la RNA polimerasa cambió sus propiedades durante la elongación (Colicchio *et al.*, 2015)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el comportamiento de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* débil y fuertemente adheridas a jitomate cherry y su tolerancia a diversos desinfectantes.

3.2 Objetivos específicos

1. Comparar el comportamiento de cepas de *Salmonella* y *L. monocytogenes* resistentes y no resistentes a rifampicina ante la concentración de nutrientes, NaCl, pH y desinfectantes.
2. Estudiar el comportamiento de células de *Salmonella* y *L. monocytogenes* adheridas a jitomate cherry almacenados a 4 y 22°C.
3. Evaluar la eficacia de la aplicación de hipoclorito de sodio y agua electrolizada sobre células de *Salmonella* y *L.monocytogenes* débil y fuertemente adheridas a jitomate cherry.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiales

4.1.1 Material biológico

Jitomate *cherry* obtenido de mercados públicos establecidos en la ciudad de Querétaro, Querétaro.

Todas las cepas utilizadas en este estudio pertenecen al cepario del Laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, y son las siguientes:

Cepas de *Salmonella enterica*:

- *Salmonella* sp. (A)
- *S. Enteritidis* ATCC 13016 (B)
- *S. Thompson* ATCC 8391 (E)
- *S. Montevideo* ATCC 8381 (F)

Cepas de *Listeria monocytogenes*:

- *L. monocytogenes* ATCC 19115 (A)
- *L. monocytogenes* LCDC (B)
- *L. monocytogenes* 389 (C)
- *L. monocytogenes* Scott A (D)

4.1.2 Equipo

- Bioscreen C Analyzer, Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki
- Agitador mecánico Vortex, Velp Scientifica, no. 113123
- Autoclave eléctrica de mesa, Market-Forge, Mod. 199-85
- Campana de flujo laminar, Alder, Veco

- Homogeneizador Stomacher Laboratory Blender, Mod. 400 (BA 7021)
- Incubadoras de precisión, Precision Scientific
- Material de uso común en el laboratorio de microbiología
- Micropipetas 1-1000, Labsystems, Brand, Genex Beta, Rainin, Gilson
- Potenciómetro, Jenway, 3510 pH Meter
- Sonicator, E-Chrom Tech Co., Ltd., Modelo: UC-5150B(H), Capacidad: 6 L, Frecuencia ultrasonido: 40/60 Khz
- Refrigerador Imbera

4.1.3 Medios de cultivo

- Agar sulfito-bismuto (SB), (BD, Bioxon)
- Agar hierro lisina (LIA), (BD, Bioxon)
- Agar hierro triple azúcar (TSI), (BD, Bioxon)
- Peptona de caseína (BD, Bioxon)
- Caldo soya tripticaseína (CST) (BD, Bioxon)
- Agar soya tripticaseína (AST) (BD, Bioxon)
- Caldo neutralizante D/E (CN) (Acumedia)
- Agar xilosa-lisina-desoxycolato (XLD, Bioxon)

4.1.4 Reactivos

- Diluyente de peptona (0.1%) (DP) (Bacto)
- Solución salina fisiológica (0.85%)
- Tiosulfato de sodio (0.01 N)
- Hidróxido de sodio (0.1 N)
- Yoduro de potasio
- Almidón
- Cloruro de sodio (NaCl)

4.1.5 Desinfectantes

- El agua electrolizada neutra (EW) se recibió en el laboratorio y se almacenó en un lugar oscuro y a temperatura ambiente por no más de cuatro semanas. El EW fue producida por electrólisis en una máquina manufacturada por Esteripharma S.A. de C.V. Características indicadas en el empaque: [cloro libre]= 60 mg/L, pH=7, ORP= 800-900 mV en presentación de 20 L.
- El hipoclorito de sodio (NaOCl) (Cloralex®) fue adquirido en supermercados de la ciudad de Querétaro. Presentación de 500 mL.
- El ácido acético comercial fue adquirido en supermercados de la ciudad de Querétaro. La marca usada fue Clemente Jacques®, las características indicadas en el empaque: en presentación de 500 ml.

4.2 Métodos

4.2.1 Estudios del comportamiento de *Salmonella* y *L. monocytogenes in vitro*

4.2.1.1 Selección de las cepas resistentes a rifampicina

Las cepas de *Salmonella* y *L. monocytogenes* se activaron en 3 ml de CST y se incubaron a 35°C durante 24 h. Posteriormente, una alícuota (40 µl) se colocó en CST conteniendo rifampicina (10 ppm). En un total de cinco resiembras sucesivas se incrementó gradualmente la concentración del antibiótico (10, 50, 100, 150 y 200 ppm) hasta llegar a 200 ppm. Con el fin de reconocer que las cepas fueran puras se sembraron en AST donde se observó que las colonias tuvieran una morfología similar. Asimismo, para las cepas de *Salmonella* se sembraron en AST y en SB para posteriormente hacer pruebas bioquímicas (TSI y LIA) que nos aseguraron que las cepas fueran este microorganismo. Para las cepas de *L. monocytogenes* se sembró en agar Oxford para asegurar que las cepas fueran esta bacteria.

4.2.1.2 Activación y lavado de las cepas

Las cepas se colocaron individualmente en 3 mL de CST con rifampicina (200 ppm) para las cepas resistentes y en CST sin rifampicina para las cepas no resistentes y se incubaron a 35 °C durante 24 h, este procedimiento se realizó durante tres días consecutivos. Después de la activación se centrifugó 1 mL de cada cepa a 12 000 rpm durante 2 min, se deshechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 1 mL de SSI, este procedimiento se realizó dos veces más. Posterior al lavado de cepas se hizo un recuento del inóculo, donde se hicieron diluciones decimales y se sembraron alícuotas en AST + rifampicina y se incubaron a 35 °C por 24 h.

4.2.1.3 Evaluación del desarrollo en diferentes concentraciones de nutrientes, NaCl y niveles de pH.

En placas de 100 pozos se distribuyó CST diluido (0.1, 1 y 10%), CST con NaCl (1, 1.5 y 2 %) y CST con diferente pH (4, 5 y 6); como control se usó CST sin diluir, con una concentración de NaCl de 0.5% y pH = 7 (Figura 4.1)

Posteriormente, se inocularon individualmente alícuotas de los cultivos activados y lavados de las ocho cepas de *Salmonella* o *L. monocytogenes* a una concentración de 5 log UFC/fosa.

La placa se introdujo al equipo automatizado bioscreen y se incubó por 24 h a 35 °C, el equipo realizó mediciones de densidad óptica (DO) a 600 nm cada 20 min. Al finalizar el ensayo, el equipo reportó la densidad óptica máxima (DO max) y tiempo de detección de cada combinación de condición y cepa. Para las cepas de *L. monocytogenes* se estimó la velocidad específica de desarrollo empleando el modelo de Baranyi y Roberts con el programa informático DMFIT 3.5 (www.combase.cc).

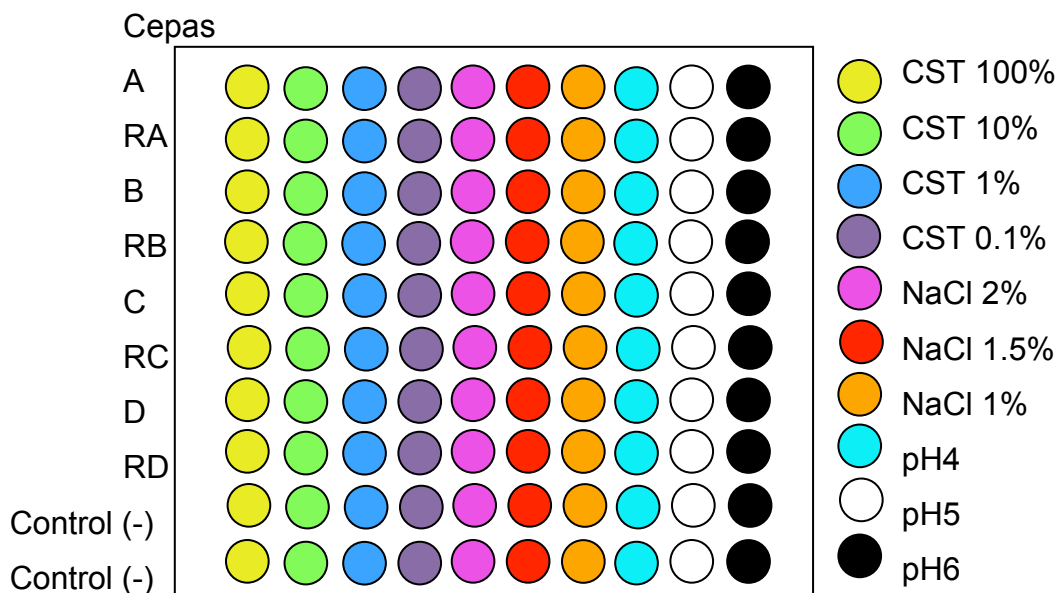


Figura 4.1 Distribución de los medios de cultivo de *Salmonella* y *L. monocytogenes*.

4.2.1.2 Evaluación de la tolerancia a desinfectantes

Cada cepa activada y lavada fue inoculada (7 Log UFC/mL) en hipoclorito de sodio (NaOCl) a 30 ppm, ácido acético comercial (2 % para *Salmonella* y 4 % para *L. monocytogenes*), agua electrolizada neutra a 28 ppm y agua destilada estéril como control. Después de 1 min de exposición, se colocaron 100 µl de la suspensión con el desinfectante en 9 ml de caldo neutralizante, se homogenizó y se realizaron diluciones decimales en diluyente de peptona. Alícuotas de 100 µl se sembraron por extensión en superficie en AST y se incubaron a 35 °C por 24 h. Se calculó la reducción de la población con respecto al agua (Figura 4.2).

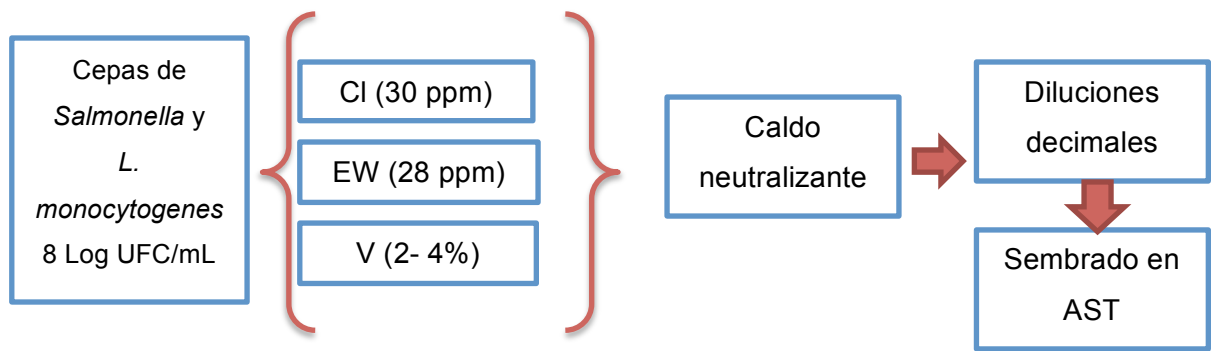


Figura 4.2 Diagrama de la evaluación de la tolerancia de cepas de *Salmonella* y *L. monocytogenes* (resistentes y no resistentes a rifampicina) ante cloro (Cl) agua electrolizada (EW) y vinagre (V).

4.2.2 Desinfección de CDA en jitomate *cherry* (sin almacenamiento)

Previo a los estudios de comportamiento y desinfección de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en jitomate *cherry* almacenados se hicieron estudios de la susceptibilidad a desinfectantes en jitomate *cherry* que no fue sometido a almacenamiento inoculado con *Salmonella* o *L. monocytogenes*.

4.2.2.1 Activación y lavado de cepas

Las cepas se colocaron individualmente en 3 ml de CST con rifampicina (200 ppm) y se incubaron a 35° C durante 24 horas, este procedimiento se realizó durante tres días consecutivos. Después de la activación se centrifugó 1 mL de cada cepa a 12 000 rpm durante 2 min, se deshechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 1 mL de SSI, este procedimiento se realizó dos veces más.

4.2.2.2 Preparación del inóculo

De cada cepa de *Salmonella* spp. se combinaron volúmenes iguales para elaborar la mezcla a inocular, posteriormente se hicieron diluciones decimales en SSI hasta llegar a una concentración de aproximadamente 6 Log UFC/mL.

4.2.2.3 Inoculación de jitomate *cherry*

Se inocularon tres jitomates (9 Log UFC/g) con una mezcla de cepas de *Salmonella* o *L. monocytogenes*, se secaron durante 40 min y se colocaron en bolsas de polietileno. Se realizó un recuento del inóculo para lo cual se tomó una alícuota, se hicieron diluciones decimales en DP y se sembró en AST + rifampicina (200 ppm).

4.2.2.4 Evaluación de los desinfectantes

Se colocó un volumen de cada desinfectante equivalente al peso en gramos de la unidad experimental (3 jitomates): hipoclorito de sodio (NaOCl) a 60 ppm, Agua electrolizada neutra (EW) a 60 ppm ó agua destilada estéril como control. Después de transcurrir 1 min se colocaron en caldo neutralizante.

4.2.2.5 Recuento de *Salmonella* y *L. monocytogenes* posterior a los tratamientos

La reducción de *Salmonella* y de *L. monocytogenes* para los estudios de desinfección se estimó obteniendo la diferencia entre la concentración del patógeno en los jitomates tratados con los diferentes desinfectantes y los no tratados (posterior al secado).

4.2.3 Comportamiento de *Salmonella* y *L. monocytogenes* adheridas en jitomate *cherry*

4.2.3.1 Activación de las cepas y lavado de cepas

Las cepas se colocaron individualmente en 3 ml de CST con rifampicina (200 ppm) y se incubaron a 35° C durante 24 horas, este procedimiento se realizó durante tres días consecutivos. Después de la activación se centrifugó 1 mL de cada cepa a 12 000 rpm durante 2 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 1 mL de SSI, este procedimiento se realizó dos veces más.

4.2.3.2 Preparación del inóculo

De cada cepa de *Salmonella* spp. se combinaron volúmenes iguales para elaborar la mezcla a inocular, posteriormente se hicieron diluciones decimales en SSI hasta llegar a una concentración de aproximadamente 6 Log UFC/mL.

4.2.3.3 Inoculación del jitomate *cherry*

Se colocaron grupos de tres jitomates en tapas de cajas de Petri en la campana de flujo laminar y se inocularon en la superficie de los tres jitomate 10 gotas de 10 µl para alcanzar una concentración final de 6 Log por unidad experimental (tres jitomates) y se dejaron secar por 20 min. El mismo procedimiento se realizó para *L. monocytogenes*.

4.2.3.4 Almacenamiento de los jitomates *cherry* inoculados.

Los jitomates *cherry* inoculados se almacenaron en bolsas de polietileno sin cerrar por completo en dos condiciones: a 4 °C por 5 días y a 22 °C por 7 días

en incubadoras de precisión refrigeradas. Periódicamente se analizaron tres muestras constituidas por tres jitomates cada una.

4.2.3.5 Cuantificación de CDA

Las CDA fueron aquellas células que se desprendieron después del masajeo realizado en DP para lo cual se realizó el siguiente procedimiento:

Se pesaron las bolsas con los tres jitomates y se colocó un volumen de DP equivalente al peso en gramos del producto y se masajearon durante 1 min. De la suspensión se hicieron diluciones decimales en DP y se sembraron alícuotas de diluciones seleccionadas en AST + rifampicina (200 ppm). Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h.

4.2.3.6 Cuantificación de CFA

Las CFA fueron aquellas células que no se desprendieron después del masajeo en DP, por lo tanto se colocaron en el sonicador para su desprendimiento y se siguió el siguiente procedimiento:

Se extrajeron los jitomates del DP mencionado anteriormente (sección 4.2.3.5) y se colocaron nuevamente en un volumen de DP equivalente al peso en gramos del producto y se colocaron en el sonicador durante 8 minutos a la máxima potencia. De la suspensión se hicieron diluciones decimales en DP y se sembraron alícuotas de diluciones seleccionadas en AST + rifampicina (200 ppm). Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h (Figura 4.3).

De acuerdo a los procedimientos realizados, el término de CDA agrupa a las células débilmente adheridas y también a aquellas células que podrían encontrarse solamente depositadas sin estar adheridas a la superficie del fruto.

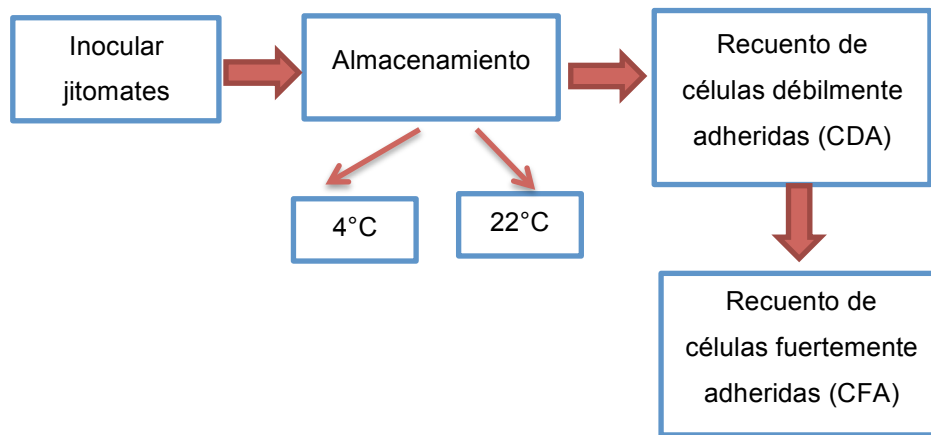


Figura 4.3 Diagrama del comportamiento de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en jitomate *cherry*.

4.2.3.7 Selección de condiciones del sonicador para el recuento de CFA

Para definir las condiciones bajo las cuales se recuperarían las CFA sin afectar su viabilidad se hicieron evaluaciones preliminares. Para ello se inocularon tres jitomates (9 Log UFC/g) con una mezcla de cepas de *Salmonella*, se secaron durante 40 min y se colocaron en bolsas con DP en una proporción p/v.

4.2.3.7.1 Recuento de células débilmente adheridas (CDA)

Se pesaron las bolsas con los tres jitomates y se colocó un volumen de DP equivalente al peso en gramos del producto y se masajearon durante 1 min. De la suspensión se hicieron diluciones decimales en DP y se sembraron alícuotas de diluciones seleccionadas en AST + rifampicina (200 ppm). Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h.

4.2.3.7.2 Recuento de células fuertemente adheridas (CFA)

Después de masajear los jitomates se tomaron con pinzas y se colocaron en otra bolsa con el mismo volumen de DP para el recuento de las células adheridas. Las bolsas se colocaron en el sonicador en las condiciones mencionadas (Tabla 4.1). De las suspensiones se tomó una alícuota y se hicieron diluciones decimales en DP y se sembró en AST+rifampicina (200 ppm). Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h.

Tabla 4.1 Condiciones de uso del sonicador

Tiempo (min)	Potencia
1	Alta
5	
8	
1	Baja
5	
8	

4.2.4 Evaluación de la tolerancia a la desinfección de *Salmonella* y *L. monocytogenes* adheridas a jitomate cherry

4.2.4.1 Preparación de desinfectantes

Los desinfectantes se prepararon el mismo día del experimento. Para obtener las soluciones de cloro, EW y vinagre se utilizó agua destilada estéril para tener una concentración de cloro libre de 30 y 60 ppm para el NaOCl; para el EW se utilizó el producto directamente (60 ppm) y se realizó una dilución 1:2 para tener 30 ppm. En el caso del viangre, se empleó a 4 % para *L. monocytogenes* (sin diluir) y con una dilución 1:2 (2 %) para *Salmonella*. Antes de su uso las

concentraciones se verificaron. Se midió el pH ,la concentración de cloro libre y acidez titulable, según el caso. Los procedimientos utilizados se describen en el Anexo 1.

4.2.4.2 Desinfección de CDA y CFA en jitomate *cherry*

Los jitomates almacenados a 22 °C por 5 días y a 4 °C por 7 días fueron sumergidos en los desinfectantes por 1 min: NaOCl (56 ppm) y EW (56 ppm). El control consistió en la exposición a agua estéril.

4.2.4.2.1 Recuento de células débilmente adheridas (CDA)

Se pesaron las bolsas con los tres jitomates y se colocó un volumen de DP equivalente al peso en gramos del producto y se masajearon durante 1 min. De la suspensión se hicieron diluciones decimales en DP y se sembraron alícuotas de diluciones seleccionadas en AST + rifampicina (200 ppm). Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h.

4.2.4.2.3 Recuento de células fuertemente adheridas (CFA)

Después de masajear los jitomates se tomaron con pinzas y se colocaron en otra bolsa con el mismo volumen de DP para el recuento de las células adheridas. Las bolsas se colocaron en el sonicador durante 8 min a la máxima potencia (estas condiciones fueron seleccionadas de los estudios preliminares). De las suspensiones se tomó una alícuota y se hicieron diluciones decimales en DP y se sembró en AST+rifampicina (200 ppm). Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h.

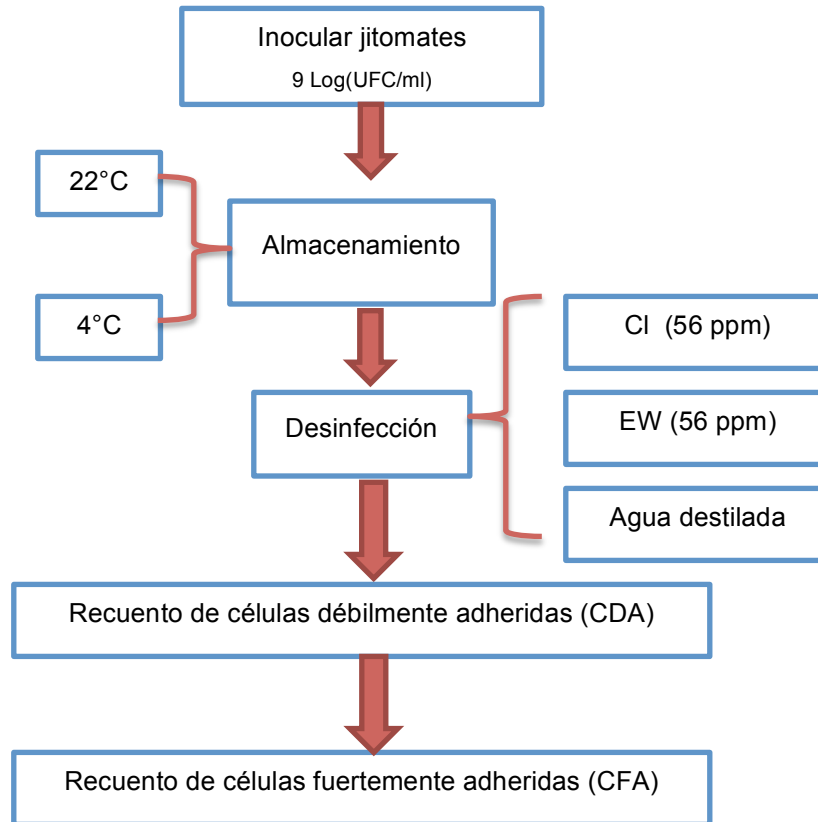


Figura 4.4 Diagrama de la evaluación de la tolerancia a la desinfección de CDA y CFA de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en jitomate cherry.

4.2.5 Diseño experimental y análisis estadístico

Se aplicó un diseño de tratamientos bifactorial con un diseño experimental completamente al azar para la selección de las condiciones del sonicador para el recuento de CFA teniendo como factores de estudio la potencia y el tiempo. Para la evaluación del comportamiento de los patógenos durante el almacenamiento de los jitomates se realizó bloqueando de acuerdo a la temperatura (4 y 22 °C); y dentro de cada bloque se aleatorizaron las muestras. Los estudios de desinfección se realizaron en un diseño completamente al azar, teniendo como único factor el tipo desinfectante aplicado. A los datos de sonicación, reducción y de comportamiento se les aplicó un análisis de varianza y la prueba de comparación

de medias de Tukey utilizando el paquete estadístico J.M.P. 8.0 (SAS Institute, Inc).

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Comparación del desarrollo de cepas de *Salmonella* y *L. monocytogenes* resistentes y no resistentes a rifampicina

5.1.1 Comparación de células en diferentes sustratos

5.1.1.1 *Salmonella* spp.

Las cepas resistentes a rifampicina son usadas en ensayos de desinfección y de comportamiento microbiano, principalmente porque esta resistencia nos permite diferenciarlas de la microbiota nativa del alimento, y por consecuencia, es posible contarla y conocer el efecto de un desinfectante, o bien, si el microorganismo desarrolló o no en determinado alimento sin el uso de un medio con inhibidores.

Las cepas de *Salmonella* resistentes y su contraparte no resistente desarrollaron de manera similar, tanto en condiciones limitantes de crecimiento (CST diluido, pH (4 y 5) y NaCl 2 %), así como en condiciones óptimas (CST sin diluir, pH 6 y NaCl 1%) (Figura 5.1).

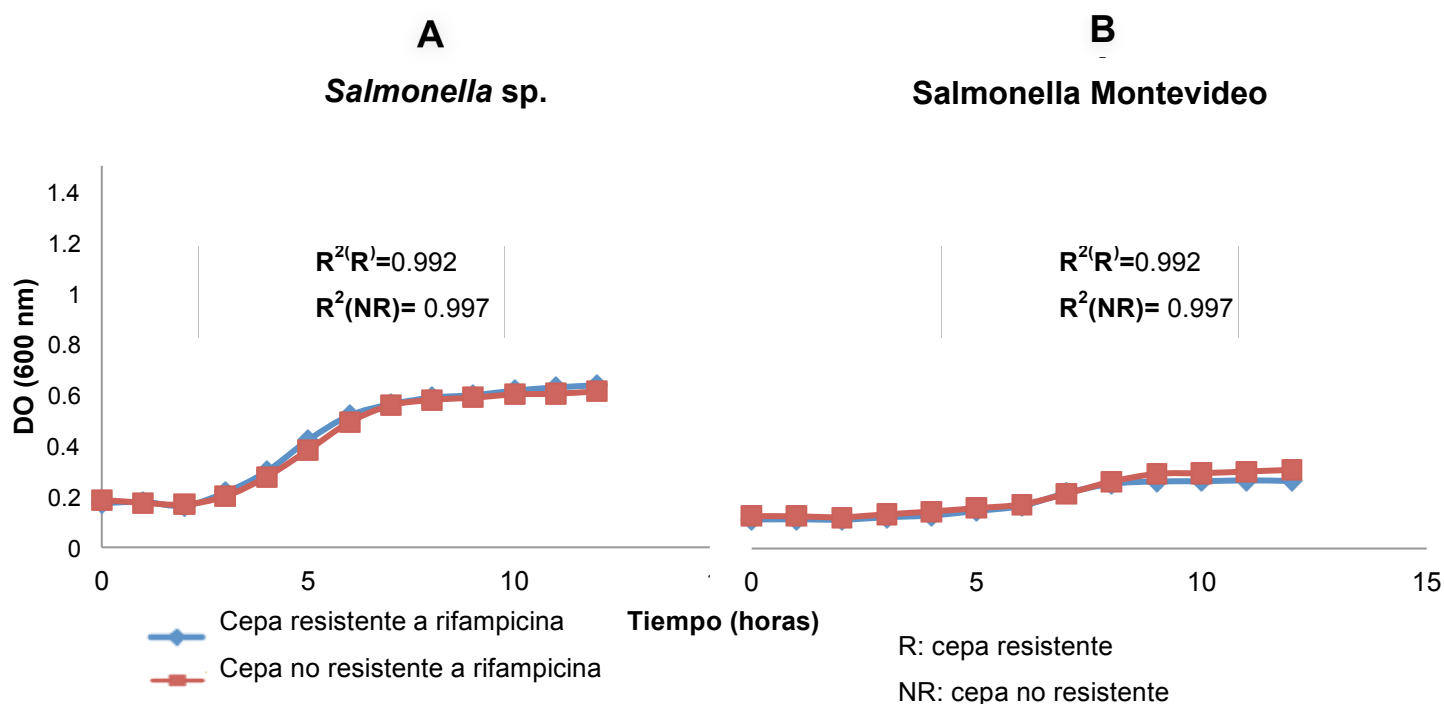


Figura 5.1 Comportamiento en medio de cultivo de células de *Salmonella* resistentes y no resistentes a rifampicina. (A) Desarrollo de *Salmonella* en CST condición óptima de desarrollo. (B) Desarrollo de *Salmonella* en CST al 0.1% condición limitante de desarrollo.

Se observó este comportamiento en las 4 cepas de *Salmonella* no resistentes y resistentes al antibiótico en condiciones de nutrientes limitados, de pH limitante y de una concentración de NaCl moderada, estudios previos han descubierto que la resistencia a rifampicina en *Salmonella enterica* promueve la mutación de otros sitios como el gen *rpoA* o *rpoC*, incluso que se han modificado otros sitios del gen *rpoB* con los cuales las células tratan de equilibrar el gasto que implica obtener la resistencia e inclusive estas mutaciones afectan regiones que pueden llegar a ocasionar que las células tengan un mejor desarrollo que las cepas que no tienen la mutación (Brandis *et al.*, 2012).

Se obtuvo el tiempo de detección de cada una de las condiciones y cepas del reporte del equipo Bioscreen (Tablas 5.1 y 5.3). Este parámetro es un indicador del tiempo que requiere el microorganismo para iniciar su desarrollo logarítmico. De manera global se observa que todas las cepas tuvieron un tiempo de detección similar para cada tipo de sustrato. En los sustratos ricos en nutrientes y con condiciones favorables se observa un tiempo de detección menor, lo que indica que tuvieron menos dificultades para desarrollar. Por otro lado, se observa que en las condiciones no favorables se tiene un tiempo de detección mayor, esto debido a que no fue fácil su desarrollo en estas condiciones.

Tabla 5.1 Tiempo de detección (h) de cuatro cepas de *Salmonella* resistentes a rifampicina y su contraparte no resistente en diferentes sustratos.

Cepa	CST				NaCl			pH		
	100%	10%	1%	0.1%	2%	1.5%	1%	4	5	6
Salmonella sp. (R)	3.0 ^a	3.5 ^a	9.3 ^a	23.3 ^a	2.9 ^a	3.2 ^a	3.2 ^a	9.2 ^a	3.6 ^a	3.1 ^a
Salmonella sp.	3.4 ^a	3.2 ^a	10.1 ^a	23.3 ^a	2.5 ^a	3.6 ^a	3.6 ^a	9.5 ^a	3.0 ^a	3.7 ^a
ATCC (R)	2.7 ^a	3.5 ^a	10.1 ^a	23.3 ^a	3.6 ^a	3.1 ^a	3.3 ^a	6.9 ^a	3.7 ^a	3.0 ^a
ATCC	2.6 ^a	3.5 ^a	10.2 ^a	23.3 ^a	4.0 ^a	3.4 ^a	3.5 ^a	6.6 ^a	4.2 ^a	3.4 ^a
S. Thompson (R)	2.5 ^a	3.7 ^a	10.5 ^a	23.3 ^a	3.9 ^a	3.4 ^a	3.5 ^a	7.0 ^a	3.3 ^a	2.2 ^a
S. Thompson	2.8 ^a	3.0 ^a	10.0 ^a	23.3 ^a	4.7 ^a	3.4 ^a	3.7 ^a	7.7 ^a	3.3 ^a	2.6 ^a
S. Montevideo (R)	2.3 ^a	3.4 ^a	9.9 ^a	23.3 ^a	3.8 ^a	3.2 ^a	3.1 ^a	7.9 ^a	3.5 ^a	2.9 ^a
S. Montevideo	2.6 ^a	4.0 ^a	9.9 ^a	23.3 ^a	4.6 ^a	3.9 ^a	3.9 ^a	7.2 ^a	4.1 ^a	3.5 ^a

Los valores se expresan como la media.

Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes acorde a la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

La comparación corresponde a la cepa resistente y su contraparte no resistente en cada una de las condiciones.

Del reporte del equipo Bioscreen también se obtuvo la densidad óptica máxima alcanzada, que corresponde al máximo crecimiento (Tabla 5.2), no se observó diferencia entre las cepas resistentes y no resistentes, con lo cual ambas cepas tuvieron un desarrollo similar.

Tabla 5.2 Densidad Óptica Máxima de cuatro cepas de *Salmonella* resistentes a rifampicina y su contraparte no resistente en diferentes sustratos.

Cepa	CST				NaCl			pH		
	100%	10%	1%	0.1%	2%	1.5%	1%	4	5	6
<i>Salmonella</i> sp. (R)	0.68 ^a	0.34 ^a	0.18 ^a	0.12 ^a	0.60 ^a	0.68 ^a	0.70 ^a	0.28 ^a	0.48 ^a	0.58 ^a
<i>Salmonella</i> sp.	0.62 ^a	0.32 ^a	0.18 ^a	0.12 ^a	0.61 ^a	0.65 ^a	0.65 ^a	0.28 ^a	0.43 ^a	0.56 ^a
ATCC (R)	0.75 ^a	0.37 ^a	0.20 ^a	0.13 ^a	0.75 ^a	0.72 ^a	0.78 ^a	0.27 ^a	0.50 ^a	0.68 ^a
ATCC	0.71 ^a	0.37 ^a	0.19 ^a	0.12 ^a	0.73 ^a	0.72 ^a	0.78 ^a	0.31 ^a	0.52 ^a	0.69 ^a
S. Thompson (R)	0.74 ^a	0.35 ^a	0.18 ^a	0.12 ^a	0.63 ^a	0.83 ^a	0.82 ^a	0.25 ^a	0.46 ^a	0.65 ^a
S. Thompson	0.72 ^a	0.26 ^a	0.16 ^a	0.14 ^a	0.65 ^a	0.83 ^a	0.82 ^a	0.19 ^a	0.46 ^a	0.62 ^a
S. Montevideo (R)	0.81 ^a	0.31 ^a	0.19 ^a	0.13 ^a	0.66 ^a	0.64 ^a	0.70 ^a	0.28 ^a	0.49 ^a	0.67 ^a
S. Montevideo	0.78 ^a	0.35 ^a	0.18 ^a	0.13 ^a	0.63 ^a	0.61 ^a	0.70 ^a	0.24 ^a	0.51 ^a	0.69 ^a

Los valores se expresan como la media.

Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes acorde a la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

La comparación corresponde a la cepa resistente y su contraparte no resistente en cada una de las condiciones

Asimismo se obtuvo la velocidad de desarrollo (Tabla 5.3) no se observó diferencia significativa en ninguna de las condiciones, esto quiere decir que desarrollaron a la misma velocidad tanto las cepas resistentes a rifampicina como las parentales.

Tabla 5.3 Estimación de la velocidad de desarrollo de *Salmonella* en diferentes condiciones de desarrollo.

Cepa	CST				NaCl			pH		
	100%	10%	1%	0.1%	2%	1.5%	1%	4	5	6
Salmonella sp. (R)	0.136 ^a	0.020 ^a	0.018 ^a	0.021 ^a	0.133 ^a	0.163 ^a	0.153 ^a	0.023 ^a	0.096 ^a	0.156 ^a
Salmonella sp.	0.118 ^a	0.022 ^a	0.018 ^a	0.023 ^a	0.140 ^a	0.181 ^a	0.183 ^a	0.028 ^a	0.103 ^a	0.162 ^a
ATCC (R)	0.176 ^a	0.048 ^a	0.021 ^a	0.025 ^a	0.132 ^a	0.157 ^a	0.169 ^a	0.032 ^a	0.071 ^a	0.170 ^a
ATCC	0.172 ^a	0.044 ^a	0.023 ^a	0.030 ^a	0.140 ^a	0.172 ^a	0.178 ^a	0.038 ^a	0.080 ^a	0.169 ^a
S. Thompson (R)	0.158 ^a	0.259 ^a	0.207 ^a	0.030 ^a	0.167 ^a	0.184 ^a	0.182 ^a	0.029 ^a	0.112 ^a	0.205 ^a
S. Thompson	0.162 ^a	0.269 ^a	0.199 ^a	0.044 ^a	0.162 ^a	0.186 ^a	0.195 ^a	0.034 ^a	0.091 ^a	0.217 ^a
S. Montevideo (R)	0.197 ^a	0.029 ^a	0.003 ^a	0.001 ^a	0.178 ^a	0.097 ^a	0.231 ^a	0.055 ^a	0.189 ^a	0.199 ^a
S. Montevideo	0.210 ^a	0.033 ^a	0.004 ^a	0.002 ^a	0.204 ^a	0.101 ^a	0.236 ^a	0.062 ^a	0.151 ^a	0.176 ^a

Los valores se expresan como la media.

Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes acorde a la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

La comparación corresponde a la cepa resistente y su contraparte no resistente en cada una de las condiciones

5.1.1.2 *L. monocytogenes*

Por otro lado, se encontró que las cepas de *L. monocytogenes* tuvieron dos comportamientos distintos, el de las cepas 389 y ATCC (Figura 5.2) donde se observa que las bacterias no resistentes tendieron a mostrar una velocidad de desarrollo ligeramente mayor a las cepas resistentes cuando se encontraban en condiciones favorables para su desarrollo, aunque esta diferencia no fue significativa ($p < 0.05$).

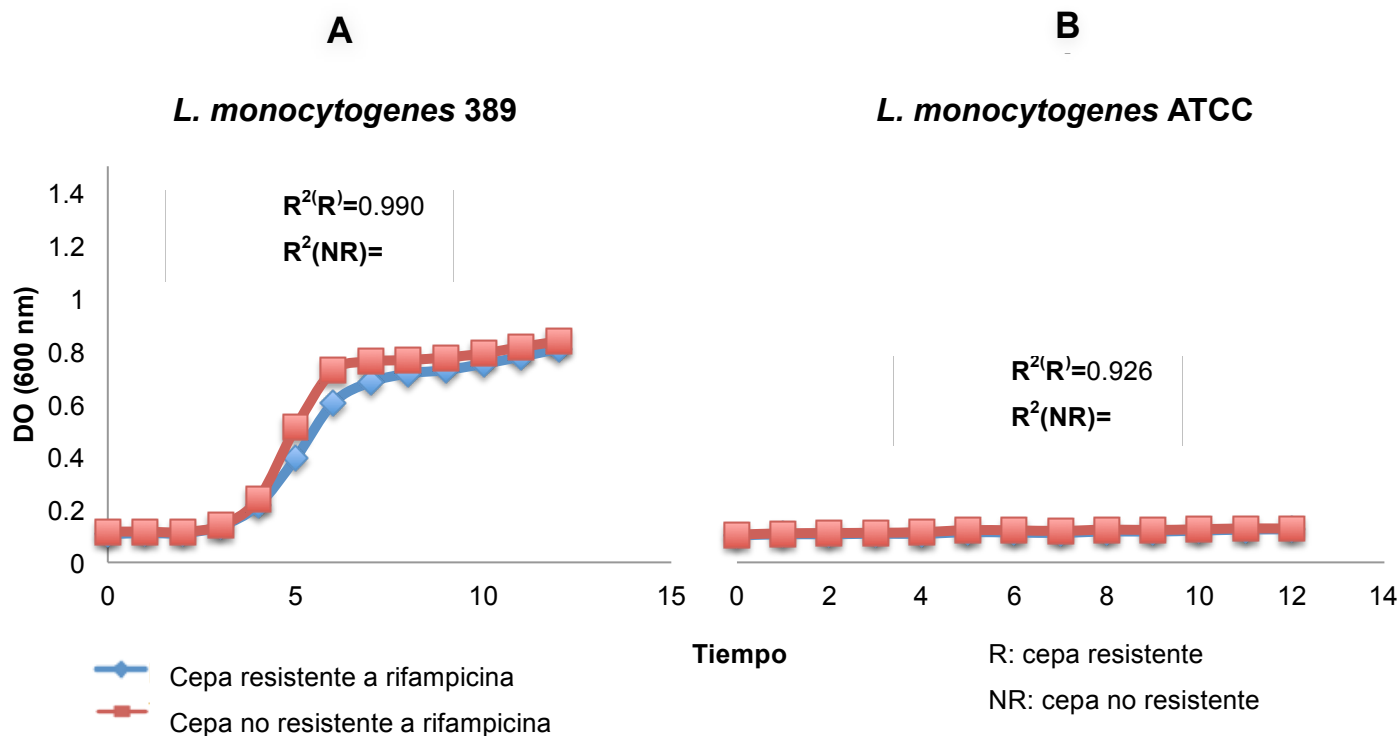


Figura 5.2 Comportamiento en medio de cultivo de células de *L. monocytogenes* resistentes y no resistentes a rifampicina. (A) Comportamiento de cepas (389 y ATCC) de *L. monocytogenes* en NaCl 1% condición óptima de desarrollo. (B) Desarrollo de *L. monocytogenes* en CST al 1% condición limitante de desarrollo.

En la Tabla 5.4, en el tiempo de detección de las cepas LCDC y Scott A se observa que el tiempo de detección diferente en todas las condiciones, excepto en la condición más limitante de nutrientes (CST 0.1%). Lo mismo se observa en la Figura 5.3, las cepas resistententes tuvieron igual o mayor desarrollo que su contraparte no resistente.

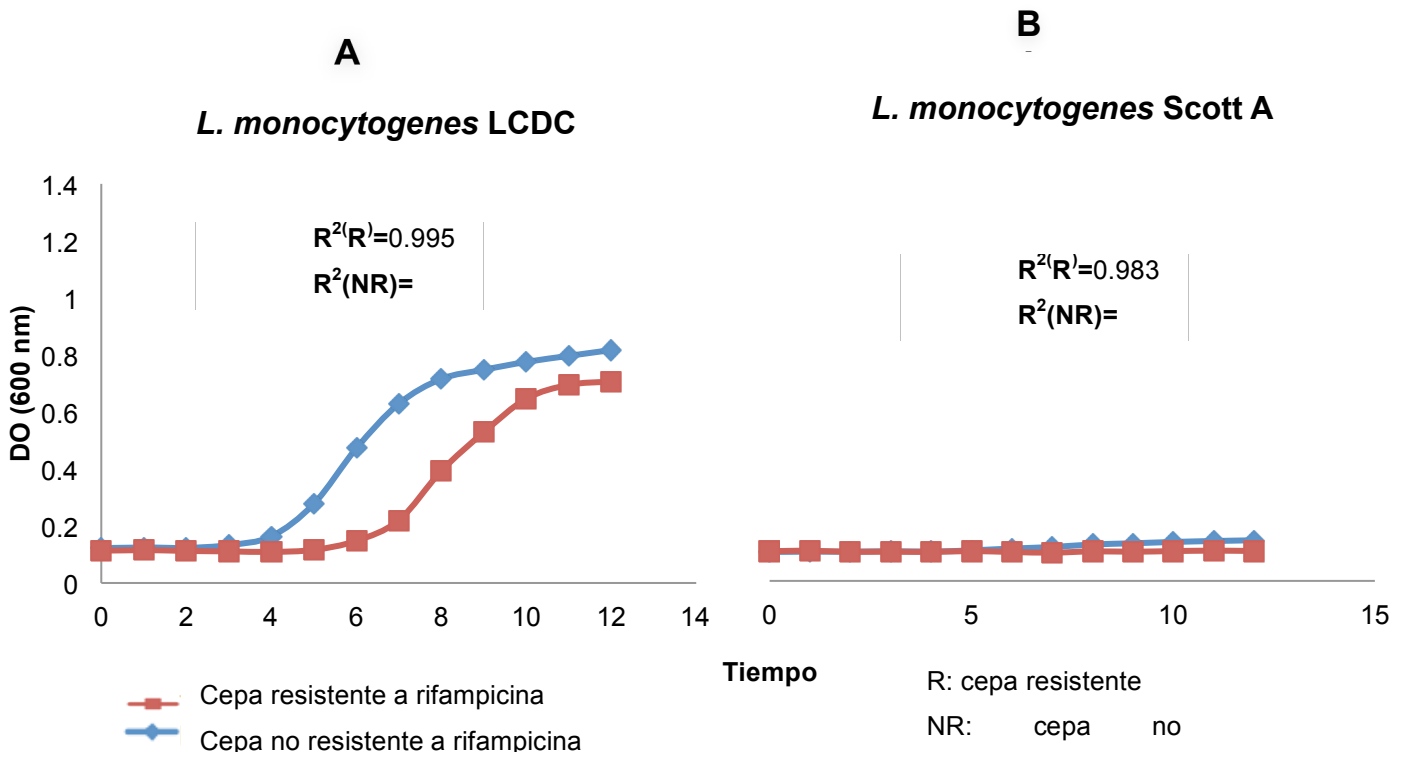


Figura 5.3 Comportamiento en medio de cultivo de células de *L. monocytogenes* resistentes y no resistentes a rifampicina. (A) Comportamiento de cepas (LCDC y Scott A) de *L. monocytogenes* en NaCl 1% condición óptima de desarrollo. (B) Desarrollo de *L. monocytogenes* en CST al 1% condición limitante de desarrollo.

En las Tablas 5.5 y 5.6 se muestran la densidad óptica máxima y la estimación de la velocidad de desarrollo, respectivamente; se puede observar que la densidad óptica máxima también fue diferente para las cepas LCDC y Scott A esto quiere decir que dado que mayor tiempo de detección más tarda el microorganismo en desarrollar, se observa que las cepas no resistentes tuvieron un mayor tiempo de detección que las resistentes. En el caso de las cepas 389 y ATCC las cepas resistentes y no resistentes tuvieron un comportamiento similar y por lo tanto llegaron a tener el mismo desarrollo y población final. Por otro lado, las cepas LCDC y Scott A mostraron que en condiciones de óptimas de desarrollo, las cepas resistentes alcanzaron una mayor desarrollo que las cepas no resistentes.

Tabla 5.4 Tiempo de detección (h) de cuatro cepas de *L. monocytogenes* resistentes a rifampicina y su contraparte no resistente en diferentes condiciones de desarrollo.

Cepa	CST				NaCl			pH		
	100 %	10%	1%	0.1%	2%	1.5%	1%	4	5	6
ATCC (R)	4.3 ^a	5.7 ^a	9.4 ^a	21.9 ^a	4.3 ^a	4.1 ^a	4.5 ^a	7.9 ^a	5.0 ^a	4.5 ^a
ATCC	3.7 ^a	5.7 ^a	9.2 ^a	21.5 ^a	3.8 ^a	3.8 ^a	3.8 ^a	7.7 ^a	5.5 ^a	4.0 ^a
LCDC (R)	3.8 ^a	4.6 ^a	11.3 ^a	22.1 ^a	3.9 ^a	3.7 ^a	3.9 ^a	9.7 ^a	4.7 ^a	4.1 ^a
LCDC	6.7 ^b	8.3 ^b	17.6 ^b	22.2 ^a	6.2 ^b	8.3 ^b	6.6 ^b	22.1 ^b	15.5 ^b	8.0 ^b
389 (R)	3.7 ^a	3.9 ^a	14.5 ^a	22.1 ^a	3.5 ^a	3.4 ^a	3.8 ^a	8.9 ^a	4.0 ^a	3.3 ^a
389	3.5 ^a	4.2 ^a	14.6 ^a	22.4 ^a	3.2 ^a	3.5 ^a	3.3 ^a	7.8 ^a	4.7 ^a	3.4 ^a
Scott A (R)	4.4 ^a	6.0 ^a	15.8 ^a	21.9 ^a	4.4 ^a	4.1 ^a	8.9 ^a	9.3 ^a	8.3 ^a	4.7 ^a
Scott A	10.9 ^b	9.6 ^b	21.4 ^b	21.9 ^a	13.9 ^b	10.6 ^b	12.3 ^b	21.9 ^b	21.2 ^b	14.0 ^b

Los valores se expresan como la media.

Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La comparación corresponde a la cepa resistente y su contraparte no resistente en cada una de las condiciones.

Tabla 5.5 Densidad óptica máxima de cuatro cepas de *L. monocytogenes* resistentes a rifampicina y su contraparte no resistente en diferentes condiciones de desarrollo.

Cepa	CST				NaCl			pH		
	100%	10%	1%	0.1%	2%	1.5%	1%	4	5	6
ATCC (R)	0.66 ^a	0.21 ^a	0.14 ^a	0.11 ^a	0.75 ^a	0.67 ^a	0.65 ^a	0.12 ^a	0.52 ^a	0.61 ^a
ATCC	0.70 ^a	0.25 ^a	0.15 ^a	0.11 ^a	0.74 ^a	0.70 ^a	0.64 ^a	0.15 ^a	0.45 ^a	0.65 ^a
LCDC (R)	0.71 ^a	0.20 ^a	0.14 ^a	0.10 ^a	0.73 ^a	0.69 ^a	0.69 ^a	0.12 ^a	0.47 ^a	0.65 ^a
LCDC	0.32 ^b	0.15 ^b	0.11 ^b	0.10 ^a	0.37 ^b	0.31 ^b	0.33 ^b	0.11 ^a	0.10 ^b	0.19 ^b
389 (R)	0.63 ^a	0.19 ^a	0.14 ^a	0.10 ^a	0.65 ^a	0.62 ^a	0.65 ^a	0.14 ^a	0.51 ^a	0.61 ^a
389	0.78 ^a	0.26 ^a	0.15 ^a	0.11 ^a	0.76 ^a	0.76 ^a	0.74 ^a	0.15 ^a	0.53 ^a	0.67 ^a
Scott A (R)	0.65 ^a	0.24 ^a	0.13 ^a	0.11 ^a	0.65 ^a	0.60 ^a	0.62 ^a	0.13 ^a	0.42 ^a	0.54 ^a
Scott A	0.19 ^b	0.12 ^b	0.10 ^b	0.10 ^a	0.19 ^b	0.22 ^b	0.12 ^b	0.13 ^a	0.18 ^b	0.18 ^b

Los valores se expresan como la media.

Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

La comparación corresponde a la cepa resistente y su contraparte no resistente en cada una de las condiciones.

Se aprecia que las células resistentes y no resistentes de las cepas 389 y ATCC 19115 no mostraron diferencias significativas en la velocidad de desarrollo, en el caso de las cepas LCDC y Scott A se observa que tuvieron una menor velocidad de desarrollo las cepas resistentes en condiciones óptimas de desarrollo, y tuvieron la misma velocidad en condiciones limitantes de desarrollo (Tabla 5.6).

Tabla 5.6 Estimación de la velocidad de desarrollo de *L. monocytogenes* en diferentes condiciones de desarrollo.

Cepa	CST				NaCl			pH		
	100%	10%	1%	0.1%	2%	1.5%	1%	4	5	6
ATCC (R)	0.071 ^a	0.024 ^a	0.005 ^a	0.002 ^a	0.084 ^a	0.116 ^a	0.132 ^a	0.064 ^a	0.112 ^a	0.142 ^a
ATCC	0.071 ^a	0.014 ^a	0.007 ^a	0.002 ^a	0.097 ^a	0.101 ^a	0.138 ^a	0.063 ^a	0.099 ^a	0.165 ^a
LCDC (R)	0.076 ^a	0.021 ^a	0.010 ^a	0.003 ^a	0.037 ^a	0.057 ^a	0.063 ^a	0.054 ^a	0.104 ^a	0.136 ^a
LCDC	0.104 ^b	0.048 ^b	0.013 ^a	0.009 ^a	0.021 ^a	0.086 ^b	0.104 ^b	0.052 ^a	0.080 ^b	0.095 ^b
389 (R)	0.068 ^a	0.017 ^a	0.008 ^a	0.001 ^a	0.065 ^a	0.091 ^a	0.065 ^a	0.039 ^a	0.120 ^a	0.116 ^a
389	0.069 ^a	0.020 ^a	0.006 ^a	0.003 ^a	0.067 ^a	0.092 ^a	0.063 ^a	0.036 ^a	0.117 ^a	0.182 ^a
Scott A (R)	0.073 ^a	0.052 ^a	0.006 ^a	0.003 ^a	0.076 ^a	0.104 ^a	0.102 ^a	0.039 ^a	0.099 ^a	0.145 ^a
Scott A	0.143 ^b	0.023 ^b	0.004 ^a	0.008 ^b	0.083 ^a	0.139 ^b	0.056 ^b	0.031 ^a	0.004 ^b	0.054 ^b

Los valores se expresan como la media.

Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

La comparación corresponde a la cepa resistente y su contraparte no resistente en cada una de las condiciones.

Como se mencionó anteriormente, algunas bacterias tienen la capacidad de equilibrar el gasto que les supone el desarrollar la resistencia a algún antibiótico, aunque también existen algunas otras donde la resistencia les confiere una pérdida en su capacidad de desarrollo, esto podría deberse a que las modificaciones solamente se realizan en el gen *rpoB* y no tienen las modificaciones secundarias arriba mencionadas.

En cepas de *L. monocytogenes* se han realizado secuencias de todo el genoma, Comas *et al.*, (2012) observó que las mutaciones en el gen *rpoB* puede

ser en diferentes partes del genoma. Esto podría indicar la dificultad de saber exactamente cuales serían las consecuencias de las modificaciones por la resistencia y saber si en realidad existen mutaciones que equilibren estas modificaciones primarias.

Al no haber mutaciones adicionales en los genes *rpoA*, *rpoB* y *rpoC*, hay una disminución en el “*fitness*” de las células, además de que estas mutaciones también ayuda a que exista una menor sensibilidad al antibiótico (Korsak *et al.*, 2016).

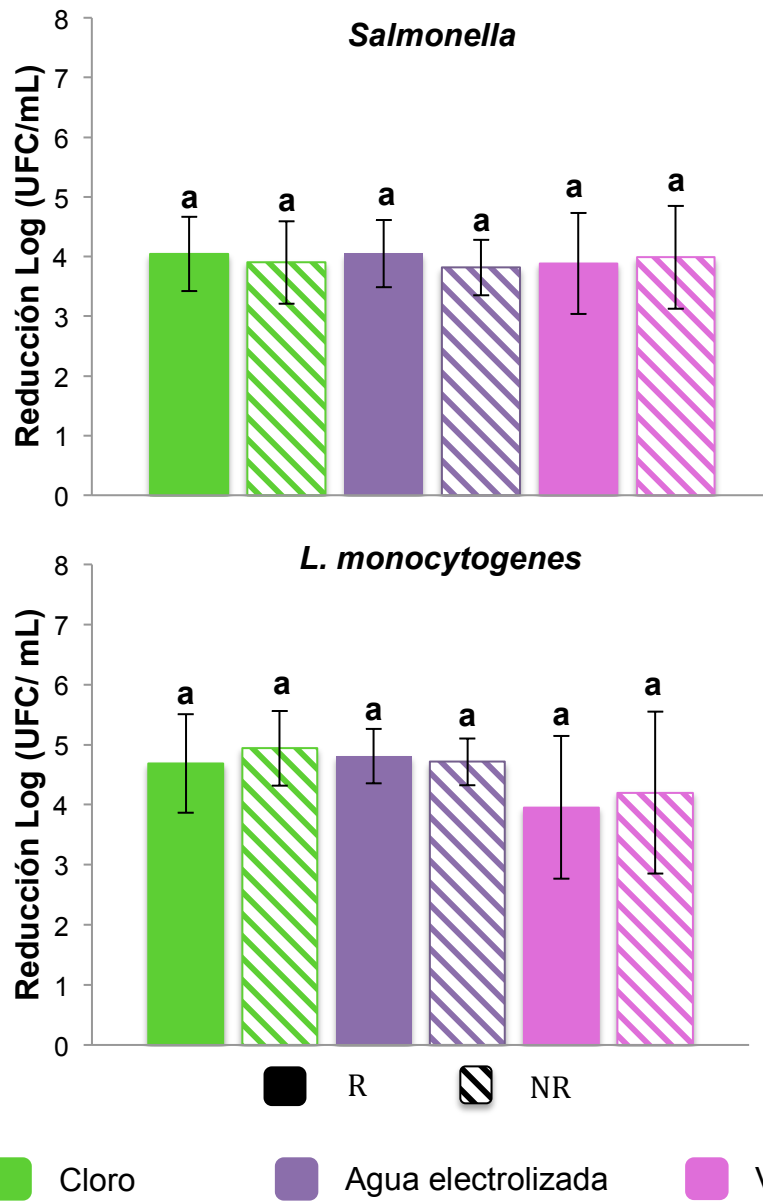
Estas modificaciones secundarias también podrían propiciar a que la bacteria sea más tolerante a otros agentes nocivos como los desinfectantes; pero si la bacteria no cuenta con las modificaciones secundarias entonces se ve afectado su desarrollo (Korsak *et al.*, 2016).

5.1.2 Evaluación *in vitro* de la susceptibilidad de las cepas a desinfectantes

En la Figura 5.4 se observa la evaluación de los tres desinfectantes *in vitro* y se aprecia que no existe diferencia entre las cepas resistentes y no resistentes a rifampicina de ambos microorganismos. Kim *et al.*, (1995) no encontraron diferencias entre las cepas de *Salmonella* Typhimurium resistentes a rifampicina y su contraparte no resistente cuando las pusieron en contacto *in vitro* con aceites esenciales.

Korsak *et al.*, (2016) evaluaron la susceptibilidad a antibióticos y de cepas de *L. monocytogenes* resistentes y no resistentes a no habiendo observado diferencias, esto podría deberse a que como se ha comentado, las mutaciones ocurren en diferentes sitios del gen *rpoB*, estas mutaciones pueden dar origen a otras mutaciones secundarias que ayudan a que el microorganismo resistente a rifampicina no pierda sus capacidades metabólicas y de desarrollo. Con estos resultados, se validó el uso las cepas resistentes a rifampicina de ambos patógenos para los ensayos de desinfección en jitomate cherry.

Entre los desinfectantes usados se observó que las tres sustancias tuvieron el mismo efecto bactericida con las células, aunque se observa una mayor variabilidad de los datos en el caso del ácido acético comercial (vinagre) que en el caso del EW y del cloro.



*Los resultados se expresan como la media de tres valores \pm error estándar. Los valores seguidos de letras diferentes son significativos ($\alpha= 0.05$) con la prueba de Tukey.

Figura 5.4 Efecto *in vitro* de los desinfectantes contra *Salmonella* y *L. monocytogenes*.

5.2 Comportamiento de células débilmente adheridas (CDA) y células fuertemente adheridas (CFA) de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en jitomate *cherry* almacenado a 4°C y 22°C

5.2.1 Selección de condiciones del sonicador para el recuento de CFA a la superficie del jitomate *cherry*

De acuerdo a los resultados obtenidos (Figura 5.5) se observó que estadísticamente no existía diferencia entre los tratamientos al cambiar la potencia del sonicador y el tiempo de aplicación. Sin embargo, la potencia alta con mayor tiempo (8 min) es aquella que permite desprender mejor las células fuertemente adheridas (CFA).

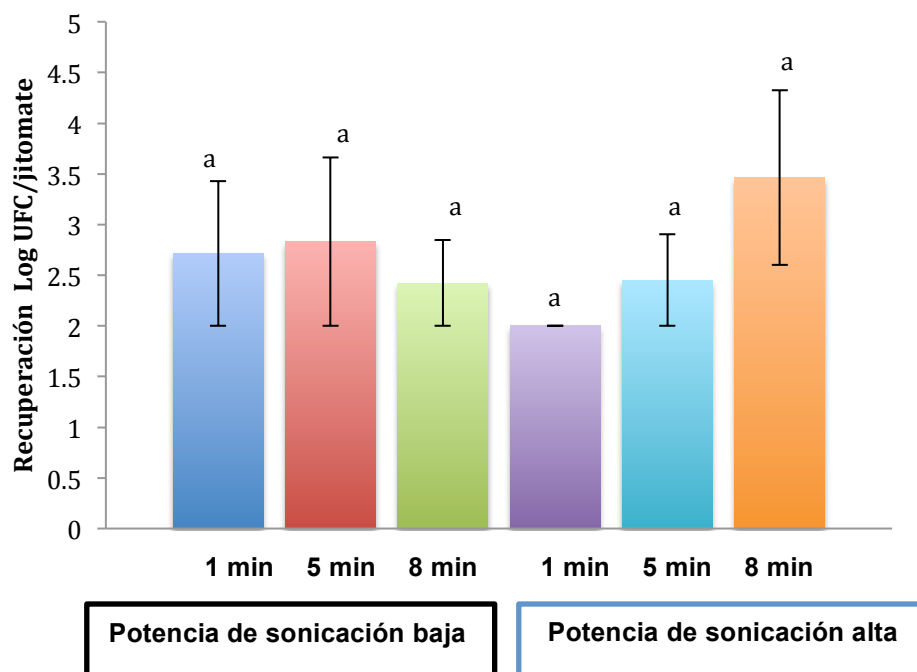


Figura 5.5 CFA recuperadas de la superficie del jitomate *cherry* mediante sonicación a las diferentes condiciones.

A pesar de que la interacción entre el tiempo y la potencia no resultó estadísticamente significativa ($\alpha=0.05$) debido a la dispersión de los datos. En la gráfica de interacción (Figura 5.6) se muestra que efectivamente a mayor tiempo y mayor potencia la tendencia es a obtener mayor recuperación de CFA. Por lo tanto optamos por usar la potencia alta con una duración de 8 min.

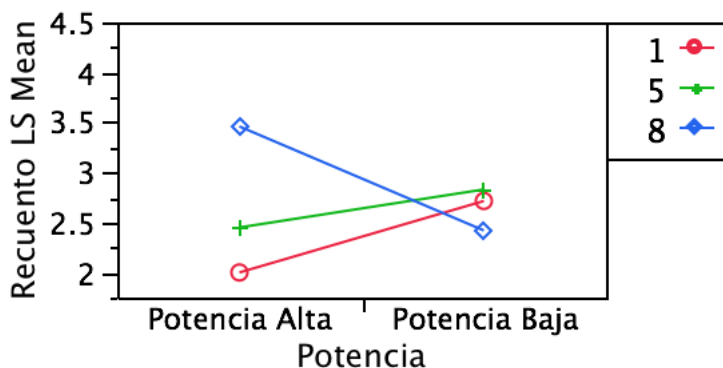
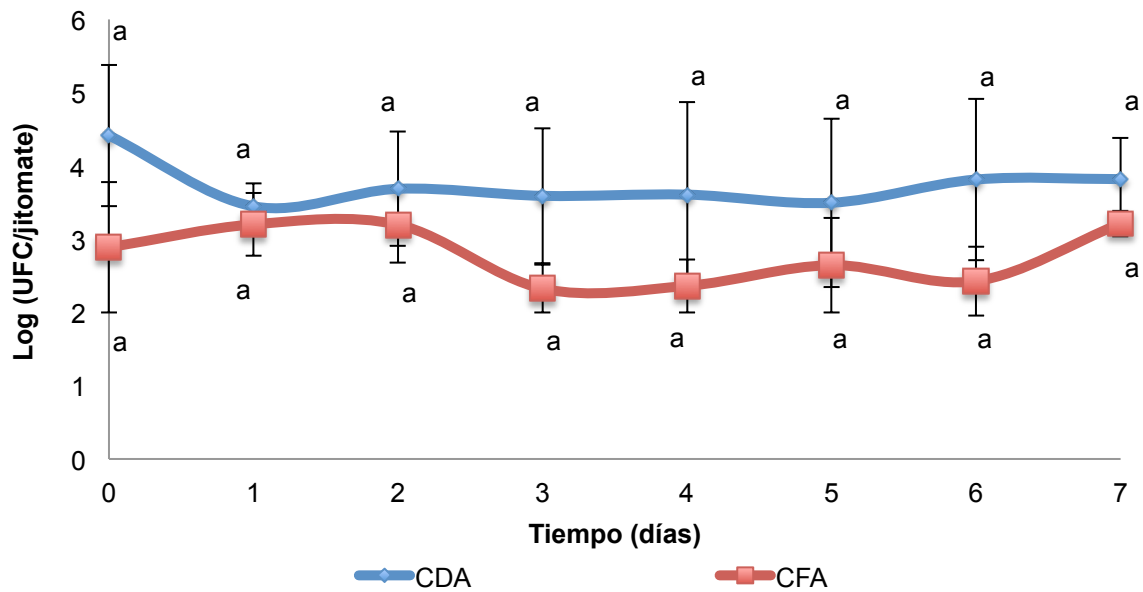


Figura 5.6 Interacción entre la potencia y el tiempo para el desprendimiento de CFA en la superficie del jitomate *cherry*.

5.2.2 Comportamiento de *Salmonella* en jitomate *cherry*

Como se esperaba, ambos tipos de células de *Salmonella* (CDA y CFA) no mostró crecimiento en la condición de 4°C (Figura 5.7). Sin embargo, tampoco se observa una disminución significativa de las poblaciones durante los siete días evaluados. Si *Salmonella* contamina el fruto en el campo o durante su acondicionamiento o proceso, podría sobrevivir a lo largo del almacenamiento y continuar viable al llegar al consumidor.



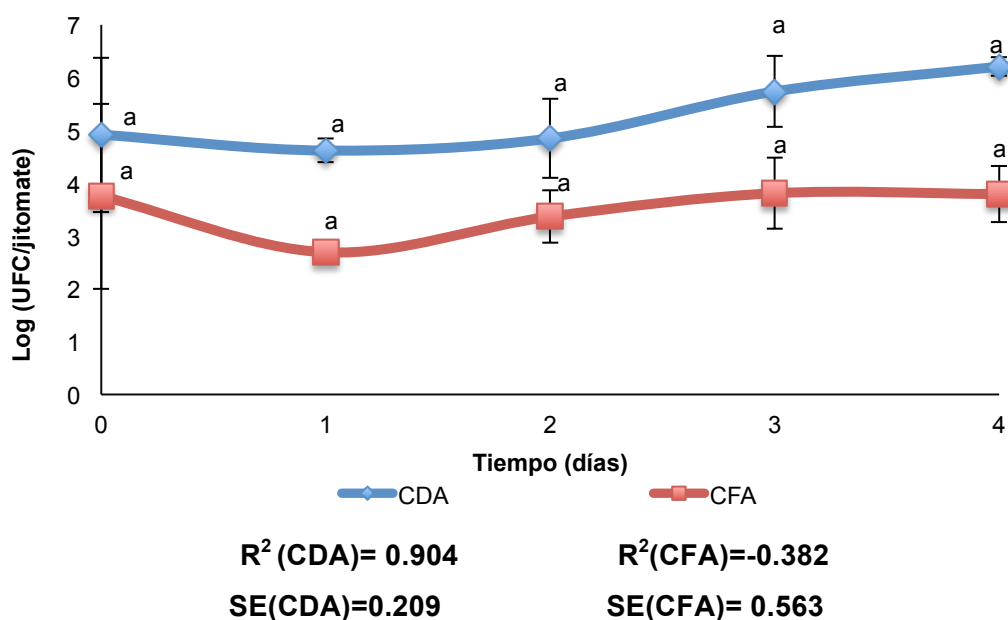
*Los resultados se expresan como la media de tres valores \pm error estándar. Los valores seguidos de letras diferentes son significativos ($\alpha=0.05$) con la prueba de Tukey.

Figura 5.7 Comportamiento de *Salmonella* CFA y CDA en jitomate *cherry* almacenado a 4°C.

Estos resultados son similares a lo reportado por Anderson (2012), quien inoculó *Salmonella* en lechuga lista para su consumo y las almacenó en temperaturas de refrigeración, no habiendo observado desarrollo de este microorganismo.

Al final del almacenamiento a 22°C *Salmonella* se observó un crecimiento de 1 Log UFC/mL de las CDA en el jitomate con respecto a la concentración del patógeno al inicio de la cinética (Figura 5.7). En cambio Asplund (1991) encontró que *Salmonella* crecía 4 Log UFC/mL a la misma temperatura durante las primeras 24 h de almacenamiento. En la población de CFA se observó una reducción de 1 Log UFC/jitomate durante estas primeras 24 h. Disminución que podría deberse a que el microorganismo estaba adaptándose a las condiciones poco favorables de la superficie del jitomate. Al final del almacenamiento la población alcanzó el nivel inicial (aproximadamente 4 Log). Los jitomates solo se

almacenaron durante 4 días, debido a que después del cuarto día de almacenamiento presentaban daños en el tejido y la salida de fluidos así como crecimiento de hongos, por lo tanto, el consumidor ya no lo consumiría. Estos daños como ablandamiento de la piel de los jitomates podría deberse a que la microbiota presente en el jitomate aumentó ocasionando daños.



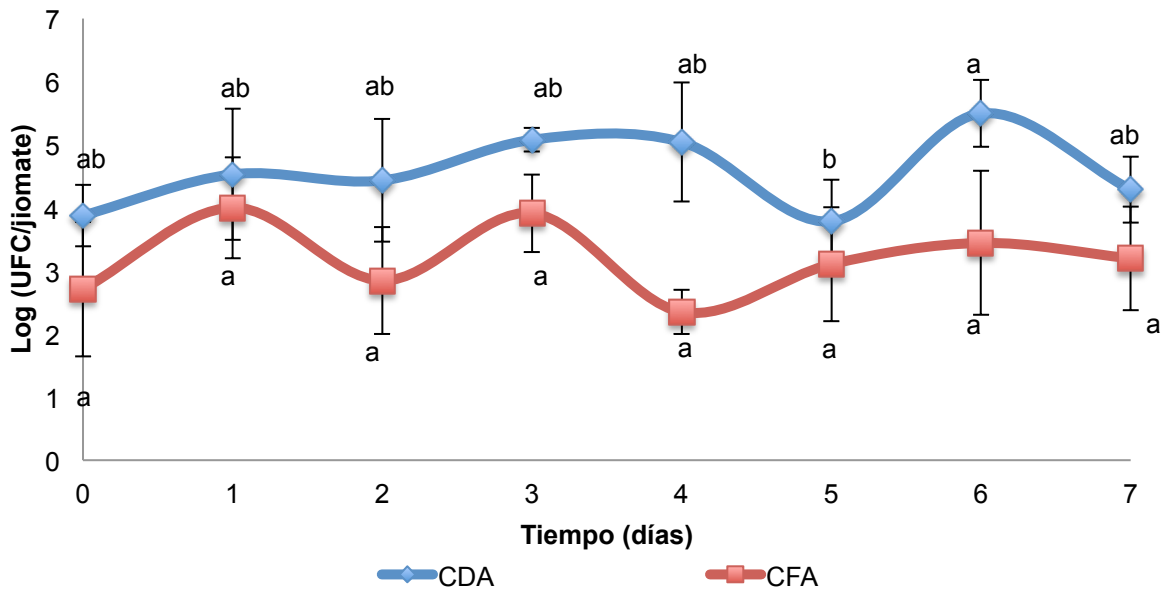
*Los resultados se expresan como la media de tres valores \pm error estándar. Los valores seguidos de letras diferentes son significativos ($\alpha=0.05$) con la prueba de Tukey.

Figura 5.8 Comportamiento de CFA y CDA de *Salmonella* en jitomate *cherry* almacenado a 22°C.

5.2.3 Comportamiento de *L. monocytogenes* en la superficie de jitomate *cherry*

L. monocytogenes no aumentó su población durante los 7 días de almacenamiento a 4°C, (Figura 5.9). Se observó un comportamiento estable a lo largo de estos días, sin decremento de la población en las CDA ni en las CFA a la superficie del jitomate *cherry*. Este microorganismo es psicrótrofo, con capacidad de sobrevivir y desarrollar en temperaturas de refrigeración. Anderson (2012) observó desarrollo de *L. monocytogenes* en hortalizas de hoja cortadas y almacenadas a temperatura de refrigeración por 7 días, los nutrientes que contienen los vegetales de hoja pudieron permitir el desarrollo del microorganismo .

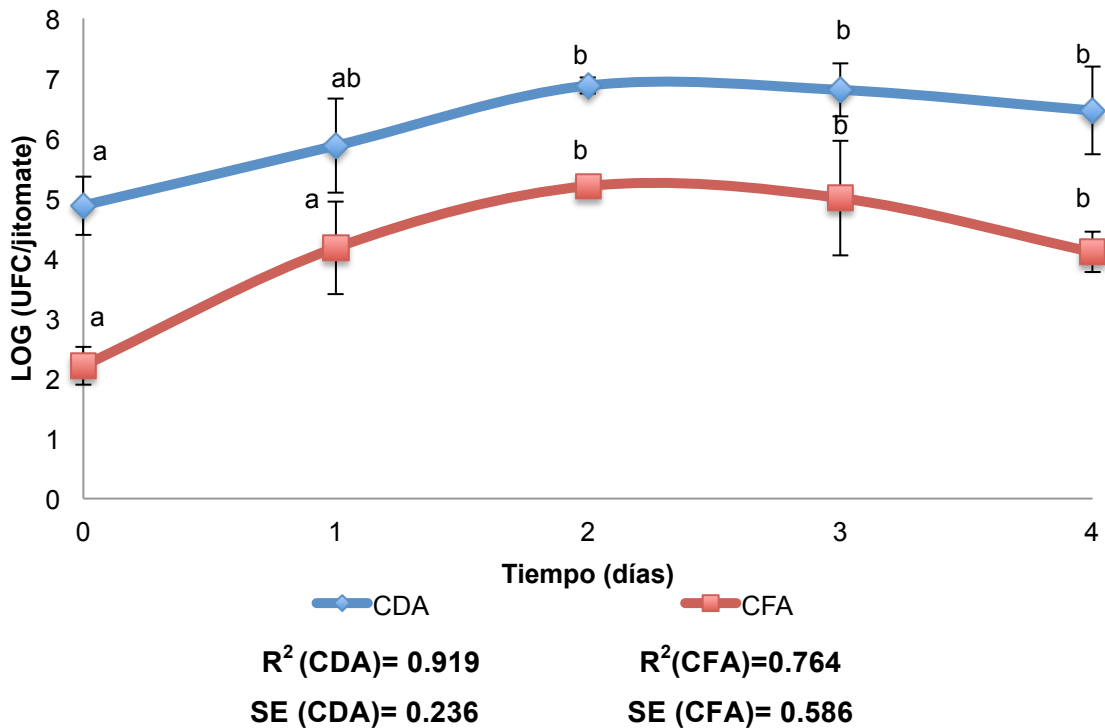
En otro estudio del mismo año, se encontró que *L. monocytogenes* tiene un menor desarrollo en temperaturas de refrigeración que *Salmonella* en arúgula, espinaca y lechuga escarola. El autor señala que el comportamiento observado es debido a que *L. monocytogenes* es aún peor competidor que *Salmonella*, y que esto inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes* en vegetales frescos.



*Los resultados se expresan como la media de tres valores \pm error estándar. Los valores seguidos de letras diferentes son significativos ($\alpha=0.05$) con la prueba de Tukey.

Figura 5.9 Comportamiento de CDA y CFA de *L. monocytogenes* en jitomate *cherry* almacenado a 4°C.

L. monocytogenes tuvo un discreto desarrollo, que resultó estadísticamente significativo ($\alpha=0.05$) en el jitomate *cherry* a 22°C a partir del segundo día de almacenamiento, este comportamiento fue similar tanto para las CDA como para las CFA (Figura 5.10). Esto podría ser el resultado de una baja concentración de nutrientes en la superficie del jitomate y efecto de la microbiota que se pudiera encontrar presente en el alimento. Al igual que con *Salmonella*, se encontró que los jitomates *cherry* a 22°C mostraron signos de deterioro a los cuatro días de almacenamiento, y es por esto que se llevó a cabo el seguimiento sólo hasta el día cuatro.



*Los resultados se expresan como la media de tres valores \pm error estándar. Los valores seguidos de letras diferentes son significativos ($\alpha=0.05$) con la prueba de Tukey.

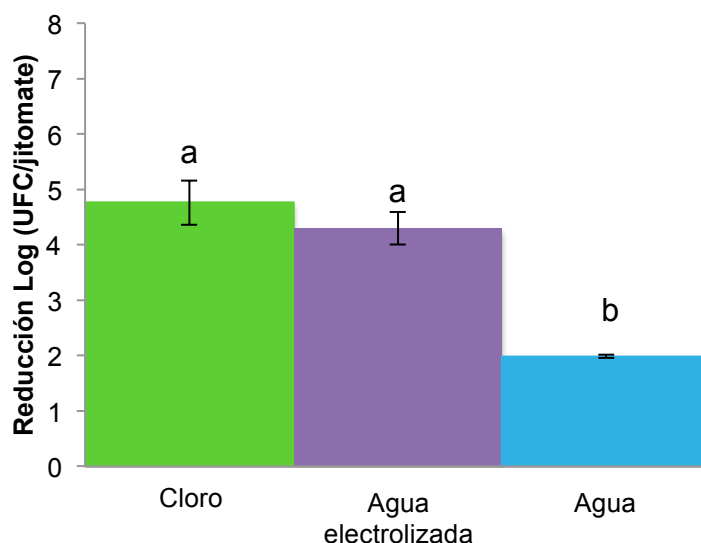
Figura 5.10 Comportamiento de CDA y CFA de *L. monocytogenes* en jitomate *cherry* almacenado a 22°C.

También es importante mencionar que la microbiota presente en el jitomate pudiera ayudar al desarrollo del patógeno, protegiéndolo de las condiciones adversas o bien, actuar como antagonista y ocasionar que los microorganismos patógenos inoculados no sean capaces de desarrollar.

5.3 Desinfección de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en jitomate cherry

5.3.1 *Salmonella*

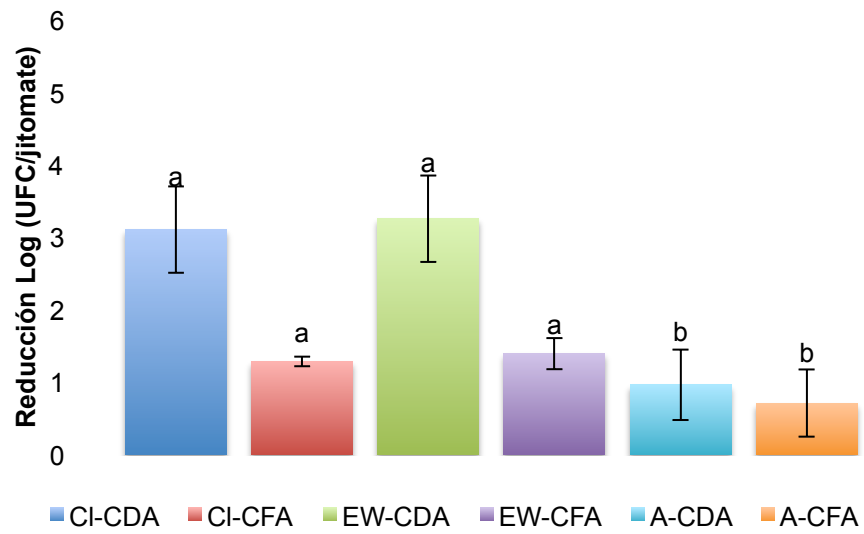
Cuando se realizó el ensayo de desinfección de *Salmonella* en jitomate cherry sin almacenamiento (Figura 5.11) se obtuvieron reducciones de hasta ~4.5 Log UFC/mL con agua electrolizada y cloro, estas células podría pensarse que también se encuentran débilmente adheridas.



*Los resultados se expresan como la media de tres valores \pm error estándar. Los valores seguidos de letras diferentes son significativos ($\alpha = 0.05$) con la prueba de Tukey.

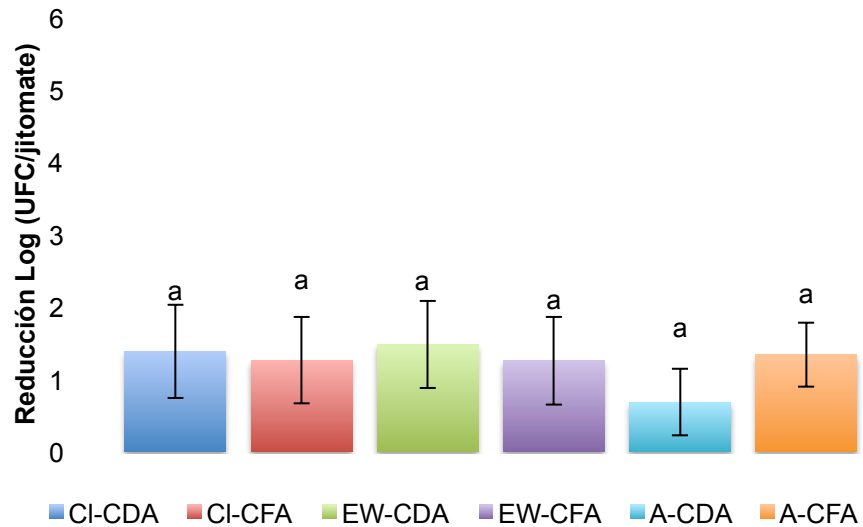
Figura 5.11 Desinfección de jitomates *cherry* inoculados con *Salmonella* sin almacenamiento.

En el caso de las CDA en los jitomates almacenados a 22°C (Figura 5.12) se encontraron reducciones de ~3 Log UFC/jitomate. En jitomates almacenados a 4°C apenas se redujeron en ~1.5 Log UFC/jitomate para ambos desinfectantes (Figura 5.13).. La FDA señala que un buen desinfectante es aquel que logra reducir 5 Log UFC/mL, lo cual se logra si las células se encuentran débilmente adheridas al alimento.



*Los resultados se expresan como la media de tres valores \pm error estándar. Los valores seguidos de letras diferentes son significativos ($\alpha= 0.05$) con la prueba de Tukey.

Figura 5.12 Eficacia de la desinfección en la inactivación de CDA y CFA de *Salmonella* en jitomate *cherry* almacenado a 22°C.



*Los resultados se expresan como la media de tres valores \pm error estándar. Los valores seguidos de letras diferentes son significativos ($\alpha= 0.05$) con la prueba de Tukey.

Figura 5.13 Eficacia de la desinfección de CDA y CFA de *Salmonella* en jitomate *cherry* almacenado a 4°C.

El jitomate *cherry* entero presenta condiciones de desarrollo que limitan el desarrollo de los microorganismos, como pocos nutrientes que permitan el desarrollo de los patógenos. A pesar de este escenario han ocurrido diversos brotes de *Salmonella* asociados al consumo de jitomate. Al tener una piel delgada, el jitomate se rasga fácilmente, con lo cual los nutrientes pudieran quedar expuestos para el crecimiento bacteriano o la mera sobrevivencia del microorganismo, ser suficiente para causar el daño a la salud del consumidor.

Abadias *et al.*, (2008) reportaron reducciones de *Salmonella* en lechuga de alrededor de 2 Log UFC/mL con la aplicación de EW. Posiblemente las diferencias observadas entre este estudio que se llevó a cabo con jitomate y el estudio en lechuga es debido a que el jitomate una superficie lisa en comparación con la superficie de la lechuga la cual es rugosa y tiene ondulaciones que podrían proteger a las bacterias del desinfectante. Asimismo, la naturaleza cerosa del

jitomate cherry podría dificultar la adhesión de las bacterias a la superficie. En el estudio realizado se observó que la inoculación resultó complicada en dicho producto debido a que la superficie del fruto al ser lisa, dejaba escurrir el inóculo colocado, de manera que se podría pensar que las células no se adhieren tan fácilmente como en superficies rugosas.

De acuerdo al análisis estadístico se observó que la interacción entre la intensidad de adherencia (CDA y CFA) y la temperatura de almacenamiento fue significativa ($p < 0.005$) para *Salmonella* (Figura 5.14). Las CDA a 22°C fueron más susceptibles a los desinfectantes que las CFA, mientras que a 4°C, ambas poblaciones mostraron una susceptibilidad similar.

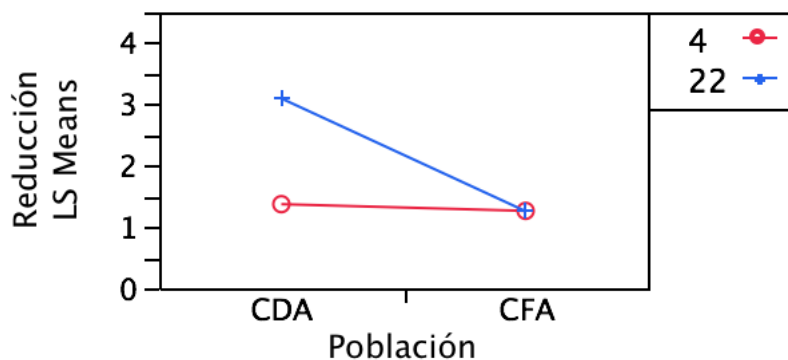
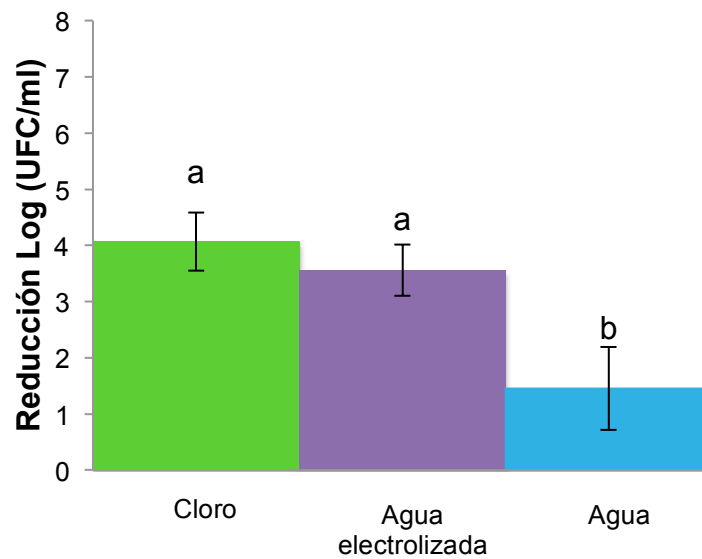


Figura 5.14 Interacción entre la intensidad de adherencia de *Salmonella* en el jitomate *cherry* con la temperatura de almacenamiento.

5.3.2 *Listeria monocytogenes*

En los jitomates inoculados con *L. monocytogenes* sin almacenamiento (Figura 5.15) se observa que tanto el cloro como el EW tuvieron el mismo efecto antimicrobiano, logrando reducir alrededor de ~4 Log UFC/jitomate, cifra recomendada por la FDA. Esta reducción fue superior a lo encontrado una vez que

los jitomates inoculados se almacenaron. Un contacto prolongado con el fruto favorece la adhesión y/o la intensidad de ésta a la superficie y con ello la mayor sobrevivencia de los patógenos a los procesos de desinfección.



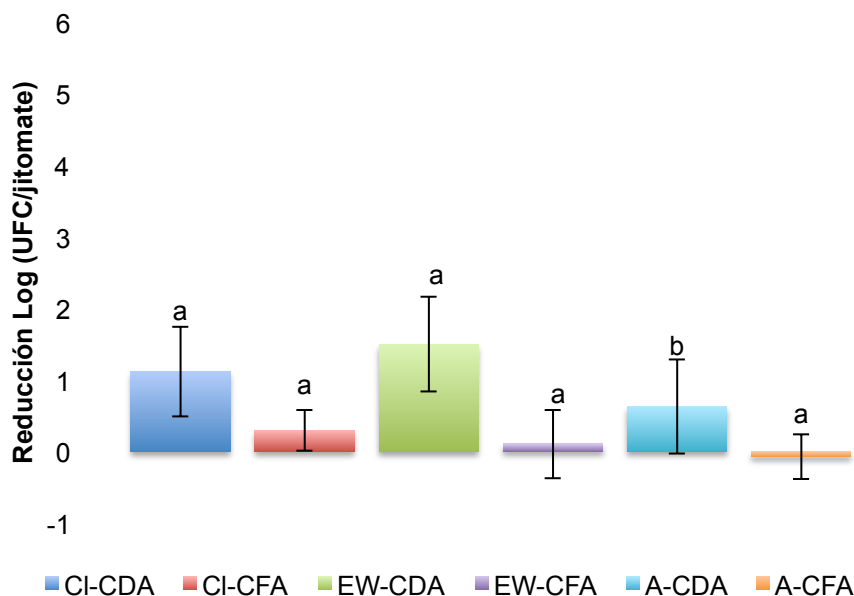
*Los resultados se expresan como la media de tres valores \pm error estándar. Los valores seguidos de letras diferentes son significativos ($\alpha= 0.05$) con la prueba de Tukey.

Figura 5.15 Desinfección de jitomates *cherry* inoculados con *L. monocytogenes* sin almacenamiento.

Se pudo observar que en nuestros ensayos hubo una mayor reducción de *Salmonella* que de *L. monocytogenes*. Existen diversos estudios donde se observa que este último microorganismo tiene mayor capacidad de supervivencia que otras bacterias ante la acción de desinfectantes. Abadías *et al.* (2007) encontraron reducciones de 2.5 a 3.7 Log UFC/mL para *Listeria innocua*, estos autores también

reportaron mayor efecto antimicrobiano contra *Salmonella* que contra *L. monocytogenes*.

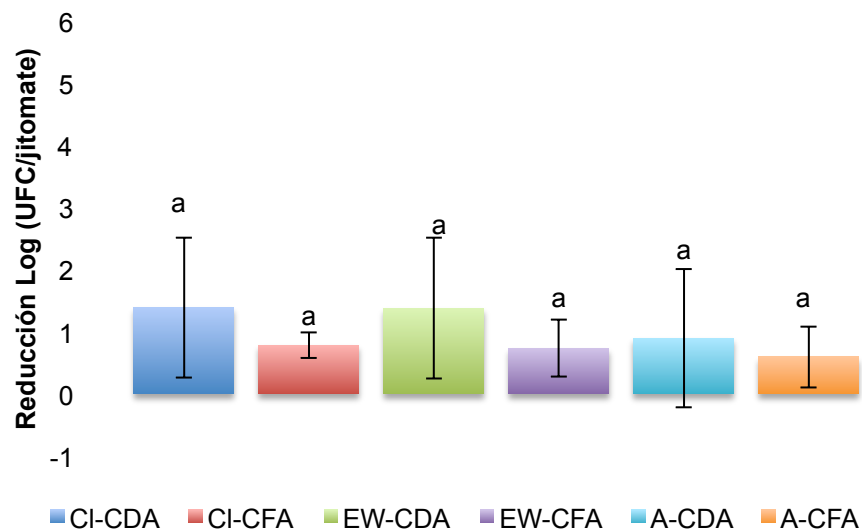
En los jitomates almacenados a 4°C se observa que el efecto antimicrobiano contra *L. monocytogenes* fue menor que en los jitomates sin almacenamiento (Figura 5.16) obteniendo reducciones solamente de ~1.5 Log UFC/jitomate para las CDA; la reducción de las poblaciones de las CFA fue aún menor (~0.5 Log UFC/jitomate).



*Los resultados se expresan como la media de tres valores \pm error estándar. Los valores seguidos de letras diferentes son significativos ($\alpha = 0.05$) con la prueba de Tukey.

Figura 5.16 Efectividad de la desinfección en la reducción de CDA y CFA de *L. monocytogenes* en jitomate *cherry* almacenado a 4°C.

En los jitomates almacenados a 22°C también se obtuvo menor efecto antimicrobiano que el observado en los jitomates sin almacenamiento, en este caso se obtuvieron reducciones de ~1.5 Log UFC/jitomate para las CDA y sólo ~0.7 Log UFC/jitomate para las CFA (Figura 5.17).



*Los resultados se expresan como la media de tres valores \pm error estándar. Los valores seguidos de letras diferentes son significativos ($\alpha=0.05$) con la prueba de Tukey.

Figura 5.17 Efectividad de la desinfección en la reducción de CDA y CFA de *L. monocytogenes* en jitomate *cherry* almacenado a 22°C.

Svoboda *et al.*, (2016) obtuvieron reducciones de 3 Log UFC/mL o menos cuando se realizó el estudio de desinfección con ácidos orgánicos, esto independientemente del microorganismo tratado (*E. coli* O157:H7, *Salmonella* ó *L. monocytogenes*).

Bae *et al.*, (2012) encontraron un efecto de inactivación menor en células adheridas de diversos patógenos que en las células planctónicas. Los autores

sugieren que esto podría atribuirse a que las bacterias se encuentran protegidas por sustancias que las mismas células van produciendo por medio de su metabolismo y por efecto del estrés al que se ven sometida. El estrés podría ser causado debido a que el jitomate cherry es una matriz cerosa que no tiene huecos donde pudieran protegerse de ataques físicos o químicos.

Las CFA pudieran estar protegidas por sustancias que libera la microbiota del alimento, y con lo cual el agente desinfectante pudiera no entrar en contacto con las bacterias inoculadas y que ya están adheridas a la superficie del alimento (Takeuchi *et al.*, 2000).

Deza (2003) obtuvo reducciones de *Salmonella* en jitomate con EW neutra de hasta 5 Log UFC/mL, sin embargo, estos jitomates fueron inoculados y se dejaron secar por un periodo corto de tiempo así que habría muchas células depositadas sin adherir. En nuestro estudio encontramos un menor efecto antimicrobiano debido a que las células estaban adheridas y también a que teníamos una menor concentración de células (Figura 5.12).

La desinfección con EW tuvo un efecto muy similar al cloro, lo cual concuerda con Deza (2003), quien también encontró reducciones similares con esos desinfectantes en jitomate (Figura 5.11), el tiempo de la aplicación del desinfectante también fue de 1 minuto.

Se ha visto que *L. monocytogenes* tiene la capacidad de adherirse y crecer mejor a superficies cortadas, como la lechuga cortada (Takeuchi *et al.*, 2000) que en superficies enteras, como pudiera ser la hoja de lechuga, esto se debe a que existe una mayor cantidad de nutrientes expuestos y también a que *L. monocytogenes* tiene un mecanismo de adhesión (filamentos de actina) que le permite desarrollar en estas condiciones.

Después del almacenamiento de los jitomates a 4°C, la reducción por efecto del desinfectante fue mínimo para *L. monocytogenes* que podría ser debido a que se encontraba ya inmersa en sustancias poliméricas fabricadas por la microbiota del jitomate cherry, lo cual nos lleva a pensar que la adhesión de los microorganismos les permiten una mayor sobrevivencia. Bajo este panorama, el desinfectante no sería efectivo para CFA y tampoco para las CDA.

En el análisis estadístico el factor de población resultó significativo ($p < 0.05$), queriendo decir que efectivamente, las CDA fueron más susceptibles a los desinfectantes, caso contrario a las CFA, las cuales resultaron ser más tolerantes al efecto de los antimicrobianos probados (Figura 5.18)

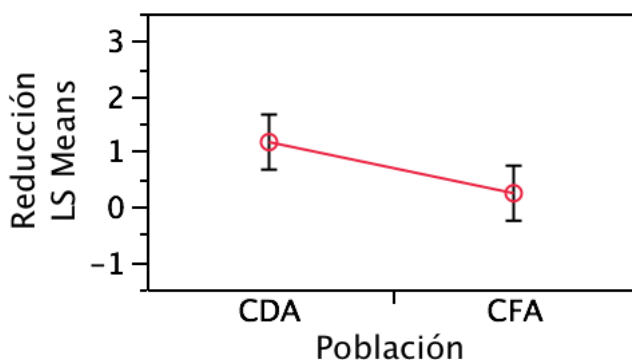


Figura 5.18 Efecto de la intensidad de adherencia en la desinfección de *L. monocytogenes* en jitomate *cherry*.

6. CONCLUSIONES

- La resistencia a rifampicina de las cepas probadas de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en este estudio no modifica significativamente su capacidad de tolerar los desinfectantes evaluados (EW, cloro y vinagre), NaCl, bajos niveles de pH y de nutrientes. Lo cual confirma su utilidad para estudios de comportamiento en los alimentos.
- *Salmonella* y *L. monocytogenes* son capaces de adherirse fuertemente al jitomate *cherry* y mantenerse viables por al menos 4 días a 22 °C y 7 días a 4 °C.
- El porcentaje de adherencia de *L. monocytogenes* en condiciones de refrigeración ($10.92\% \pm 6.02$) resultó superior a la de *Salmonella* ($5\% \pm 3.3$).
- Los desinfectantes evaluados en este estudios (hipoclorito de sodio y agua electrolizada neutra) tuvieron una mayor efectividad contra *Salmonella* que contra *L. monocytogenes*.
- Debido a que el efecto del agua electrolizada fue muy similar al del cloro, este desinfectante podría usarse este desinfectante contra microorganismos patógenos en hortalizas.
- La adhesión al fruto permite a los patógenos tolerar mejor a los desinfectantes evaluados, en particular *Salmonella* almacenada a 22 °C y *L. monocytogenes* en esa misma temperatura y a 4 °C.
- Si se almacena adecuadamente el jitomate *cherry* (4°C) y se lava y desinfecta podríamos disminuir el contenido de patógenos en el alimento. Se recomienda la insistencia a los proveedores y consumidores de no romper la cadena de frío para evitar la multiplicación y desarrollo de patógenos.

7. REFERENCIAS

- Álvarez- Ordóñez A., A. Fernández, A. Bernardo and López, M. 2010. Acid Tolerance in *Salmonella typhimurium* induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 27, 44-49.
- Artola, B. S., and Herrejón, E. P. 2010. Infecciones por *Listeria*. *Medicine- Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 10, 3368-3372.
- Abadias, M., Usall, J., Oliveira, M., Alegre, I., and Viñas, I. 2008. Efficacy of neutral electrolyzed water (NEW) for reducing microbial contamination on minimally-processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 123, 151-158.
- Anderson Sant'Ana, A. S., Barbosa, M. S., Destro, M. T., Landgraf, M., and Franco, B. 2012. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International journal of food microbiology* 157, 52-58.
- Anderson Sant'Ana, A. S., Franco, B. D., and Schaffner, D. W. 2012. Modeling the growth rate and lag time of different strains of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce. *Food microbiology* 30, 267-273.
- Asplund, K., and Nurmi, E. 1991. The growth of salmonellae in tomatoes. *International journal of food microbiology* 13, 177-181.
- B. J. Tindall, P. A. D. Grimont, G. M. Garrity and Euzéby, J. P. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 521–524.
- Bae, Y. M., Baek, S. Y., and Lee, S. Y. 2012. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology* 153, 465-473.
- Baron, S. 1996. *Epidemiology--Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston.

- Benjamin, L., Atwill, E. R., Jay-Russell, M., Cooley, M., Carychao, D., Gorski, L., and Mandrell, R. E. 2013. Occurrence of generic *Escherichia coli*, *E. coli* O157 and *Salmonella* spp. in water and sediment from leafy green produce farms and streams on the Central California coast. *International Journal of Food Microbiology* 165, 65-76.
- Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., and Frankel, G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental microbiology* 12, 2385-2397.
- Behravesh, C. B., Blaney, D., Medus, C., Bidol, S. A., Phan, Q., Soliva, S., and Nguyen, T. 2012. Multistate outbreak of *Salmonella* serotype Typhimurium infections associated with consumption of restaurant tomatoes, USA, 2006: hypothesis generation through case exposures in multiple restaurant clusters. *Epidemiology & Infection* 140, 2053-2061.
- Brandis, G., Wrande, M., Liljas, L., and Hughes, D. 2012. Fitness-compensatory mutations in rifampicin-resistant RNA polymerase. *Molecular microbiology* 85, 142-151.
- Callejón, R. M., Rodríguez-Naranjo, M. I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M. C., and Troncoso, A. M. (2015). Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. *Foodborne pathogens and disease*, 12(1), 32-38.
- Elena Carrasco, Andrés Morales-Rueda, and García-Gimeno, Rosa María. 2011. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International* 45, 545–556
- Cedric N. Berger, Samir V. Sodha, Robert K. Shaw, Patricia M. Griffin, David Pink, Paul Hand, and Frankel, Gad. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology* 12, 2385–2397.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1999. Update: multistate outbreak of listeriosis—United States, 1998-1999. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 47:1117-1118.

- Centers for Disease Control and Prevention. 2012. Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen Farms, Colorado. Available at: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>. Accessed 1 April 2017.
- Centers for Disease Control and Prevention CDC. 2013. Vital signs: Listeria illnesses, deaths, and outbreaks--United States, 2009-2011. MMWR. Morbidity and mortality weekly report 62, 448.
- Chamdit, S., and Siripermpool, P. 2012. Antimicrobial effect of clove and lemongrass oils against planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. Mahidol Univ J Pharm Sci 39, 28-36.
- Corcoran, M., Morris, D., De Lappe, N., O'connor, J., Lalor, P., Dockery, P., and Cormican, M. 2014. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. Applied and environmental microbiology 80, 1507-1514.
- Cummings, K., Barrett, E., Mohle-Boetani, J. C., Brooks, J. T., Farrar, J., Hunt, T., and Slutsker, L. 2001. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Baildon associated with domestic raw tomatoes. Emerging infectious diseases 7, 1046.
- Delaquis, P., Stewart, S., Cazaux, S., and Toivonen, P. 2002. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in ready-to-eat iceberg lettuce washed in warm chlorinated water. Journal of food protection 65, 459-464.
- de Oliveira, M. M. M., Brugnera, D. F., das Graças Cardoso, M., Alves, E., and Piccoli, R. H. 2010. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. Food Control 21, 549-553.
- Delbeke, S., Ceuppens, S., Jacxsens, L., and Uyttendaele, M. 2015. Survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 on strawberries, basil, and other leafy greens during storage. Journal of food protection 78, 652-660.
- Deza, M. A., Araujo, M., and Garrido, M. J. 2003. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on the surface of tomatoes by neutral electrolyzed water. Letters in applied microbiology 37, 482-487.

- Di Ciccio, P., Vergara, A., Festino, A. R., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., and Ianieri, A. 2015. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control* 50, 930-936.
- Estrela, C., Estrela, C. R., Barbin, E. L., Spanó, J. C. E., Marchesan, M. A., and Pécora, J. D. 2002. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian dental journal* 13, 113-117.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2016. "The future of food and agriculture: Trends and challenges," Rome. <http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., and Stasiewicz, M. J. 2014. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of food protection* 77, 150-170.
- Gal-Mor, O., Boyle, E. C., and Grassl, G. A. 2014. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in microbiology*, 5.
- Gombas, D. E., Chen, Y., Clavero, R. S., and Scott, V. N. 2003. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Journal of food protection* 66, 559-569.
- Gómez-López, V. M., Gil, M. I., Pupunat, L., and Allende, A. 2015. Cross-contamination of *Escherichia coli* O157: H7 is inhibited by electrolyzed water combined with salt under dynamic conditions of increasing organic matter. *Food microbiology*, 46, 471-478.
- Ignat, A., Manzocco, L., Maifreni, M., and Nicoli, M. C. 2016. Decontamination Efficacy of Neutral and Acidic Electrolyzed Water in Fresh-Cut Salad Washing. *Journal of Food Processing and Preservation* 40, 874-881.
- Jung, Y., Jang, H., Guo, M., Gao, J., and Matthews, K. R. 2017. Sanitizer efficacy in preventing cross-contamination of heads of lettuce during retail crisping. *Food Microbiology*, 64, 179-185.

- Kathariou, S. 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of food protection* 65, 1811-1829.
- Kim, J. M., Marshall, M. R., Cornell, J. A., and Wei, C. I. 1995. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science* 60, 1364-1368.
- Korsak, D., and Krawczyk-Balska, A. 2016. Rifampicin-and Rifabutin-Resistant *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food Products Carry Mutations in *rpoB* Gene. *Foodborne pathogens and disease* 13, 363-368.
- Latham Michael C. *Nutrición Humana en el mundo en desarrollo. Hortalizas y Frutas*. Universidad de Cornell. 2002. Colección FAO: Alimentación y nutrición N°29.
- Lomonaco, S., Nucera, D., and Filipello, V. 2015. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infection, Genetics and Evolution*, 35, 172-183.
- López-Velasco, G., Tomás-Callejas, A., Sbodio, A., Artés-Hernández, F., and Suslow, T. V. 2012. Chlorine dioxide dose, water quality and temperature affect the oxidative status of tomato processing water and its ability to inactivate *Salmonella*. *Food Control* 26, 28-35.
- M. Abadias, J. Usall, M. Anguera, C. Solsona., and Viñas, I. 2012. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology* 123, 121-129.
- Mukhopadhyay, S., Ukuku, D. O., Juneja, V., and Fan, X. 2014. Effects of UV-C treatment on inactivation of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157: H7 on grape tomato surface and stem scars, microbial loads, and quality. *Food control* 44, 110-117.
- Olier, M., F. Pierre, J. P. Lemaitre, C. Divies, A. Rousset., and Guzzo, J. 2002). Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates. *Microbiology* 148:1855-1862.
- Pegues, D. A., and Miller, S. I. 2014. *Salmonella* species. In Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Elsevier Inc..

Pérez Miravete, A. 2014. Fuentes de infección y transmisión de salmonelosis. *Salud pública de México* 16, 37-48.

Sagarpa. 2013. "Jitomate"revisado el día: 7/Septiembre/2017
<http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Monografias/Jitomate.pdf>

Sagarpa. 2017 "Aumento del 35% de la producción de jitomate" revisado el día 7/Septiembre/2017
http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/2017/febrero/Documents/JAC_0055_10.PDF revisado el día 7/

Sant'Ana, A. S., Igarashi, M. C., Landgraf, M., Destro, M. T., and Franco, B. D. 2012. Prevalence, populations and pheno-and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 155, 1-9.

S.D. Bennet K.W. Littrell, T. A. Hill, M. Mahovic, C. Barton. 2014. Multistate foodborne disease outbreaks associated with raw tomatoes, United States, 1990-2010: a recurring public health problem. *Epidemiology and Infection* 143, 1352-1359.

Shen, C., Luo, Y., Nou, X., Bauchan, G., Zhou, B., Wang, Q., and Millner, P. 2012. Enhanced inactivation of *Salmonella* and *Pseudomonas* biofilms on stainless steel by use of T-128, a fresh-produce washing aid, in chlorinated wash solutions. *Applied and environmental microbiology* 78, 6789-6798.

Shen, C., Luo, Y., Nou, X., Wang, Q., and Millner, P. 2013. Dynamic effects of free chlorine concentration, organic load, and exposure time on the inactivation of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157: H7, and non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli*. *Journal of food protection* 76, 386-393.

Sim, H. L., Hong, Y. K., Yoon, W. B., and Yuk, H. G. 2013. Behavior of *Salmonella* spp. and natural microbiota on fresh-cut dragon fruits at different storage temperatures. *International journal of food microbiology* 160, 239-244.

Stephan, R., Althaus, D., Kiefer, S., Lehner, A., Hatz, C., Schmutz, C., and Mäusezahl-Feuz, M. 2015. Foodborne transmission of *Listeria monocytogenes* via ready-to-eat salad: A nationwide outbreak in Switzerland, 2013–2014. *Food control*, 57, 14-17.

- Strawn, L. K., Gröhn, Y. T., Warchocki, S., Worobo, R. W., Bihn, E. A., and Wiedmann, M. 2013. Risk factors associated with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination of produce fields. *Applied and environmental microbiology* 79, 7618-7627.
- Suslow, T. V., Oria, M. P., Beuchat, L. R., Garrett, E. H., Parish, M. E., Harris, L. J., and Busta, F. F. 2003. Production practices as risk factors in microbial food safety of fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2, 38-77.
- Svoboda, A., Shaw, A., Dzubak, J., Mendonca, A., Wilson, L., and Nair, A. 2016. Effectiveness of broad-spectrum chemical produce sanitizers against foodborne pathogens as in vitro planktonic cells and on the surface of whole cantaloupes and watermelons. *Journal of food protection* 79, 524-530.
- Takeuchi, K., Matute, C. M., Hassan, A. N., and Frank, J. F. 2000. Comparison of the attachment of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Pseudomonas fluorescens* to lettuce leaves. *Journal of food protection* 63, 1433-1437.
- U.S. Food and Drug Administration .2009. Guidance for industry: Guide to minimize microbial food safety hazards of tomatoes; <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ProduceandPlantProducts/ucm173902.htm>
Accessed 06.09.2011
- Vandamm, J. P., Li, D., Harris, L. J., Schaffner, D. W., and Danyluk, M. D. 2013. Fate of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* on fresh-cut celery. *Food microbiology* 34, 151-157.
- Vazquez-Boland, J. A., G. Dominguez-Bernal, B. Gonzalez-Zom, J. Kreft., and Goebel, J. 2001. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microb. Infect.* 3, 571-584.
- Vasquez-Lopez, A., Villarreal-Barajas, T., and Rodriguez-Ortiz, G. 2016. Effectiveness of Neutral Electrolyzed Water on Incidence of Fungal Rot on Tomato Fruits (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of food protection* 79, 1802-1806.

Wegener Henrik, T. Hald, L. Wong, M. Madsen, H. Korsgaard, F. Bager, P. Gerner-Smidt, K. Molbak. 2003. Salmonella Control Programs in Denmark. Emerging Infectious diseases. Emerging Infectious Diseases Journal 9.

Winfield Mollie D., Eduardo A. Groisman. 2003. Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of Salmonella and Escherichia coli. Applied and environmental microbiology, 3687-3694.

Anexo 1

Titulación de cloro disponible (Greenberg et al., 1992).

1. Adicionar 10 mL de la muestra a valorar en un matraz Erlenmeyer.
2. Agregar 400 μL de yoduro de potasio (10% p/V) y 1 μL de ácido acético glacial, agitar para mezclar completamente todas las soluciones.
3. Titular con una solución valorada de tiosulfato de sodio 0.01 N hasta la aparición de un color amarillo paja.
4. Adicionar 0.4 mL de una solución de almidón al 0.5% y mezclar completamente.
5. Seguir titulando con una solución valorada de tiosulfato de sodio 0.01 N hasta la desaparición del color azul.
6. Registrar el volumen total de tiosulfato de sodio 0.01 N utilizado para la valoración.
7. Determinar la concentración de cloro disponible en la muestra mediante la siguiente ecuación:

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

V_1 : volumen total de tiosulfato de sodio consumido en la titulación (mL)

N_1 : normalidad del tiosulfato de sodio

m: cantidad de muestra

Anexo 2

Titulación alcalimétrica de acidez (NOM-155-SCFI-2012).

1. Medir 20 mL de muestra en un matraz. Añadir 2 mL de fenoftaleína y titular con hidróxido de sodio 0.1 N hasta la aparición de un color rosado persistente cuando menos un minuto.
2. La acidez presente en la muestra, expresada en g/L se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Acidez (g/L)} = \frac{V \times N \times 90}{M}$$

Donde:

V: Mililitros de solución de NaOH 0.1 N gastados en la titulación

N: Normalidad de la solución de NaOH

M: Volumen de la muestra en mL