



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

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

**“COLONIZACIÓN DE *Salmonella* spp. SOBRE MANZANAS ‘GOLDEN
DELICIOUS’, ‘RAYADA’ Y ‘RED DELICIOUS’ DE LA SIERRA DE QUERÉTARO
Y SU SOBREVIVENCIA A AGENTES GERMICIDAS”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Q.F.B. MARÍA DEL CARMEN GONZÁLEZ LÓPEZ

DIRIGIDO POR

DRA. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO



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

“COLONIZACIÓN DE *Salmonella* spp. SOBRE MANZANAS ‘GOLDEN DELICIOUS’, ‘RAYADA’ Y ‘RED DELICIOUS’ DE LA SIERRA DE QUERÉTARO Y SU SOBREVIVENCIA A AGENTES GERMICIDAS”

TESIS

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

Presenta:

Q.F.B. María del Carmen González López

Dirigido por:

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

SINODALES

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Presidente

Firma

Dr. Ramón Á. Martínez Peniche
Secretario

Firma

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Vocal

Firma

Dra. Ludmila Elisa Guzmán Pantoja
Suplente

Firma

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar
Suplente

Firma

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

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre de 2012
México

RESUMEN

En las últimas décadas el consumo de productos frescos se ha asociado a brotes de enfermedad. Aunque la manzana cruda no ha sido reportada como vehículo de patógenos, el jugo de manzana y la sidra han sido causantes de brotes de salmonelosis. Por tanto, es necesario entender la manera en que los patógenos persisten en el fruto y generar procedimientos que logren inactivarlos. En este trabajo se determinó la capacidad de *Salmonella* spp. para colonizar la superficie de manzana y su inactivación mediante agentes germicidas. Para ello se aislaron cepas de *Salmonella* a partir de manzana, suelo y materia fecal de un huerto establecido en Cadereyta, Querétaro. Posteriormente, manzanas crudas cv.: 'Rayada' (R), 'Golden Delicious' (GD) y 'Red Delicious' (RD) se inocularon por inmersión parcial (22 °C/3 h) en una suspensión de una mezcla de cepas resistentes a rifampicina (7 Log UFC/mL). Una vez adheridas las células, las manzanas se lavaron y se propició la colonización en una suspensión de suelo (10%) a 22 °C/48 h. Se cuantificó periódicamente el patógeno en agar soya con rifampicina. La formación de biopelículas fue corroborada mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Se evaluó el efecto de la humedad relativa (HR: 58, 79 y 96%) y la temperatura (5, 15 y 22 °C) en la colonización de los tres cultivares de manzana. Finalmente, se evaluó la susceptibilidad de *Salmonella* spp. en biopelículas a germicidas. *Salmonella* spp. mostró una adhesión semejante sobre los tres cultivares, con porcentajes cercanos a 1% y con una población máxima de 5.8 Log UFC/manzana en la variedad GD, 5.4 en R y 5.1 en RD. Mediante MEB se observaron células adheridas, formación de exopolisacáridos y biopelículas en todos los cultivares. La temperatura mostró la mayor influencia sobre el desarrollo de *Salmonella*. La población máxima a 22 y 15 °C fue de 5.8 y 5.0 Log UFC/manzana, respectivamente (96% HR). A 5°C se evitó el desarrollo y el patógeno tiende a inactivarse. La HR no presentó un efecto marcado en el desarrollo de *Salmonella*. Finalmente, se observó la reducción de 2.3 - 2.5 Log UFC de *Salmonella* en biopelícula sobre manzana con ácido peracético (80 mg·L⁻¹/2 min), mientras que con agua electrolizada neutra (200 mg·L⁻¹ cloro activo/10 min) la reducción fue de 1.0 - 1.1 Log UFC.

(Palabras claves: manzana, *Salmonella*, biopelículas, germicidas, agua electrolizada neutra).

ABSTRACT

In last decades several foodborne outbreaks have been associated to fresh products consumption. Although, raw apples have not been reported as pathogen vehicles, apple juice and cider have been involved in salmonellosis outbreaks. In order to generate effective inactivation procedures it is necessary to understand pathogens persistence strategies on the fruit. In this study *Salmonella* ability to colonize apple surface and its inactivation by germicides treatments has been evaluated. *Salmonella* strains were isolated from apple, soil and animal faeces from an orchard located in Cadereyta, Querétaro. Raw apples cv.: 'Rayada' (R), 'Golden Delicious' (GD) and 'Red Delicious' (RD) were inoculated by partial immersion (22 °C/3 h) in a *Salmonella* suspension (7 Log CFU/mL) of mixed strains resistant to rifampicine. After cell attachment, apples were washed and partially immersed in a soil suspension (10%) during 48 h at 22 °C in order to induce the colonization process. *Salmonella* was quantified by viable count in soy tripticase agar containing rifampicine. Biofilms formation on apple was confirmed by scanning electron microscopy (SEM). The influence of relative humidity (HR: 58, 79 and 96%) and temperature (5, 15 and 22 °C) on *Salmonella* colonization of apple cultivars was evaluated. Finally, susceptibility to germicide treatments of *Salmonella* biofilms was evaluated. The attachment ability of *Salmonella* spp. was similar in the three apple cultivars, showing attach percentages close to 1%. Maximum population was 5.8 Log CFU/apple on cv. GD, 5.4 on R and 5.1 on RD. Attached cells, exopolysaccharides formation and biofilms were observed by SEM on all apple cultivars. Temperature showed the greatest influence on *Salmonella* colonization. The maximum population was 5.8 and 5.0 Log CFU/apple at 22 and 15 °C, respectively (96% HR). At 5 °C, *Salmonella* growth was canceled and it trend to inactivation. Relative humidity effect had not significant effect on *Salmonella* growth. *Salmonella* biofilm on apple showed 2.3 - 2.5 Log reduction with a peracetic acid treatment (80 mg·L⁻¹/2 min), while with a neutral activated water treatment (200 mg·L⁻¹ active chlorine for 10 min) the Log reduction was 1.1 - 1.0.

(Key words: apple, *Salmonella*, biofilms, germicides, neutral activated water).

DEDICATORIAS

*A mis papás: **María Luisa y J. Carmen,***

*a mis hermanos: **Pepe y Luis,***

*a mis abuelitas: **Tita y Lupita,***

*a mi novio: **Carlos Daniel,***

*a ti: **Alex**[†].*

AGRADECIMIENTOS

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para cursar un posgrado de calidad.

Universidad Autónoma de Querétaro por la oportunidad de forjarme dentro de esta institución.

Posgrado en Alimentos, personal administrativo y sus **docentes** por las oportunidades, apoyos y conocimientos brindados. Por estimularme a ser mejor.

Dra. Sofi por su confianza, apoyo, enseñanzas, esfuerzo, consejos, motivación y estima brindada. Por alentarme a ser una persona íntegra y propositiva. Estoy muy agradecida con usted.

Dra. Montse, Dr. Peniche, Dra. Ludmila y Dr. Ramiro, por su apoyo, dedicación, amabilidad, comprensión y confianza. Por colaborar conmigo y enriquecer mi tesis.

Dr. Escartín por su entrega, ser un ejemplo a seguir, por sus regaños y confianza otorgada.

Biol. Araceli Azabache, Dr. Marcelo Silva, por su asesoría en los estudios de microscopía realizados.

A mis papás, por todo lo que significan para mí, cariño, dedicación, apoyo incondicional, por alentarme cada vez que quise desistir, por seguirme hasta aquí y siempre alentarme a ser mejor persona. ¡Porque este nuevo logro es todo suyo! ¡Los amo infinitamente!

Luis y Pepe, mis muchachitos gracias por su afecto, ayuda, por estar a mi lado y darme motivos para seguir adelante. ¡Los amo!

Mis abuelitas, mis **tías: Irene, Lupita, Cuca, Belem**, mis **tíos: Andrés, Pepe, Esmaragdo**, mis **primos, Sandra** y a **toda mi familia** por sus bendiciones, apoyo incondicional, cariño y motivación.

A mis niños tan estimados ellos: **Irais, Génesis, José, Abraham, José, Toño, Juan Manuel y Pedro** porque sin ustedes definitivamente no hubiera sido lo mismo, estoy infinitamente agradecida por haber colaborado conmigo. En definitiva se llevaron mi mención honorífica. ¡GRACIAS!

Sra. Martha, Dulce, Erika, Fernando y compañeros de laboratorio por ser partícipes en este trabajo, por sus consejos, conocimientos compartidos, ayuda, comprensión y vivencias.

Mis loquitas del posgrado consentidas, **Ivonne y Yajaira**, por su estima, amistad, ayuda incondicional y momentos dentro y fuera del laboratorio. Las quiero mucho.

A **Yuli y Sarita** que hicieron de Queretarock algo distinto, por su sincera amistad. Las extraño.

A mis amigos que a pesar de la distancia siempre estuvieron ahí **Coco, Isabel, Gonzalo, Miguel, Gustavo, Quique**, para otorgarme su cariño, consejos y confianza. Añoro nuestros viejos tiempos.

Víctor y a mis compañeros y amigos de generación de maestría, en especial a **Marco, Dalia, David, Alex, Rodrigo, Tere, Isela, Vicky**, por los entrañables momentos vividos, comprensión y amistad.

A mi chaparrito guapo gracias por ser mi compañero en esta etapa de mi vida, porque mi esfuerzo es tuyo y porque esta maestría es compartida contigo **Carlos Daniel**. Sin tu apoyo esto no hubiera sido posible... y sí ¡hoy TE AMO!.. espero que podamos pincelar más momentos juntos.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIAS	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. La manzana	3
2.1.1. Origen	3
2.1.2. Importancia a nivel nacional	3
2.1.3. Importancia a nivel regional	4
2.1.4. Características botánicas generales	5
2.1.5. Composición nutrimental	6
2.1.6. Normatividad mexicana de manzana fresca	8
2.1.7. Microbiología	9
2.2. Contaminación por patógenos en frutas	10
2.2.1. Fuentes y mecanismos	10
2.2.2. Incidencia y brotes	14
2.2.3 Brotes asociados al consumo de manzana y sus productos	18
2.4. Salmonelosis	19
2.4.1 Generalidades	19
2.4.2 <i>Salmonella</i>	21
2.6. Biopelículas	22
2.6.1 Formación de una biopelícula	22
2.6.2. Biopelículas en manzana	24
2.7. Control de contaminación de microorganismos patógenos en frutas	25
2.7.1. Inactivación química de patógenos	27
	vii

2.7.3.1. Soluciones de hipoclorito	28
2.7.3.2. Ácido peroxiacético	29
2.7.3.3. Agua electrolizada	29
III. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo general	31
3.2. Objetivos específicos	31
IV. METODOLOGÍA	32
4.1. Materiales, equipos y reactivos	32
4.1.1. Equipos e instrumentos	32
4.1.2. Medios de cultivo	32
4.1.3. Reactivos	33
4.2. Material biológico	33
4.2.1. Manzanas	33
4.2.2. Cepas microbianas	34
4.3. Métodos	34
4.3.1. Cosecha del fruto	34
4.3.2. Aislamiento de cepas de <i>Salmonella</i> de frutos y ambiente de la huerta de manzanas	35
4.3.3. Preparación del inóculo	38
4.3.4. Determinación de la capacidad de <i>Salmonella</i> para colonizar la superficie de manzana	38
4.3.4.1. Efecto del tiempo de contacto sobre la adhesión de <i>Salmonella</i> a manzana y número de lavados	38
4.3.4.2. Evaluación de suspensiones de nutrientes para la colonización de <i>Salmonella</i> en manzana	40
4.3.5. Estudio de la capacidad de cepas de <i>Salmonella</i> para adherirse, colonizar y formar biopelículas sobre manzana	41
4.3.5.1. Evaluación de la capacidad de <i>Salmonella</i> para colonizar y formar biopelículas en genotipos de manzana	41
4.3.5.2. Evaluación del efecto de la humedad relativa y la temperatura en la colonización de <i>Salmonella</i> sobre tres genotipos de manzana	43

4.3.6. Microscopía electrónica de barrido (MEB)	44
4.3.7. Evaluación de la susceptibilidad de <i>Salmonella</i> en biopelícula a germicidas químicos	45
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
5.1. Aislamiento de cepas de <i>Salmonella</i> de frutos y ambiente de la huerta de manzanas	46
5.2. Determinación de la capacidad de <i>Salmonella</i> para colonizar la superficie de manzana	49
5.2.1. Efecto del tiempo de contacto sobre la adhesión de <i>Salmonella</i> a manzana y número de lavados	49
5.2.2. Estudio de diferentes suspensiones de nutrientes para la colonización.	53
5.3. Estudio de la capacidad de cepas de <i>Salmonella</i> para colonizar y formar biopelículas sobre manzana	54
5.3.1. Evaluación de la capacidad de <i>Salmonella</i> en mezcla para colonizar y formar biopelículas en tres cultivares de manzana	55
5.3.2. Evaluación de la capacidad de cepas individuales de <i>Salmonella</i> para colonizar y formar biopelículas en tres cultivares de manzana	61
5.3.3. Evaluación del efecto de la humedad relativa y la temperatura en la colonización de <i>Salmonella</i> sobre distintos cultivares de manzanas	66
5.4. Evaluación de la susceptibilidad de <i>Salmonella</i> , con capacidad de formar biopelículas, a germicidas químicos	72
5.4.1. Efecto del ácido peracético y agua electrolizada neutra sobre biopelículas de cepas individuales de <i>Salmonella</i> en manzana	78
VI. CONCLUSIONES	80
VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA	81
ANEXO A	97
Titulación del cloro disponible	97
ANEXO B	98
Titulación del ácido peracético	98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1.Composición química de la manzana	7
2. Fuentes de contaminación de microorganismos patógenos en frutas crudas	11
3. Patógenos implicados en brotes de enfermedad asociados al consumo de frutas frescas	15
4. Brotes asociados a consumo de sidra y jugo de manzana sin pasteurizar	18
5. Factores propiciadores de brotes asociados a consumo de sidra y jugo de manzana sin pasteurizar	19
6. Principales características bioquímicas de <i>Salmonella</i>	21
7. Condiciones de amplificación para <i>Salmonella</i>	36
8. Incidencia de <i>Salmonella</i> spp. en la huerta “El Suspiro”	47
9. Consideraciones al examinar frutas crudas para la presencia de microorganismos patógenos	73
10. Permanencia de células adheridas de <i>Salmonella</i> a superficie de manzana almacenadas a 22°C.	50
11. Parámetros cinéticos promedio de <i>Salmonella</i> colonizando manzana ‘Golden Delicious’, ‘Rayada’ y ‘Red Delicious’	58
12. Porcentaje de adhesión de <i>Salmonella</i> sobre manzana ‘Golden Delicious’, ‘Rayada’ y ‘Red Delicious’ previo a la colonización	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Anatomía de la manzana	6
2. Fuentes y mecanismos de contaminación durante la obtención y procesamiento de frutas crudas	11
3. Micrografía electrónica de barrido mostrando la formación de una biopelícula por células de <i>S. Michigan</i> en la corteza de melón	17
4. Etapas de la formación de una biopelícula bacteriana	23
5. MEB que muestra una biopelícula de <i>E. coli</i> O157:H7 en el área del cáliz de manzana 'Golden Delicious' inoculada artificialmente	25
6. Diagrama general de aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.	37
7. Inoculación por inmersión parcial de manzana	39
8. Diagrama general de inducción de la adhesión y colonización de <i>Salmonella</i> en superficie de manzana	42
9. Permanencia de células adheridas y no adheridas de <i>Salmonella</i> a la superficie de manzana después de varios lavados con diluyente de peptona	52
10. Colonización de <i>Salmonella</i> en manzana 'Golden Delicious', 'Rayada' y 'Red Delicious' utilizando tres tipos de nutrientes	54
11. Colonización de <i>Salmonella</i> en manzana 'Golden Delicious', 'Rayada' y 'Red Delicious' (22 °C). A. Primeras 10 h de las cinéticas. B. Cinéticas completas	57
12. Comportamiento de <i>Salmonella</i> en manzana 'Golden Delicious', 'Rayada' y 'Red Delicious' (22 °C). Las curvas de desarrollo fueron obtenidas utilizando el modelo de Baranyi	54
13. MEB de la superficie de manzana 'Golden Delicious' , ' Rayada' y ' Red Delicious' sin inocular e inoculadas con <i>Salmonella</i> después de la etapa de colonización	60

14. Análisis bidimensional del incremento de las diferentes cepas de *Salmonella* inoculadas sobre los tres cultivares de manzana. A. Análisis de interacciones. B. Relación entre %Adhesión e Incremento poblacional 62
15. MEB (4000X) de manzanas 'Golden Delicious' (a), 'Rayada' (b) y 'Red Delicious' (c) inoculada con *Salmonella* spp. aislada de: 1. Manzana, 2.Suelo, 3.Materia fecal, 4.Composta y 5.S. Typhimurium después de 3 días de colonización a 22 °C 64
16. Cinéticas de desarrollo de *Salmonella* sobre manzana 'Golden Delicious', 'Rayada' y 'Red Delicious' almacenadas a distintas Humedades Relativas (HR) de 58%, 79% y 96% a 22 °C, 15 °C y 5 °C 69
17. MEB de manzana inoculada con *Salmonella* después de 3 días de colonización a 22 °C y almacenadas a diferentes humedades relativas (96, 79 y 58%): a. 'Golden Delicious', b. 'Rayada', c. 'Red Delicious' 71
18. Reducción de dos mezclas de *Salmonella* spp. (Huerto y Cepario) sobre manzanas A.'Golden Delicious' y B.'Red Delicious' expuestas a cuatro germicidas 69
19. Reducción de *Salmonella* spp. (Huerto) sobre manzanas 'Golden Delicious' y 'Red Delicious' expuestas a ácido peracético y agua electrolizada neutra 769
20. Reducción de cepas individuales de *Salmonella* spp. sobre manzanas 'Golden Delicious' expuestas a ácido peracético y agua electrolizada neutra 69

I. INTRODUCCIÓN

En años recientes en nuestro país la manzana ha sido una de las principales frutas que mantiene una tasa de crecimiento positiva en importaciones y consumo de 750,000 ton/año (SAGARPA, 2012), aunado a ello el manzano ocupa en México el primer lugar en superficie cultivada entre los frutales de clima templado. Es importante destacar que en virtud a su amplio consumo como ingrediente en jugos, platillos y postres, su consumo primario es como alimento crudo.

En Querétaro, el cultivo del manzano se realiza bajo temporal, ya que los productores no cuentan con la infraestructura necesaria para implementar sistemas de riego. Entre los principales problemas que limitan el desarrollo de la industria manzanera en la región están los eventos climatológicos (heladas tardías, sequía en primavera y granizo durante el desarrollo de los frutos), la poca diversidad de variedades establecidas comercialmente en la zona que generalmente maduran en época en la que el mercado nacional se encuentra saturado, la deficiente aplicación o desconocimiento de las técnicas de cultivo, presencia de enfermedades fungosas en pre y poscosecha y la inocuidad microbiana del producto.

Los productos frescos están expuestos a una serie de fuentes de contaminación con microorganismos patógenos antes, durante y después de su cosecha (Beuchat *et al.*, 2002; Buck *et al.*, 2003). Generalmente el consumo habitual de frutas es en estado fresco, sin la aplicación de un tratamiento de desinfección que elimine la contaminación de origen microbiano previo a su ingesta.

La incidencia de patógenos humanos en frutas frescas se ha convertido en una preocupación global creciente dado que en las últimas décadas se han reportado una gran cantidad de brotes de enfermedad que involucran su consumo.

La salmonelosis es una de las enfermedades gastrointestinales que está cada vez más asociada al consumo de frutas y hortalizas frescas (Abadias *et al.*, 2006).

La manzana no ha sido reportada como vehículo de patógenos, sin embargo, sus productos, como jugo de manzana y sidra han sido causantes de brotes (CDC, 1996; CDC, 1997). Debido a la importancia de los derivados de este fruto como transmisores de patógenos en alimentos, en este trabajo se estudió el comportamiento de *Salmonella* sobre diversos genotipos de manzana cruda provenientes de la Sierra de Queretana.

La prevención de la contaminación en manzana cruda con bacterias patógenas, como *Salmonella*, requiere de acciones encaminadas al seguimiento de un programa efectivo de sanidad durante la cosecha y manejo poscosecha del fruto. La prevención de la contaminación requiere de la introducción de buenas prácticas sanitarias durante su producción y comercialización, así como la utilización de tratamientos químicos para aplicación directa sobre frutos en concentraciones no nocivas para la salud. Sin embargo, la eficacia de estos depende en gran medida de su contacto con los microorganismos. Así pues, la eficiencia de los tratamientos químicos puede ser mermada por la adhesión de las bacterias en la superficie de los frutos y/o la presencia de estructuras de resistencia, como las biopelículas que las contienen y protegen.

Debido a la importancia de este fruto como transmisor de patógenos en alimentos, los objetivos de este trabajo fueron: 1) aislar cepas de *Salmonella* de frutos y ambiente de un huerto de manzanos; 2) determinar la susceptibilidad a la colonización por *Salmonella* spp. sobre la superficie de genotipos de manzana, así como, evaluar el efecto de la humedad relativa y la temperatura en la formación de biopelículas, y finalmente; 3) evaluar la eficiencia de desinfectantes para inactivar *Salmonella* en biopelículas sobre manzana.

II. ANTECEDENTES

2.1. La manzana

2.1.1. Origen

Por siglos la manzana ha sido el placer de muchos pueblos, siendo la especie cultivada actualmente *Malus domestica* Borkh el resultado de la hibridación de al menos cuatro diferentes especies silvestres europeas y asiáticas: *M. sylvestris*, *M. pumila*, *M. dasycphylla* y *M. sieversii* (Knee, 2002). Desde entonces, se ha difundido por el hombre en casi todo el mundo pues su amplia variabilidad genética, le ha permitido adaptarse a diferentes ambientes (Janick *et al.*, 1996).

Los cultivares más populares a nivel mundial son 'Red Delicious', 'Golden Delicious' y 'McIntosh' (Ramírez y Cepeda, 1993) y a nivel nacional destacan 'Red Delicious', 'Golden Delicious', 'Gala' y 'Fuji' (Ponce *et al.*, 1999). El trabajo de mejoramiento genético ha sido intenso y nuevas variedades están apareciendo o están en perspectiva, tales como 'Starking Delicious', 'Dorsett Golden', 'Gala', 'Jonagold', 'Fuji' y 'Mutsu'.

2.1.2. Importancia a nivel nacional

En años recientes la industrialización de frutas ha experimentado un fuerte incremento en el mercado a nivel global, presentando un crecimiento sostenido de la producción de manzana a nivel mundial, tanto en la superficie cultivada como en su producción (FAO, 2008).

Entre los productores mexicanos se ha generado gran interés en consolidar la comercialización de diversos frutos y sus productos a nivel nacional e internacional. La manzana es uno de los frutales de clima templado de mayor consumo e importancia en la industria alimentaria del país, pues se consumen 750,000 ton al año de manzana, en una superficie cosechada de 56,939 ha, de las

cuales únicamente 29,000 ton son de origen nacional (SAGARPA, 2012; FAOSTAT, 2008). Lo anterior se refleja en la expansión y actualización permanente de las técnicas de producción (Ramírez y Cepeda, 1993).

Los principales cultivares establecidos en el país son 'Red Delicious' y 'Golden Delicious' (Ponce *et al.*, 1999). La manzana se cultiva en 23 estados de la república destacando Chihuahua, Coahuila y Durango, con casi 70% de la producción del país. El resto de la producción proviene de estados que cuentan con zonas altas, en donde el clima permite el cultivo del manzano, Puebla, Hidalgo, Veracruz, San Luis Potosí y Querétaro (Ramírez y Cepeda, 1993; SAGARPA, 2012).

2.1.3. Importancia a nivel regional

La producción de manzana en el estado de Querétaro se considera uno de los principales cultivos perennes. En el 2009 se produjeron 1,246 ton convirtiéndose en el décimo productor a nivel nacional (SAGARPA, 2011) y en el 2011 el valor de su producción representó un ingreso de \$ 3,304,730 (SAGARPA, 2012). El cultivo de este frutal se lleva a cabo en los municipios de San Joaquín (58%), Cadereyta (25%), Pinal de Amoles (16%) y Amealco (Saenz *et al.*, 1999), en poco más de 700 ha plantadas (SAGARPA, 2011).

Los principales cultivares ahí establecidos son: 'Golden Delicious' y 'Red Delicious', además de un gran número de tipos criollos y otros genotipos que no han sido claramente identificados (González *et al.*, 2005).

Las huertas se encuentran generalmente en laderas con pendientes importantes, en alturas superiores a 2400 msnm, temperaturas medias anuales de alrededor de 15 °C, se presenta un clima semiseco con lluvias en verano y, la humedad aumenta hacia las partes altas y pasa de templado a subhúmedo y precipitaciones que varían de 800 a 1200 mm anuales (Martínez *et al.*, 2003).

El cultivo del manzano se desarrolla principalmente bajo condiciones de temporal, lo cual trae como consecuencia que el rendimiento y la calidad del fruto estén determinados principalmente por la presencia en cantidad y oportunidad de las lluvias. La estacionalidad de producción propicia que la fruta que se cosecha sea de mala calidad y por ende el precio que normalmente se obtiene por la venta del producto sea muy bajo (menor a \$5.00/kg). Entre las alternativas para mejorar los beneficios económicos de la producción local de manzana se propuso la elaboración de productos industrializados, tales como la sidra tranquila y espumosa artesanal (Drouin, 2002; Ramírez, 2005).

Otros limitantes en la producción son la mala planeación respecto al establecimiento de los huertos y la deficiente o nula aplicación de las prácticas durante el cultivo y la cosecha (poda, control fitosanitario, uso de fertilizantes, entre otras). Aunado a ello, las condiciones económicas y de organización con las que cuentan los productores contribuyen a elevar los costos de producción y a disminuir la calidad del fruto. Finalmente, es importante destacar que los productores locales generalmente desconocen las buenas prácticas agrícolas y carecen de información sobre la inocuidad de su producto, lo cual afecta directamente la calidad sanitaria de la manzana limitando su acceso a otros mercados. Así pues que la divulgación de las herramientas necesarias para la implementación de buenas prácticas agrícolas en la producción y manejo de los frutos que minimicen el riesgo de su contaminación es fundamental dentro de los pequeños productores de manzana en la región.

2.1.4. Características botánicas generales de la manzana

El manzano (*Malus domestica* Borkh) es un complejo híbrido formado por diversas especies del género *Malus*, que pertenece a la familia *Rosaceae*. Es una especie perenne y caducifolia, propia de regiones frías y templadas, durante el invierno permanece en reposo profundo, después del cual lleva su ciclo anual de desarrollo, que se compone de un ciclo vegetativo y de uno reproductivo (Lalatta, 1999). Su fruto, la manzana, es climatérico, lo cual le permitirá ser cosechado y

manipulado en estado pre-climatérico, para luego ser madurado durante su comercialización y transporte, preservando sus características de calidad para el consumidor final.

La manzana es de sabor dulce, varía de tamaño, forma y color; puede ser de forma globular, oblonga, cónica, con sus extremos superiores e inferiores hundidos en la parte central y su superficie es lisa. En su interior puede contener hasta 10 semillas protegidas por cámaras cartilaginosas provenientes de los cinco carpelos del pistilo floral (Figura 1) (Ramírez y Cepeda, 1993).

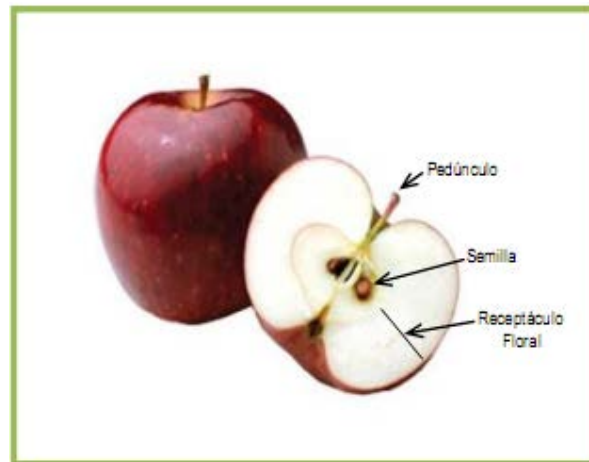


Figura 1. Anatomía de la manzana

2.1.5. Composición nutrimental de la manzana

La composición de la manzana puede presentar variaciones en cuanto a la cantidad y calidad de los principios nutritivos dependiendo de la variedad y el método de cultivo. En la Tabla 1 se muestra la composición promedio de 100 g de pulpa fresca de manzana.

Tabla 1. Composición química de la manzana

NUTRIENTES (g)		MINERALES		VITAMINAS (mg)	
Agua	85.3	Potasio	145 mg	Vitamina E	490
Carbohidratos	11.8	Fósforo	12 mg	Nicotidamina	300
Proteína	0.3	Calcio	7 mg	Ácido pantoténico	100
Lípidos	0.4	Magnesio	6 mg	Caroteno	45
Ácidos orgánicos	0.6	Hierro	480 µg	Vitamina B6	45
Fibra	2.3	Zinc	120 µg	Vitamina B1	35
Minerales	0.3	Cobre	100 µg	Vitamina B2	30
		Manganeso	65 µg		
CARBOHIDRATOS (g)		LÍPIDOS (mg)		OTROS (mg)	
Fructosa	6.04	Ác. Linólico	100	Ác. Málico	550
Sacarosa	2.47	Ác. Palmítico	50	Ác. Cítrico	16
Glucosa	2.21	Ác. Linoléico	20		
Almidón	0.60	Ác. Oléico	20		
Sorbitol	0.51	Ác. Esteárico	10		

(Stuttgart, 1991)

Es importante resaltar que usualmente los ácidos orgánicos declinan durante la maduración cuando se utilizan para la síntesis de otros compuestos o son metabolizados por la fruta para la obtención de energía (Kader, 2002).

Las propiedades terapéuticas de la manzana se han considerado desde principios del siglo XV, pues era un remedio recurrente para los que sufrían de diarrea y disentería. Las propiedades diuréticas y purgantes de la manzana se deben a la presencia de sales orgánicas de potasio, las cuales facilitan la eliminación de ácido úrico (Fernández, 2003).

Las manzanas son particularmente ricas en compuestos fuertemente antioxidantes (flavonoides), aunque se ha encontrado cierta capacidad protectora contra la oxidación en la manzana entera, la epidermis es aparentemente la fuente más concentrada de antioxidantes (Mazza y Miniati, 1993). Además se ha demostrado que el consumir frutas y verduras que contienen flavonoides como la manzana, la uva blanca y la cebolla, reducen hasta en 46% el riesgo de cáncer de

pulmón y en 34% el riesgo de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis y la trombosis (Marchand *et al.*, 2000).

En la manzana, la pared celular de las células está constituida principalmente por celulosa y pectina, con pequeñas cantidades de hemicelulosa y extensina (Seymour *et al.*, 1996). Las pectinas presentes tienden a atrapar el colesterol de la dieta, previniendo que se deposite en las paredes de los vasos sanguíneos y por lo tanto reducen el riesgo de aterosclerosis (Westwood, 1993).

2.1.6. Normatividad mexicana de manzana fresca

La economía y el comercio internacional para los productos y servicios que se ofertan en los mercados globalizados actualmente se rigen por diferentes sistemas de normas y principios de carácter general y específico. En México, la Norma Mexicana NMX-FF-061-SCFI-2003 para el estado fresco de la manzana (*Malus domestica* Bork) destinada al consumo humano, establece los requisitos mínimos para su comercialización en territorio nacional.

Las manzanas deben estar enteras, de consistencia firme y aspecto fresco; sanas, exentas de podredumbre o deterioro, que les permita ser aptas para el consumo humano; sin coloración café en la pulpa y daño por congelamiento; exentas de daños por frío, mancha amarga, magulladuras pronunciadas; exentas de daños por plagas; estar limpias y prácticamente libres de materia extraña visible; deben haber completado su desarrollo fisiológico y presentar el color, sabor, textura y aroma característicos de la variedad.

Para las variedades rojas, bicoloreadas o parcialmente rojas, como mínimo, el contenido de sólidos solubles totales debe ser 11% y en firmeza de la pulpa o resistencia a la penetración debe ser 5.0 kg (11 lb), mientras que para las variedades amarillas, amarillas chapeadas y verdes, como mínimo, debe ser 12% y 4.5 kg (10 lb), respectivamente.

Finalmente, es sumamente importante destacar que no existe ninguna especificación dentro de esta normatividad que regule la calidad microbiológica de la manzana para su consumo en crudo y que por ende comprometa al productor en asegurar la inocuidad del producto.

2.1.7. Microbiología

La población microbiana de la manzana se localiza fundamentalmente sobre sus partes externas, y en general se acepta que el interior de la manzana está libre de microorganismos. La flora asociada se encuentra usualmente presente desde su crecimiento, durante la cosecha y transporte hasta su comercialización y/o procesado (Fernández, 2009).

La flora predominante sobre la manzana son hongos, levaduras (en fruta madura 1000 levaduras/g) y bacterias ácido lácticas (si la manzana está deteriorada presenta hasta 10 millones de ufc/g) en virtud del pH ácido que exhibe y su contenido de carbohidratos simples (Fernández, 2009). Aunado a ello la epidermis de la manzana está constituida principalmente por una matriz de polímeros, polisacáridos y ceras que se encargan de conferirle una barrera contra la deshidratación y mantener al margen a los microorganismos, sin embargo, algunos hongos muestran capacidad para degradar esa barrera y en ocasiones afectan severamente la calidad del fruto, lo cual les otorga el carácter de fitopatógenos (Fernández, 2009).

Los principales géneros de hongos deterioradores de manzana son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Botrytis*. Aunado a estos microorganismos, también existen muy variables y diferentes enfermedades que atañen al manzano, en algunas ocasiones pueden matar al árbol, mientras que en otras, se puede infectar todos los frutos y dejarlos no aptos para su comercialización; otras veces la enfermedad puede localizarse en las hojas u otra parte de la planta sin ocasionar pérdidas económicas (Moore *et al.*, 1991).

Si bien es reconocido como tejido estéril el interior de un fruto (Lund, 1992), la presencia de microorganismos patógenos sobre la manzana estará determinada por las prácticas que se implementen, como la fertilización al suelo y las condiciones sanitarias prevalentes, incluido desde su cultivo y cosecha, hasta su comercialización final. En virtud de que el producto fresco podría ser contaminado con patógenos en cualquier punto de la cadena de producción, a partir de una diversidad de fuentes ya sean humanas o animales, esto podría repercutir a la postre sobre la salud del consumidor (Abadias *et al.*, 2006).

2.2. Contaminación por patógenos en frutas

2.2.1. Fuentes y mecanismos

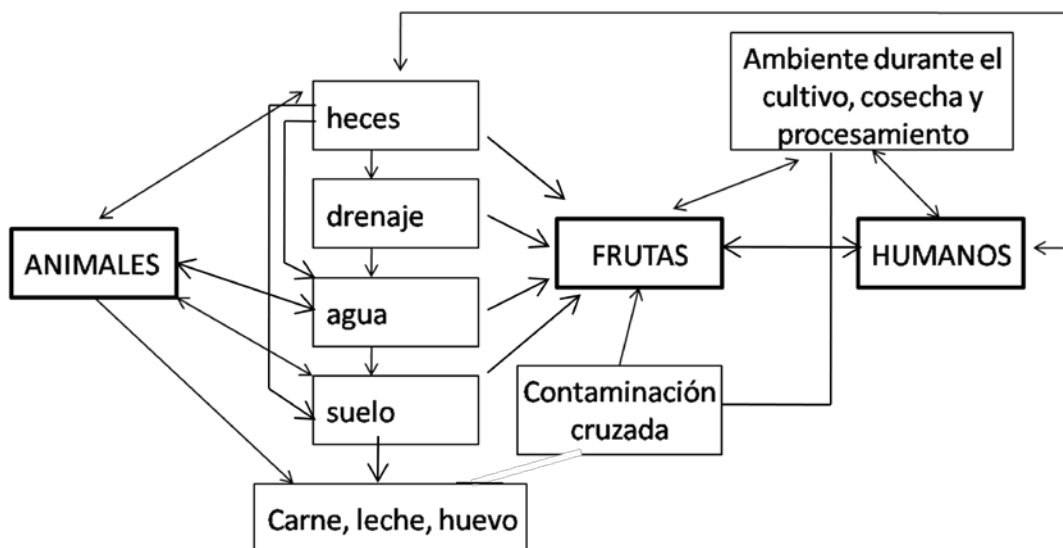
Las frutas como productos frescos son muy susceptibles a contaminarse en cualquier punto de su cultivo, cosecha, procesamiento, distribución, almacenamiento y preparación final a través de una diversidad de fuentes de contaminación. En la etapa de precosecha de las frutas son de interés como fuentes de contaminación la tierra, el agua de riego, la presencia de materia fecal humana o animal, el tipo de abono utilizado, el aire y los agricultores (Beuchat *et al.*, 2002). Mientras que las fuentes de contaminación que destacan en poscosecha son la maquinaria y equipo, los recipientes, animales domésticos y silvestres, los trabajadores, el polvo de la atmósfera y los vehículos (Beuchat, 1996).

En la Tabla 2 se especifican las condiciones medioambientales que influyen en la sobrevivencia y multiplicación de los microorganismos patógenos sobre las frutas. Los microorganismos patógenos pueden llegar a las frutas a través de diversas fuentes y variados mecanismos, en el esquema de la Figura 2 se representan los diferentes escenarios que pueden propiciar la contaminación de frutas.

Tabla 2. Fuentes de contaminación de microorganismos patógenos en frutas crudas

Precosecha	Poscosecha
Heces Suelo Agua de riego Abono inadecuado Aire (polvo) Animales domésticos y salvajes Manejo humano	Heces Manejadores de alimentos (trabajadores o consumidores) Equipo de cosecha Contenedores para transporte (del campo hasta el empacado) el empacado) Animales salvajes y domésticos Aire (polvo) Agua de lavado y enjuague Equipo de clasificación, empaque, cortado y de procesamiento posterior. Hielo Vehículos de transporte Almacenamiento inapropiado (temperatura, medio ambiente físico) Contaminación cruzada (otros alimentos, en almacenamiento, preparación y áreas expuestas) Manejo inadecuado durante la venta al mayoreo y menudeo

(Beuchat, 1996)



(Beuchat, 1996)

Figura 2. Fuentes y mecanismos de contaminación durante la obtención y procesamiento de frutas crudas

Los animales de pastoreo se señalan como una fuente relevante de patógenos, su presencia está directamente relacionada con deposición de heces fecales sobre los sembradíos, en los alrededores o en las fuentes de agua (Tauxe, 1997; Orozco, 2008). Así pues que la superficie de las frutas que se cultivan muy próximas al suelo podría ser contaminada con patógenos de origen fecal como *E. coli* O157:H7, la cual puede permanecer viable en heces de bovino hasta por más de 70 días (Wang *et al.*, 1996).

Las frutas también pueden contaminarse si el agua usada para mezclar insecticidas y otros químicos aplicados directamente en éstas se encuentra contaminada con patógenos provenientes de reservorios animales o humanos (Beuchat, 1996; Bruck *et al.*, 2003).

La contaminación de frutas durante el manejo en poscosecha puede ocurrir si en el enfriado y lavado se emplea agua contaminada con patógenos, durante el transporte desde el campo a los distribuidores o puntos de venta al menudeo, si los camiones, previamente contaminados por el transporte de animales o carne, son usados para transportar frutas sin un adecuado proceso de saneamiento (Beuchat, 1996).

Las condiciones a las cuales los productos frescos están expuestos durante la distribución pueden tener un efecto profundo sobre la inocuidad microbiana (Brackett, 1999), especialmente en lo que se refiere a la contaminación cruzada del producto y el mantenimiento de temperaturas de almacenamiento apropiadas. En un estudio realizado por Janisiewicz *et al.* (1999) demostraron que las moscas de la fruta pueden transmitir *E. coli* O157:H7 a manzanas dañadas no contaminadas lo que hace referencia a contaminación cruzada durante el transporte deficiente de frutas.

Finalmente y previo a su consumo al afectar la integridad de las barreras físicas de las frutas, como la epidermis, durante los procesos de rebanado,

fragmentado, exprimido y pelado que pueden llevarse a cabo durante su procesamiento en una industria, restaurante o cocina se generan condiciones propicias para que un microorganismo que se encontraba sobre su superficie tenga acceso a los nutrientes internos del fruto y pueda proliferar con mayor libertad. Al no existir estas barreras físicas, puede ocurrir la contaminación cruzada desde otros alimentos o desde un manejador infectado, o bien a través del agua o utensilios.

Si microorganismos patógenos a humanos logran penetrar la epidermis de frutas y hortalizas, sobrevivirán los tratamientos de descontaminación como el lavado y la pasteurización superficial con agua caliente o vapor. La internación de bacterias puede ocurrir durante el empacado o procesamiento o bien de manera natural durante la floración o desarrollo del fruto (Bartz *et al.*, 1981; Bartz, 1982; Guo *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2003).

Debido a los niveles extremadamente bajos de patógenos que se han encontrado en frutas y hortalizas frescas, se pensaba que la mayoría de las enfermedades relacionadas a éstas se debían a una contaminación poscosecha. Sin embargo, datos más recientes apuntan a la posibilidad de una interacción precosecha entre microorganismos patógenos y el cultivo de plantas, produciéndose cultivos contaminados durante la cosecha (Erickson *et al.*, 2004; Islam *et al.*, 2004a, 2004h, 2004c, 2004d).

Es esencial señalar que los riesgos de contaminación de frutas se pueden reducir a un mínimo si el productor propicia las condiciones de infraestructura sanitaria y de buenas prácticas agrícolas que provean de protección directa e indirecta contra todas las fuentes posibles de contaminación que se mencionaron en esta sección. Para lograr mejores estrategias de prevención es necesario conocer el comportamiento de los microorganismos patógenos bajo condiciones medio ambientales reales y así abatir la contaminación de frutas frescas con patógenos.

2.2.2. Incidencia y brotes

El consumo habitual de frutas es en crudo debido a que se prefiere su sabor en fresco, esto hace referencia a que las frutas previamente a su ingesta no reciben ningún tratamiento terminal contra una posible contaminación de origen microbiano. Aunado a ello, es importante destacar que los productos frescos están expuestos a toda una serie de fuentes de contaminación con microorganismos patógenos antes, durante y después de su cosecha, lo cual agrava profundamente el panorama general para conseguir su inocuidad microbiana hasta llegar al consumidor final (Beuchat, 1996).

Investigaciones llevadas a cabo por la FDA (1999) en Estados Unidos durante la comercialización de frutas frescas demostraron la presencia de microorganismos patógenos, bacterias, parásitos y virus, capaces de causar enfermedad. Su presencia ya ha sido previamente documentada por diversos autores, por mencionar ejemplos Beuchat (1996) y Francis *et al.* (1999). La microflora superficial predominante fueron bacterias lácticas, hongos y levaduras deterioradoras.

Desde hace varias décadas hasta la actualidad la incidencia de patógenos a humanos en frutas frescas se ha convertido en una preocupación global creciente, dado que se han reportado una gran cantidad de brotes de enfermedad que involucran su consumo como productos crudos. De manera puntual, en Estados Unidos, se le atribuye a *Salmonella* varios brotes de por consumo de frutas y sus derivados: a sandías precortadas (CDC, 1979), a melones (Beuchat, 1996; CDC, 2008; CDC, 2011) y jugo de naranja no pasteurizado (Parish, 1996).

En la Tabla 3 en la que se hace un breve recuento histórico de numerosos brotes de enfermedad asociados a diversos patógenos por consumo de frutas frescas, destacando principalmente *Salmonella* con una diversidad de serotipos reportados.

Tabla 3. Patógenos implicados en brotes de enfermedad asociados al consumo de frutas frescas

Año	Agente etiológico	Alimento implicado	Personas afectadas	Referencia
1950	<i>Salmonella</i> spp.	Sandía	6	Blostein, 1993.
1954	<i>Salmonella</i> Miami	Sandía	17	Gayler <i>et al.</i> , 1955.
1979	S. Oranienburg	Sandía	18	CDC, 1979.
1987	Virus de Norwalk	Melón	206	Lund, 2000.
1989	Virus de Hepatitis A	Frambuesa		Ramsey <i>et al.</i> , 1989.
1990	S. Chester	Melón	>245 (25,000 estimados)	CDC, 1991; Lund, 2000.
1990	Virus de Norwalk	Ensalada de fruta*	217	Herwaldt <i>et al.</i> , 1994.
1991	S. Poona	Melón	>400	CDC, 1991.
1991	S. Javiana	Sandía	39	Blostein, 1993.
1992	<i>E. coli</i> (enterotoxigénica)	Jugo de naranja	6	Singh <i>et al.</i> , 1995.
1992	Virus de Hepatitis A	Fresas		Niu <i>et al.</i> , 1992.
1993	<i>E. coli</i> O157:H7	Melón	9	Del Rosario and Beuchat 1995.
1995	S. Gaminera, S. Hartford, S. Rubislaw	Jugo de naranja	69	CDC, 1995; Cook <i>et al.</i> , 1998.
1997	S. Saphra	Melón	24	Mohle-Boetani <i>et al.</i> , 1999.
1998	S. Oranienburg	Melón	22	Deeks <i>et al.</i> , 1998.
1998	<i>Cyclospora</i>	Frambuesas		CDC, 1998.
1998	<i>E. coli</i> O157:H7	Ensalada de fruta	50	Tauxe, 1999.
1999	S. Typhi	Mamey	13	Lund, 2000.
1999	S. Muenchen	Naranja	300	CDC 1999a
1999	S. Typhimurium	Naranja	405	CDC, 2000.
2000	S. Poona	Melón		CDC, 2000.
2000	S. Enteritidis	Jugo de cítricos	14	Butler, 2000.
2003	<i>Salmonella</i> spp.	Melón	182	CDC, 2004a.
2003	<i>Salmonella</i> spp.	Fresa, Mango	30	CDC, 2004b.
2011	S. Agona	Papaya	106	CDC, 2012.
2011	S. Panama	Melón	20	CDC, 2012.
2012	S. Typhimurium	Melón	178	CDC, 2012.

* Piña, Papaya, Sandía y Melón.

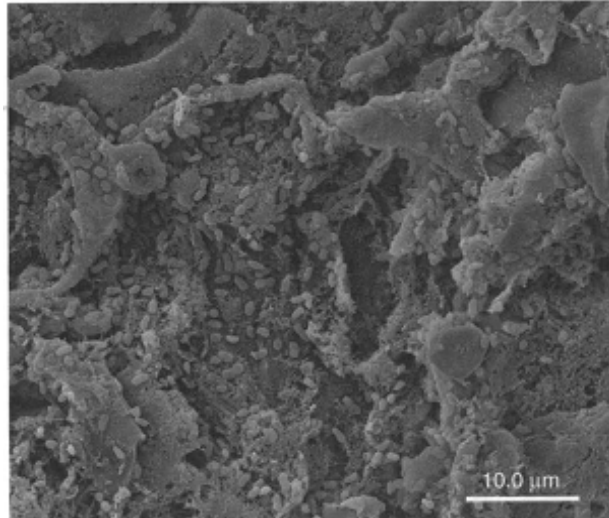
Como resultado de un brote causado por *S. Saphra* (1997) asociado al consumo de melón, la FDA analizó muestras de melones importados y resultaron, aproximadamente, el 5% positivos a *S. entérica* (FDA, 2001b). El consumo de los melones importados de México fue responsable de tres brotes sucesivos (2000 a 2002) de salmonelosis y llevó a la FDA a emitir una alerta de importación, detener todos los melones procedentes de nuestro país (FDA, 2002).

En 1999 la FDA llevó a cabo un estudio en donde se colectaron 1,003 muestras de frutas y verduras crudas importadas a Estados Unidos. Observaron que el 96% fueron negativas a la presencia de patógenos (*E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Shigella*). La incidencia de *Salmonella* en todos los productos analizados fue de 3.5% y el melón fue reportado como uno de los productos con mayor frecuencia de los patógenos analizados (1.6 % positividad a *E. coli* O157:H7, 1.1% positividad a *Salmonella* y 0.6% positividad a *Shigella*).

Como resultado de la cantidad y frecuencia de brotes de salmonelosis que han sido relacionados con el consumo de melón se acrecentó el interés en la comunidad científica por entender los mecanismos que permiten a los microorganismos patógenos prevalecer sobre el fruto. En ese sentido ha sido ampliamente estudiado que la adhesión celular a sitios inaccesibles, tales como la corteza, junto con la formación de una biopelícula es probablemente una de las causas de la resistencia bacteriana a desinfectantes (Annous *et al.*, 2004). Por ejemplo, se sabe que una vez adheridas las células de *Salmonella*, el desarrollo y crecimiento de la biopelícula es debido a la excreción de polisacáridos después de 24 horas de almacenamiento a 10 ó 20 °C (Annous *et al.*, 2004, 2005b).

Ukuku y Sapers (2001) realizaron estudios con desinfectantes sobre melones para probar su eficacia en contra de *S. entérica*, sin embargo, ninguno de los utilizados fue capaz de eliminarla o de inactivarla. Posterior a ello se llevó a cabo una investigación acerca de su capacidad para formar biopelículas en superficies de melón con microscopía electrónica de barrido (MEB), la cual indicó

la formación de una biopelícula rápidamente después de la inoculación de las células en la corteza (Annous *et al.*, 2004, 2005b). El material fibrilar se podía ver en la corteza del melón después de sólo dos horas después de la inoculación y secado a 20 °C (Figura 3).



Annous *et al.*, 2005b.

Figura 3. Micrografía electrónica de barrido mostrando la formación de una biopelícula por células de *S. Michigan* en la corteza de melón

En virtud al bagaje de brotes asociados al consumo de frutas se refleja la importancia del estudio epidemiológico para generar información que permita lograr enfoques preventivos eficaces que permitan abatirlos. Se distinguen los siguientes microorganismos en la inocuidad de frutas crudas: *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* O157:H7, virus y parásitos como principales agentes implicados en los brotes mencionados. Además es importante destacar que *Salmonella* con sus diversos serotipos fue el agente etiológico con mayor número de brotes reportados y personas afectadas. Lo cual genera la necesidad de hacer estudios enfocados a profundizar en el comportamiento del patógeno sobre los frutos y generar información para poder prevenir con mayor certeza estos sucesos lamentables.

2.2.3 Brotes asociados al consumo de manzana y sus productos

La manzana cruda no ha sido considerada como una fruta potencialmente asociada a causar enfermedades. Su nivel de pH (3.7) y composición de ácidos orgánicos (aprox. 0.39 %) presuponen un medio adverso para la sobrevivencia o crecimiento de bacterias patógenas (Keller, 2004). Sin embargo, existen incidentes asociados al consumo de sidra y jugo de manzana sin pasteurizar. En la Tabla 4 se resumen los brotes reportados por el consumo de sidra y de jugo de manzana sin pasteurizar.

Tabla 4. Brotes asociados a consumo de sidra y jugo de manzana sin pasteurizar

Año	Agente patógeno	Origen de la fruta	Casos	Referencia
1922	<i>S. Typhi</i>	Francia	23	Paquet, 1923.
1974	<i>S. Typhimurium</i>	Nueva Jersey	296	CDC, 1975.
1980	<i>E. coli</i> O157:H7	Canadá	15 (14 SUH, 1D)	Steele, 1982.
1991	<i>E. coli</i> O157:H7	Massachusetts	23 (4 SUH)	Besser, 1993.
1993	<i>Cryptosporidium</i>	Maine	213	Millar, 1994.
1996	<i>C. parvum</i>	Nueva York	20 ^a , 11 ^b	CDC, 1997c.
1996	<i>E. coli</i> O157:H7	Connecticut	14 (4 SUH, y 1 PTC)	CDC, 1997c.
1996	<i>E. coli</i> O157:H7	Washington	6	Farber, 2000.
1996	<i>E. coli</i> O157:H7	Estados Unidos	70 (14 SUH y 1D)	CDC, 1996b; Cody, 1999
1998	<i>E. coli</i> O157:H7	Ontario, Canadá	14	Tamblyn, 1999
1999	<i>E. coli</i> O157:H7	Oklahoma	7	Farber, 2000.

^a Confirmados

^b Sospechosos

SUH. Síndrome Urémico Hemolítico

PTC. Púrpura Trombocitopénica

D. Decesos

Aunque el bajo pH de jugos no pasteurizados parecería ser un impedimento para la sobrevivencia de patógenos, existen estudios que han confirmado la capacidad de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 de sobrevivir e incluso crecer (bajo ciertas condiciones) en jugos de frutas (Zhao *et al.*, 1993; Parish *et al.*, 1997; Sharma, 2000). Para *S. Typhimurium*, se han identificado dos sistemas de tolerancia a mayores condiciones ácidas, una asociada con la fase log y la otra a

la fase estacionaria (Bang, 2000). La sobrevivencia de *S. Typhimurium* en el jugo de manzana por periodos extendidos ha sido observada. Goverd y colaboradores, 1979, reportaron sobrevivencia de *S. Typhimurium* en sidra con pH 3.6 incubada a 22 °C hasta por 30 días; la sobrevivencia de *S. Typhimurium* decrece a pH más ácido y temperaturas más bajas.

Los factores propiciadores que con mayor frecuencia se señalaron para los brotes asociados a consumo de sidra y jugo de manzana sin pasteurizar se conjuntaron en la Tabla 5.

Tabla 5. Factores propiciadores de brotes asociados a consumo de sidra y jugo de manzana sin pasteurizar

Factor	Frecuencia
Fauna cercana al lugar de origen de la fruta	6
Lavado o desinfección inadecuado	4
Uso de agua no potable	4
Frutos recolectados del suelo	3
Uso de frutos dañados	2
Uso de frutos sin lavar	1

2.4. Salmonelosis

2.4.1 Generalidades

La salmonelosis es una de las principales causas de gastroenteritis en humanos de manera universal, tiene como agente etiológico causal a *Salmonella* spp. La salmonelosis es un proceso infeccioso cuyo cuadro clínico varía desde formas severas que terminan fatalmente, hasta molestias menores: gastroenteritis aguda con cefalalgia, dolores abdominales súbitos, diarrea, náuseas, fiebre y vómitos. La bacteria tiene un periodo incubación de 6 a 72 horas, generalmente entre 12 a 36 horas y la gastroenteritis persiste desde 24 a 72 horas. La dosis infectiva es de 10⁵ a 10⁸ microorganismos (Fernández, 2009).

Los reservorios de *Salmonella* de mayor relevancia para el humano los constituyen principalmente personas y animales domésticos infectados, aguas y alimentos contaminados, siendo estos últimos el principal modo de transmisión (Fernández, 2009).

Las infecciones por *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* son una causa importante de morbilidad especialmente en niños y personas inmunocomprometidas. En Estados Unidos, el CDC reporta que estos serotipos afectan aproximadamente 2 a 3 millones de personas y causan entre 500 a 2 000 muertes cada año, se estima que la cifra real de casos está muy por encima de los registros (Lampel *et al.*, 2012).

En México, durante 1998, los casos por salmonelosis registrados fueron 215,155 con una tasa de 223.53 por 100,000 habitantes, con una mayor incidencia en los grupos de 15 a 24 años, de 25 a 44 años y de 45 a 64 años, siendo el segundo, el grupo más afectado. Para el año 2003 la paratifoidea y otras salmonelosis ocuparon el 4° lugar entro de todas las causas de enfermedad con 103,815 casos e incidencia de 99.62 %, mientras que en el 2008 ocupó el 19no. lugar dentro de las principales causas de enfermedad (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000; SSA, 2009).

En el 2009 la SSA reveló que el número de casos de salmonelosis anuales en México es muy alto comparado con el número de aislamientos por *Salmonella*, y esto es debido a que el diagnóstico se lleva a cabo en la mayoría de los casos sólo por clínica, por lo que es importante realizar el diagnóstico de laboratorio tanto en muestras clínicas como de alimentos y muestras ambientales, ya que esto servirá para conocer la incidencia de los serotipos en diferentes fuentes y relacionar los serotipos encontrados en alimentos con los aislados de muestras clínicas. Los serotipos más frecuentes aislados en México tanto en muestras humanas como no humanas son 5: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Derby*, *S. Agona* y *S. Anatum* (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000).

2.4.2 *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia de *Enterobacteriaceae* y se constituye por 2 subespecies: *S. bongori* y *S. enterica*, las cuales a su vez se conforman en subespecies. *S. enterica* posee 6 subespecies: *S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae* y *S. indica*. A su vez las subespecies de *S. enterica* y *S. bongori* se dividen en más de 2579 diferentes serovariedades o serovares, hasta el 2007. La clasificación de *Salmonella* está basada en el primer esquema de tipificación publicado en 1934 por Kaufmann-White, generado en función de las diferentes asociaciones de los factores antigénicos superficiales de *Salmonella*: somáticos (O), que son lipopolisacáridos, y flagelares (H), constituidos por proteínas (Lampel *et al.*, 2012).

Salmonella es una bacteria anaerobia facultativa, bacilo Gram negativo, no esporulada, posee motilidad debido a sus flagelos peritricos (excepto *S. gallinarum* y *S. pullorum*), sus dimensiones promedio oscilan entre 0.7 - 1.5 µm de ancho por 2 a 5 µm de largo. (D'Aoust *et al.*, 2007; Lampel *et al.*, 2012). Las principales características bioquímicas de esta bacteria se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Principales características bioquímicas de *Salmonella*

Prueba bioquímica	Resultado
Fermentación de lactosa	- ^a
Fermentación de glucosa	+
Producción de ácido sulfhídrico	+
Producción de gas	+ ^b
Degradación de urea	-
Producción de indol	-
Decarboxilación de lisina	-
Decarboxilación de ornitina	-

a. Excepto *S. arizonae* y *S. diarizonae*.

b. Excepto *S. Typhi*.

La capacidad de *Salmonella* spp. para adherirse y entrar a las células del epitelio intestinal es un paso esencial en el ciclo de vida de estos microorganismos, esta propiedad determina la virulencia en *Salmonella*, y está

localizada en un grupo de genes en la denominada isla de patogenicidad 1 (SPI-1) (Espinal *et al.*, 2006). El proceso de adaptación al huésped *Salmonella* spp. ha generado una variedad de mecanismos para colonizar, invadir, replicar y sobrevivir dentro del huésped.

La importancia de esta región cromosomal en diferentes serotipos de *Salmonella* radica en la presencia y funcionalidad del gen *invA*, que codifica un componente esencial del aparato de secreción de proteínas asociadas con la invasión. El gen *InvA* es un blanco ideal para la aplicación de métodos moleculares basados en la PCR, que permiten detectarlo en aguas y alimentos y distinguir entre aislamientos bacterianos patogénicos y no patogénicos. Este gen se encuentra en serotipos de *Salmonella* y puede estar ausente en muestras ambientales con una virulencia reducida que no está asociada con enfermedad (Espinal *et al.*, 2006).

2.6. Biopelículas

2.6.1 Formación de una biopelícula

Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos adheridos a una superficie, mediante una unión irreversible. Los microorganismos se encuentran incrustados en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que algunos de ellos producen, y pueden exhibir un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y la transcripción de ciertos genes (Donlan *et al.*, 2002).

La primera etapa para la actividad microbiana en una superficie es la adhesión. La adhesión ocurre en dos etapas: adhesión primaria a través de fuerzas físicas, la situación es reversible está mediada por un fuerzas de Van der Waals, una repulsión electrostática y las interacciones hidrofóbicas; la segunda etapa es la adhesión irreversible, depende del tiempo que le tome a la bacteria para formar un exopolímero (Costerton *et al.*, 1987). En la Figura 4 se ilustran las etapas que constituyen la formación de una biopelícula bacteriana. Una vez que

las células se han fijado irreversiblemente se inducirá la colonización mediante la multiplicación microbiana y la producción de polímeros extracelulares, constituidos principalmente de carbohidratos; los exopolisacáridos principalmente le conferirán protección y acumulación de nutrientes a los microorganismos de la biopelícula.

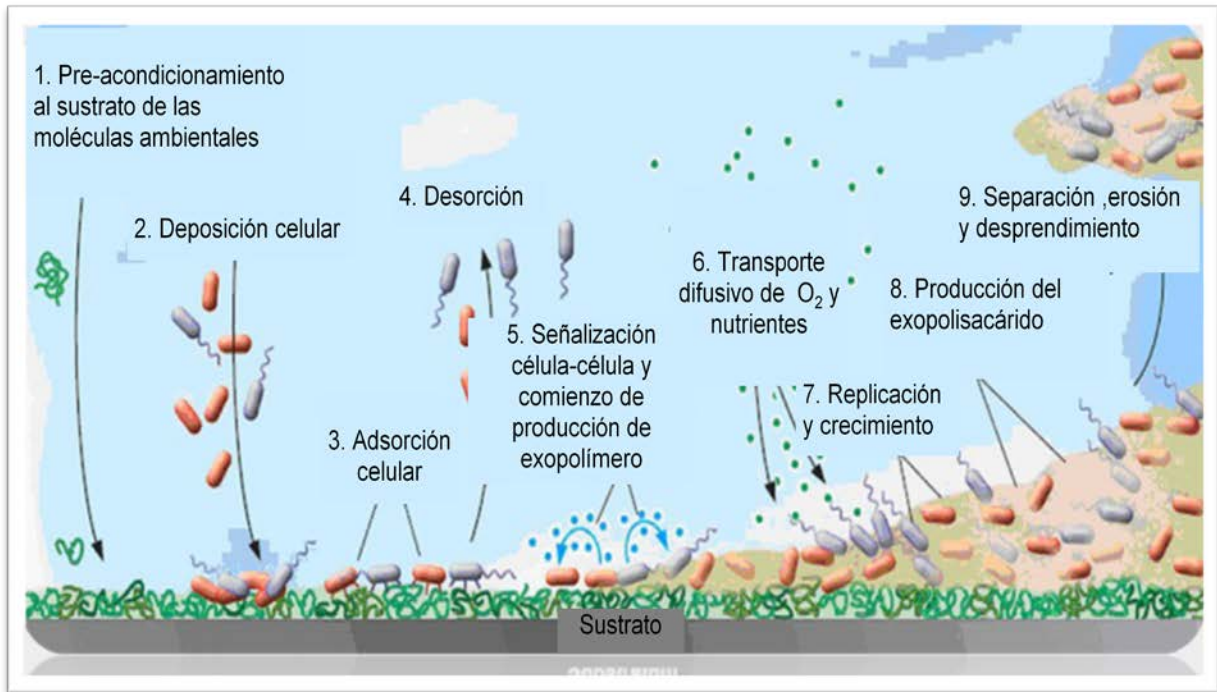


Figura 4. Etapas de la formación de una biopelícula bacteriana

Las células presentes en las biopelículas son muy diferentes de sus contrapartes aisladas en términos de fisiología y en su respuesta al estrés ambiental (Donlan *et al*, 2002). La mayoría de los estudios sobre biopelículas se han realizado con las bacterias que habitan en superficies inertes. Sin embargo, estudios recientes también se han centrado en la formación de biopelículas en superficies bióticas (incluyendo tejidos animales y vegetales) con el fin de discernir las interacciones entre el microorganismo y el huésped (Donlan *et al*, 2002).

La formación de biopelículas en la superficie de frutas es probablemente una estrategia de supervivencia de las células bacterianas contra las adversidades

del medio ambiente, cambios de temperatura, desecación, rayos UV, estrés oxidativo, además de la exposición a compuestos antimicrobianos.

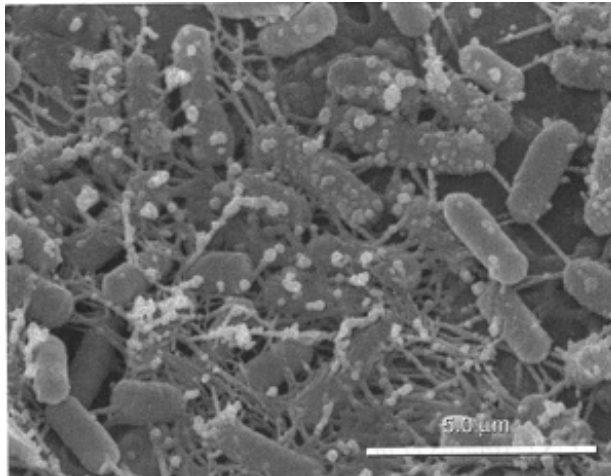
La presencia de los microorganismos en las biopelículas puede ponerse de manifiesto mediante microscopía electrónica de barrido y epifluorescencia. Sobre el proceso de adhesión de bacterias a superficies se dispone ahora de información más consistente. Las cepas virulentas de *Salmonella* producen un agregado de fimbrias como componente del material estructural de la película, cuya resistencia se ve favorecida con la síntesis de celulosa por la propia bacteria (Fernández, 2009).

La capacidad de *Salmonella* para sobrevivir en una variedad de ambientes puede estar relacionada con su capacidad de colonizar las superficies de plantas y producir biopelículas. Brandl y Mandrell (2002) investigaron la capacidad de *S. Thompson* para formar biopelículas en cilantro.

2.6.2. Biopelículas en manzana

Los brotes de *E. coli* O157:H7 que se han registrado en las últimas décadas por consumo de sidra y jugo de manzana no pasteurizados han generado un especial interés en la sobrevivencia de estas bacterias durante el proceso de producción de estos alimentos. La sobrevivencia de este microorganismo ante procesos de lavado y desinfección del fruto puede deberse a su adhesión al fruto en zonas inaccesibles de la manzana, sus extremos superiores (pedúnculo) e inferiores hundidos, a la infiltración en el canal de cáliz o el corazón de esta (CDC, 1996., CDC, 1997., Sapers *et al.*, 2002; Fatemi *et al.*, 2006) o en la parte superficial.

Burnett *et al.* (2000) demostraron en un estudio de MEB del tallo y las áreas de cáliz que células de *E. coli* O157:H7 fueron capaces de penetrar en el corazón de la manzana y formar biopelículas en la región del tallo y cáliz (Figura. 5).



Burnett *et al.*, 2000

Figura. 5 MEB que muestra una biopelícula de *E. coli* O157:H7 en el área del cáliz de manzana 'Golden Delicious' inoculada artificialmente

Como se mencionó previamente la formación de biopelículas en la superficie de frutas es probablemente una estrategia de sobrevivencia de los patógenos contra las adversidades del medio ambiente (Brandl, 2006; Fernández, E., 2009).

2.7. Control de contaminación de microorganismos patógenos en frutas

En muchas regiones del mundo las prácticas actuales de agricultura no aseguran la producción de frutas libres de microorganismos patógenos. Así pues, para minimizar el riesgo de infección asociado con el consumo de frutas crudas, las fuentes potenciales de contaminación deben ser identificadas e implementar medidas específicas para su prevención desde su producción en el campo hasta la mesa. Como un complemento a las buenas prácticas agrícolas se emplea la aplicación de los tratamientos de descontaminación. En situaciones sumamente adversas y en las cuales la posibilidad de contaminación no puede ser excluida deberá considerarse la aplicación de los tratamientos de descontaminación más efectivos (Beuchat *et al.*, 2002).

Para entender el problema de la descontaminación de frutas mediante el lavado y el uso de desinfectantes químicos debe tomarse en cuenta no sólo la cantidad de carga microbiana inicial en las frutas crudas sino también la manera en la cual los microorganismos se adhieren y sobreviven sobre las superficies de estos alimentos. La condición de la microflora adherida dependerá, en muchos casos, de cómo y cuando el alimento fue contaminado. Generalmente es más difícil descontaminar las frutas que evitar su contaminación, así pues frente al problema de la adhesión y sus consecuencias la mejor medida a la que puede recurrirse e a la prevención de la formación de biopelículas, ya que una vez conformadas su remoción se dificulta en gran consideración (Sapers, 2003).

La prevención de la contaminación en frutas a lo largo de la cadena de producción se puede lograr mediante la implementación de programas como el de Buenas Prácticas Agrícolas o la aplicación de los principios del sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) (Beuchat, 2002).

La implementación del programa de Buenas Prácticas Agrícolas durante las operaciones de siembra, cosecha, selección, embalaje y almacenamiento de las frutas frescas es fundamental para prevenir la contaminación con patógenos. Los principales temas de interés concernientes a la implementación de un programa de Buenas Prácticas Agrícolas son: uso anterior del terreno, usos de terrenos adyacentes, calidad del agua y prácticas de uso, manejo de la fertilidad del suelo, control de animales salvajes, de plagas y de alimañas (sabandijas), las áreas destinadas a la higiene y los baños de los trabajadores, así como las prácticas de cosecha y enfriado (FAO, 2002).

La limpieza y desinfección de frutas son un conjunto de acciones encaminadas a asegurar la calidad e inocuidad de los alimentos, es decir, garantizar que no causarán daño al consumidor cuando se preparan y/o se consuman de acuerdo con el uso a que se destinan (Walker *et al.*, 2005; OMS, 2009).

La población microbiana puede reducirse de 10 a 100 veces con la aplicación de tratamientos de desinfección con compuestos químicos. Los virus y quistes de protozoarios en frutas generalmente exhiben una mayor resistencia a los desinfectantes que las bacterias y hongos. Sin embargo, la resistencia relativa de los microorganismos varía considerablemente con el tipo y pH del desinfectante, tiempo de contacto, temperatura y las propiedades físicas y químicas de la superficie de las frutas. Se conoce poco acerca de la eficacia de los desinfectantes en relación al tipo de superficie de frutas, pues se sabe que la presencia de cutículas gruesas y rugosas favorece el proceso de adhesión de células bacterianas y si las condiciones son propicias, la formación de biopelículas y como consecuencia la efectividad de los tratamientos químicos se ve mermada (Beuchat, 2002).

2.7.1. Inactivación química de patógenos

El lavado y desinfección de frutas durante su procesamiento es una práctica común. Estos tratamientos suelen aplicarse por inmersión del producto en tanques o bien por aspersion en bandas transportadoras. Sin embargo, si no se emplea agua de buena calidad microbiológica lejos de ser tratamientos que reduzcan la contaminación puede convertirse en una etapa que permite el ingreso de microorganismos patógenos. Se ha encontrado que las bacterias presentes en el agua de lavado pueden penetrar en las frutas bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, cuando los productos son llevados del campo a la planta donde se procesan y son sometidos a enjuagues con agua fría. El gas contenido en su interior se contrae, creando un vacío parcial que provoca que el agua difunda hacia adentro del fruto a través de canales o poros. Si el agua empleada en el enjuague contiene microorganismos patógenos a humanos capaces de causar deterioro también serán arrastrados al interior de la fruta (Bartz *et al*, 1981; Buchanan *et al.*, 1999).

Los frutos tienen una vida de anaquel corta en gran medida por la actividad microbiana y al ataque de hongos. Dado que el agua no remueve completamente la carga bacteriana es necesario el uso de agentes como el hipoclorito de sodio, dióxido de cloro, bisulfito de sodio, dióxido de sulfuro, ácidos orgánicos, entre otros. (Jasso, 2008).

Adicionalmente, la eficacia de los agentes germicidas depende de diversos factores, entre ellos la rugosidad de la superficie, la concentración del germicida y el tiempo de contacto, la carga microbiana inicial, la presencia de biopelículas, la presencia de materia orgánica y el pH (Sapers *et al.*, 2000).

Se han reportado estudios sobre tratamientos de desinfección que producen un máximo de 3 Log UFC de reducción en los niveles de *E. coli* en manzana, bajo condiciones de lavado con agua, detergentes o desinfectantes (Sapers *et al.*, 2000, 2002). Sin embargo, estos mismos tratamientos de lavado mediante la utilización de una lavadora comercial de cepillo plano produjeron menos de una reducción de 1 Log UFC en la población de *E. coli* O157:H7 sobre manzana (Annous *et al.*, 2001).

2.7.3.1. Soluciones de hipoclorito

Las soluciones de hipoclorito de sodio (NaClO) son de los agentes químicos de desinfección más utilizados para frutas y hortalizas crudas, generalmente en una concentración de 50 a 200 mg de cloro/L (Issa-Zacharias *et al.*, 2011). La actividad antimicrobiana de los compuestos clorados depende de la cantidad de cloro disponible como ácido hipocloroso no disociado (HClO) en el agua que se pone en contacto con las células microbianas. Reaccionan mediante sustitución formando cloraminas con las aminas y derivados clorados con los fenoles (Pirovani, 2004). Es un germicida de gran efectividad y amplio espectro, de fácil preparación, aunque entre las desventajas del hipoclorito de sodio se encuentran: que es un agente corrosivo e irritante, y que puede ser inactivado en presencia de materia orgánica.

Desinfecciones con soluciones de hipoclorito sobre productos artificialmente contaminados han demostrado discretas reducciones en la población de los patógenos inoculados. En un estudio realizado por Sapers *et al.* (1999) sobre manzanas inoculadas con 7 log de *E. coli* se obtuvieron reducciones de 2 log del patógeno mediante inmersión en solución con cloro 200 ppm. En otro estudio que buscaba evaluar la eficacia del lavado y desinfección para frutas y hortalizas se obtuvieron reducciones entre 1 - 2 log de *E. coli* al aplicar 200 ppm de cloro activo durante 2 min (Sapers, 2001).

2.7.3.2. Ácido peroxiacético

El ácido peroxiacético es un desinfectante producido por la reacción entre el ácido acético y el peróxido de hidrogeno, pese a su olor desagradable es de alta eficiencia y de segura biodegradabilidad (Jasso, 2008).

Este compuesto tiene un amplio espectro contra bacterias, hongos y levaduras. Su mecanismo de acción consiste en oxidar los grupos SH libres de las enzimas de los microorganismos y causar estrés oxidativo (Fernández, 2009). Este agente altamente oxidante es utilizado como desinfectante de superficies, así como de frutas, verduras, carnes y huevos (Kasková *et al.*, 2007).

La efectividad de estos compuestos depende de la presencia de sólidos, de la dureza del agua utilizada, de la temperatura de aplicación y del tiempo de contacto (Chmielewski *et al.*, 2003).

2.7.3.3. Agua electrolizada

El agua electrolizada es empleada para limpieza y desinfección de superficies de equipos y productos hortofrutícolas (Walker *et al.*, 2005; Issa-Zacharias *et al.*, 2011).

La tecnología para generar el agua electrolizada se utilizó por primera vez en la industria de alimentos en los años 1900 por Japan Soda Industry Association una industria refresquera, aunque fue comercial hasta la década de los 80's. A través de los años los equipos han sufrido cambios importantes, principalmente enfocados en disminuir el tamaño y aumentar la eficiencia (Al-Haq *et al.*, 2005). Para la producción del agua electrolizada solo se necesita agua potable, cloruro de sodio y el equipo, el cual se encuentra disponible con cierta facilidad.

Se ha demostrado que el agua electrolizada tiene un fuerte efecto bactericida contra la mayoría de las bacterias patógenas y deterioradoras, hongos y levaduras (Al-Haq *et al.*, 2005). También se ha probado su efecto sobre microorganismos endógenos e inoculados en frutas y hortalizas, en forma libre o en la formación de biopelículas (Deza *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2005a; Japakaset *et al.*, 2006; Issa-Zacharias *et al.*, 2010).

La mayor ventaja del agua electrolizada es que consiste en un sistema de agentes antimicrobianos amigable con el ambiente, es decir, debido a la baja concentración de cloro residual y a que es inactiva cuando es diluida con agua corriente no causa un daño significativo al medio ambiente. Otras ventajas es que se reducen al mínimo los riesgos relacionadas con el transporte y almacenamiento (Liao *et al.*, 2007).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar la capacidad de *Salmonella* spp. para colonizar genotipos seleccionados de manzana de la Sierra de Querétaro y su inactivación mediante la aplicación de tratamientos de desinfección.

3.2. Objetivos específicos

1. Aislar cepas de *Salmonella* spp. de frutos y ambiente de una huerta de manzanas.
2. Determinar la capacidad de *Salmonella* spp. para colonizar y formar biopelículas en genotipos seleccionados de manzana.
3. Evaluar el efecto de la humedad relativa y la temperatura en la colonización de genotipos seleccionados de manzana.
4. Evaluar la eficiencia de desinfectantes para inactivar *Salmonella* spp. en biopelículas sobre manzana.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Materiales, equipos y reactivos.

4.1.1. Equipos e instrumentos

- Balanza granataria, sensibilidad 0.1 g OHAUS®, modelo CT200-S
- Baño maría con termostato, Arfrank ®, Mod. 91
- Cámara Kodak®, Edas® 290
- Campana de flujo laminar, Alder®, Veco®
- Centrífuga Heraeus®
- Fuente de poder para electroforesis AmerchamPharmaciaBiotech® EPS301
- Incubadora con refrigeración (a 5, 15, 22, 35°C), PrecisionScientific®
- Potenciómetro, Hanna Instruments®, pH 211 Microprocessor pH Meter®
- Refrigerador REVCO®, ThermoScientific®
- TermocicladorTech-gene®, Mod. 512
- TransiluminadorHoeffler®, Mod. 115VAC
- Materiales e instrumentos de uso común en el laboratorio de microbiología

4.1.2. Medios de cultivo

- ✓ Agar lisina descarboxilasa, Difco ®
- ✓ Agar sulfito-bismuto, Difco®
- ✓ Agar soya tripticaseína (AST), Difco®, Dibico®
- ✓ Agar triple hierro azúcar, Difco®
- ✓ Agar XLD, Difco®
- ✓ Caldo neutralizante, Difco®
- ✓ Caldo soya tripticaseína (CST), Difco®, Dibico ®
- ✓ Medio rappaport – vassiliadis, Difco ®
- ✓ Medio tetracionado, Difco ®
- ✓ Diluyente de peptona 0.1% (DP), Bacto®, Dibico®

4.1.3. Reactivos

- ❖ Antisuero Polivalente (Poli A – I & Vi)
- ❖ Agarosa de bajo punto de fusión, BioRad®
- ❖ Agua activada desy, Grupo ECORUS®
- ❖ Alcohol etílico absoluto, Reactivos Monterrey®
- ❖ Bromuro de etidio a 1 ppm
- ❖ Cloruro de sodio, J.T.Baker.
- ❖ Cloro, Química Vita®
- ❖ Marcador de peso molecular, DNA 100 pb Invitrogen®
- ❖ Nobac Citrus, Grupo Bondex®
- ❖ Persan 15, Química Vita®
- ❖ Platinum supermix, Promega®.

4.2. Material biológico

4.2.1. Manzanas

Las manzanas se obtuvieron del huerto experimental ubicado en la comunidad El Suspiro, Mpio.de Cadereyta, Querétaro. Localizado a una latitud de 20° 42' 00" LN y una longitud de 99° 49' 00" LO, con una altura sobre el nivel del mar de 240 m, temperatura media anual de 14.3 °C y una precipitación pluvial media anual de 724 mm en 2006 (García, 1998., CEA Querétaro, 2011). El huerto presenta una pendiente de 40%, con 500 árboles plantados en terrazas individuales establecidos a una distancia variable (de 3 x 5 m a 5 x 5 m) y es de temporal.

Los cultivares de estudio fueron:

- ❖ **'Rayada' o 'Tempranera'**, el fruto es de chico a mediano, de color rojo claro, estriado, fondo verde-amarillo, de pulpa firme, blanca, crujiente y jugosa, y de óptimas características gustativas. Su principal atributo es su maduración temprana, ya que se cosecha en junio y julio.

- ❖ **'Red Delicious'**, su fruto es grande, alargado, firme, crujiente y jugoso, de color rojo brillante con rayas rojas sobre 25 a 50 % de su superficie. Se cosecha en agosto y septiembre.

- ❖ **'Golden Delicious'**, la forma del fruto es cónica, su cáscara es amarilla verdosa con pequeños puntos oscuros llamados lenticelas, su carne es jugosa, crujiente, dulce y aromática. Se cosecha de agosto a septiembre.

4.2.2. Cepas microbianas

Para los estudios preeliminaros se emplearon cepas del género *Salmonella*, serovares: Agona, Montevideo, Thompson y Typhimurium obtenidas de la colección del Laboratorio de Microbiología e Inocuidad de los Alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro; y dos cepas de *Salmonella* spp. aisladas a partir de composta, en un estudio previo realizado por Arias (2011). Para los estudios posteriores se utilizaron: tres cepas aisladas del huerto experimental de "El Suspiro", una cepa de *Salmonella* spp. aislada de composta y *S. Typhimurium*, se utilizaron en mezcla y de manera individual. Se indujo resistencia a rifampicina a todos los serovares utilizados de acuerdo al método señalado por Kaspar y Tamplin (1993). Los cultivos se mantuvieron en caldo soya tripticaseína con 15% de glicerol a -20°C.

4.3. Métodos

4.3.1. Cosecha del fruto

Las manzanas 'Golden Delicious', 'Rayada' y 'Red Delicious' se cosecharon en su madurez fisiológica aparente, manualmente y se empacaron en cajas para almacenarlas a 3 ± 1 °C (-1 a 4 °C, recomendada) con humedad relativa de 95% (Álvarez, 1996).

4.3.2. Aislamiento de cepas de *Salmonella* de frutos y ambiente de la huerta de manzanas

Se investigó la presencia de *Salmonella* en muestras ambientales (suelo y materia fecal) y en frutos de los genotipos: 'Golden Delicious', 'Rayada' y 'Red Delicious' mediante la técnica de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) específica para *Salmonella* spp. El aislamiento de cepas a partir de las muestras que resultaron positivas a esta técnica se efectuó por el método tradicional de detección de *Salmonella*.

Se realizaron siete muestreos periódicos durante un lapso de dos meses y una semana en el huerto, en ellos se tomaron muestras de: manzanas 'Golden Delicious', 'Rayada' y 'Red Delicious' compuestas por tres unidades cada una, respectivamente, siendo recolectadas directamente del árbol y del suelo; también se analizaron muestras de suelo y materia fecal. Las muestras se obtuvieron de manera azarosa dentro del huerto y se procesaron el mismo día en el laboratorio de Microbiología e Inocuidad de los Alimentos del Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química, para llevar a cabo la detección de *Salmonella* spp.

En la detección de *Salmonella* mediante PCR se emplearon iniciadores específicos dirigidos a una región del gen *InvA* de invasividad de *Salmonella*. (Liu *et al.*, 1992). Inicialmente se hizo una etapa de pre enriquecimiento de cada muestra en la cual se colocaron 25 g de muestra en 225 mL de caldo soya tripticaseína y se incubaron a 35 °C durante 24 h. La segunda etapa fue una etapa de enriquecimiento, en esta se tomó una alícuota de 1 mL del cultivo de pre enriquecimiento y se adicionó a un tubo con 9 mL de caldo soya tripticaseína, se incubaron a 35 °C durante 24 h. Se tomó 1 mL de este cultivo y se centrifugó a 4,500 X g por 15 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 mL de agua destilada estéril. Para llevar a cabo la lisis celular se colocaron las muestras en baño de agua a 100 °C por 20 min. Para la amplificación se utilizaron 10 µL de la mezcla de reacción 2X Platinum supermix (Promega®), iniciadores *InvA1* e *InvA2* (1.25 µM) en un volumen final de 20 µL. Se transfirió 1

µL de cada cultivo lisado y se llevó a cabo la amplificación en las condiciones que se señalan en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de amplificación para *Salmonella*

Etapa del procedimiento	Condiciones	Iniciadores	Secuencia 5' – 3'
Desnaturalización	93 °C / 5 min		
Amplificación (30 ciclos)	93 °C / 10 s	InvA1	CTGTTGAACAACCCATTTGT
	42 °C / 10 s		
	72 °C / 45 s	InvA2	CGGATCTCATTAAATCAACAAT
Extensión final	72 °C / 10 min		

Liu *et al.*, 1992

Al finalizar la amplificación se tomaron 6 µL del producto amplificado y se realizó la electroforesis en gel de agarosa (1.5 %) por 90 min a 100 V. El gel se reveló con bromuro de etidio (1 ppm) por 20 min y se obtuvo la imagen en un transiluminador UV con el sistema Kodak EDAS 290.

Para realizar el aislamiento de *Salmonella* por método convencional de cultivo (Figura 6) se siguió el procedimiento descrito en Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Andrews *et al.*, 2001). Como medio de preenriquecimiento se empleó caldo soya tripticaseína de las muestras positivas a *Salmonella* en la PCR. Se transfirieron alícuotas de 1 mL a caldo tetrionato y caldo Rappaport-Vasiliadis, se incubaron a 43 °C por 18 h. Se utilizaron agar sulfito bismuto y agar xilosa lisina desoxicolato como medios de aislamiento selectivos y se incubaron a 35 °C por 24 h. Las cepas se sometieron a la prueba de aglutinación con antisuero comercial poly A-I & Vi y se confirmaron por PCR mediante el procedimiento ya descrito.

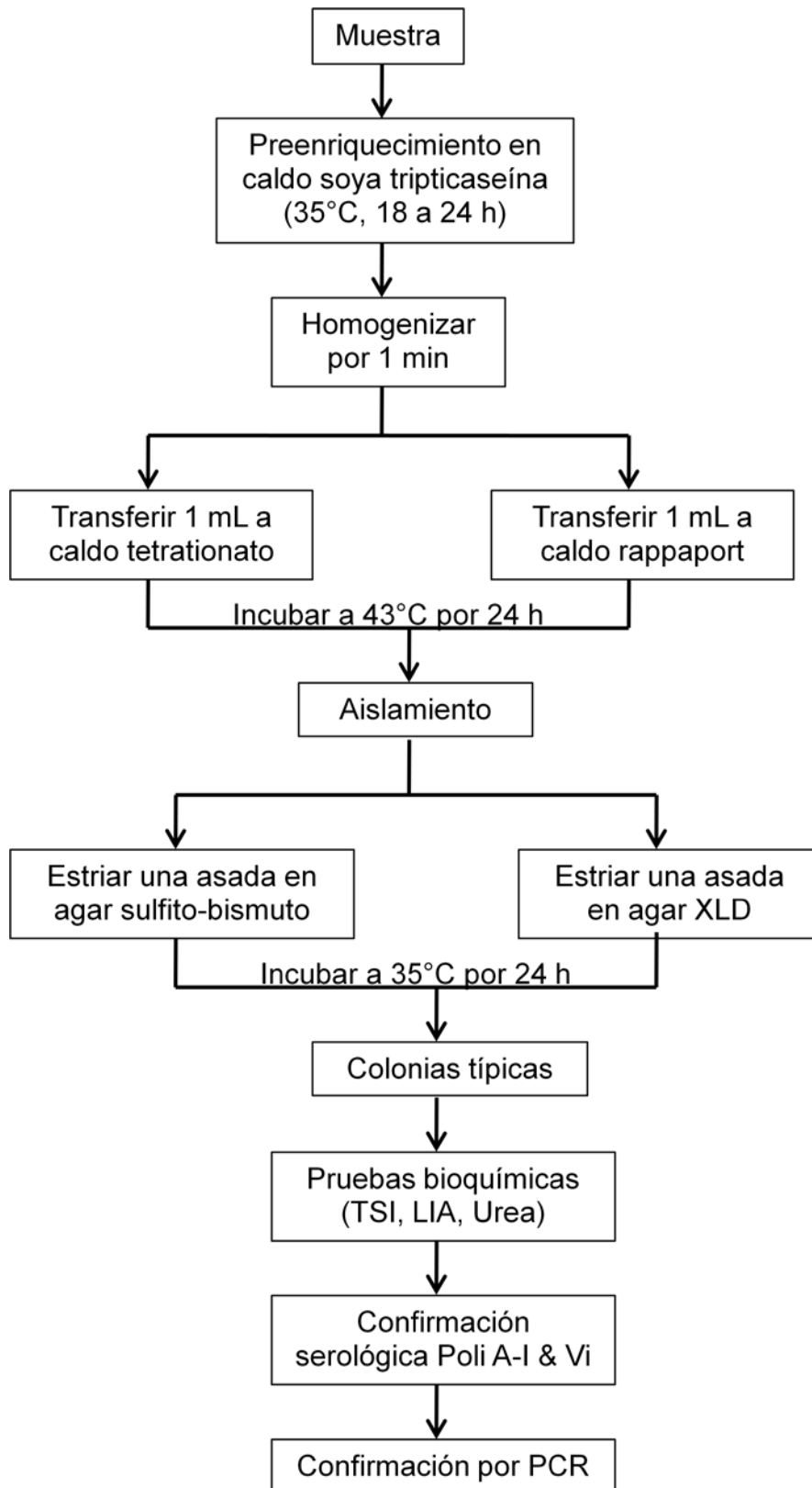


Figura 6. Diagrama general de aislamiento de *Salmonella* spp.

4.3.3. Preparación del inóculo

Las cepas de *Salmonella* previamente aisladas y conservadas en caldo soya tripticaseína con 15% de glicerol en congelación se reactivaron mediante una transferencia de 40µL a un tubo con 3 mL de caldo soya tripticaseína, incubado a 35°C durante 24 h. Se realizaron tres transferencias sucesivas cada 24 h; a las 18h de incubación del último cultivo, las células se cosecharon mediante centrifugación (4,500 X g, 15 min.). Los paquetes celulares fueron lavados dos veces, con diluyente de peptona. El recuento viable de la suspensión bacteriana se realizó en agar soya tripticaseína con rifampicina 200 ppm, mediante la técnica de extensión por superficie, tras una incubación de 24 h a 35°C.

4.3.4. Determinación de la capacidad de *Salmonella* para colonizar la superficie de manzana

4.3.4.1. Efecto del tiempo de contacto sobre la adhesión de *Salmonella* a manzana

Para establecer las condiciones necesarias para inducir la adhesión a la superficie de manzana se evaluó el tiempo de contacto entre la manzana y el inóculo: 0 (únicamente se colocó el fruto en la suspensión y se retiró inmediatamente), 3 y 6 h de exposición. El tiempo debería ser el suficiente para que las células se adhirieran a la superficie del fruto irreversiblemente, pero sin que se permitiera el desarrollo de la bacteria.

Se empleó una mezcla de cuatro cepas de *Salmonella* resistentes a rifampicina. Las células activadas fueron lavadas y diluidas (6 y 9 Log UFC/100µL) en diluyente de peptona. Las suspensiones se colocaron en cajas de Petri sin tapa. Manzanas 'Rayada', 'Golden Delicious' y 'Red Delicious' se pusieron en contacto con las suspensiones de *Salmonella* mediante inmersión parcial y se incubaron a 22 °C.

Para la inoculación, los frutos se colocaron en las cajas de Petri que contenían 20 mL de la suspensión de *Salmonella*, se introdujeron en cajas de cierre hermético y se fijaron, sin realizar heridas sobre el fruto, para evitar que se movieran al pasarlas a la incubadora (Figura 7).

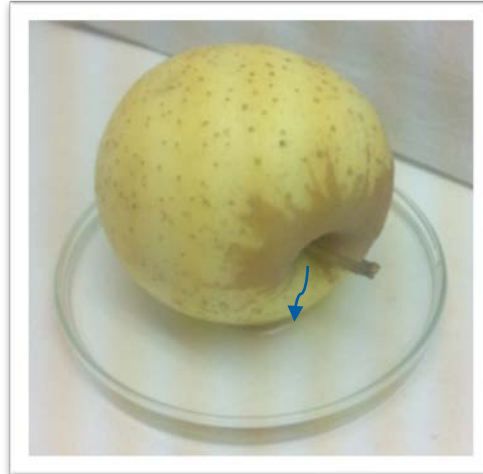


Figura 7. Inoculación por inmersión parcial de manzana

Las células adheridas fueron definidas como aquellas células que permanecen en la manzana luego de aplicar un enjuague con agitación por 1 min en 50 mL de diluyente de peptona, pero que son removidas por frotación manual ulterior, por 1 min, en 50 mL de diluyente de peptona (Hernández-Iturriaga, 2003).

Se cuantificaron las células adheridas en agar soya tripticaseína adicionado con rifampicina 200 ppm. Se calculó el porcentaje de adhesión de las células de *Salmonella* al fruto mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Adhesión} = \left(\frac{\text{Células que permanezcan en la manzana después de los lavados (UFC/manzana)}}{\text{Total de células inoculadas (UFC/manzana)}} \right) * 100$$

Se hizo un estudio comparativo a los diferentes tiempos estudiados mediante análisis de varianza y pruebas comparación de medias de Tukey en el

paquete estadístico JMP 5.1.1. para establecer el mejor tiempo de adhesión (Castaño *et al.*, 2010).

4.3.4.2. Efecto del número de lavados sobre la adhesión de *Salmonella* a manzana

Se evaluó la recuperación de *Salmonella* luego de una serie de lavados mediante inmersión del fruto con 50 mL de diluyente de peptona, con agitación manual continua por 1 min, a la par se realizó el recuento de las células que se lograban desprender del fruto después de los lavados mediante frotación manual (células adheridas) y en el agua de lavado (células no adheridas). Se realizó lo anterior hasta completar 4 lavados consecutivos. Se cuantificó la población en el agua de lavado y sobre la manzana entre cada lavado en agar soya tripticaseína con rifampicina. Se calculó el porcentaje de adhesión de las células de *Salmonella* al fruto mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Adhesión} = \left(\frac{\text{Células que permanezcan en la manzana después de los lavados (UFC/manzana)}}{\text{Total de células inoculadas (UFC/manzana)}} \right) * 100$$

Se hizo un estudio comparativo a los diferentes tiempos estudiados mediante análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey en el paquete estadístico JMP 5.1.1. para establecer el mejor tiempo de adhesión (Castaño *et al.*, 2010).

4.3.4.3. Evaluación de suspensiones de nutrientes para la colonización de *Salmonella* en manzana

Se seleccionaron fuentes potenciales de nutrientes que pudieran propiciar el crecimiento de *Salmonella* spp. y que se encontraran disponibles en el ambiente. Se prepararon suspensiones de suelo (10%), materia fecal animal (10%) y caldo soya tripticaseína (10 %) como control, empleando agua destilada

estéril; estas suspensiones se pusieron en contacto por inmersión parcial con la superficie de manzanas (3 h / 22 °C).

Periódicamente las manzanas se lavaron cuatro veces con 50 mL de diluyente de peptona en una bolsa (cada lavado) y las células adheridas se removieron mediante frotación manual (1min) en otra bolsa con 50 mL de diluyente de peptona. Finalmente fueron cuantificadas las células no adheridas y adheridas en agar soya tripticaseína adicionado con rifampicina 200 ppm (24 h a 35 °C). Los ensayos fueron realizados por triplicado.

4.3.5. Estudio de la capacidad de cepas de *Salmonella* para adherirse, colonizar y formar biopelículas sobre manzana

4.3.5.1. Evaluación de la capacidad de *Salmonella* para colonizar y formar biopelículas en genotipos de manzana

Con los resultados de los experimentos anteriores se logró establecer un protocolo (Figura 8) para evaluar la capacidad *Salmonella* para adherirse y colonizar la superficie de manzana 'Rayada', 'Golden Delicious' y 'Red Delicious'.

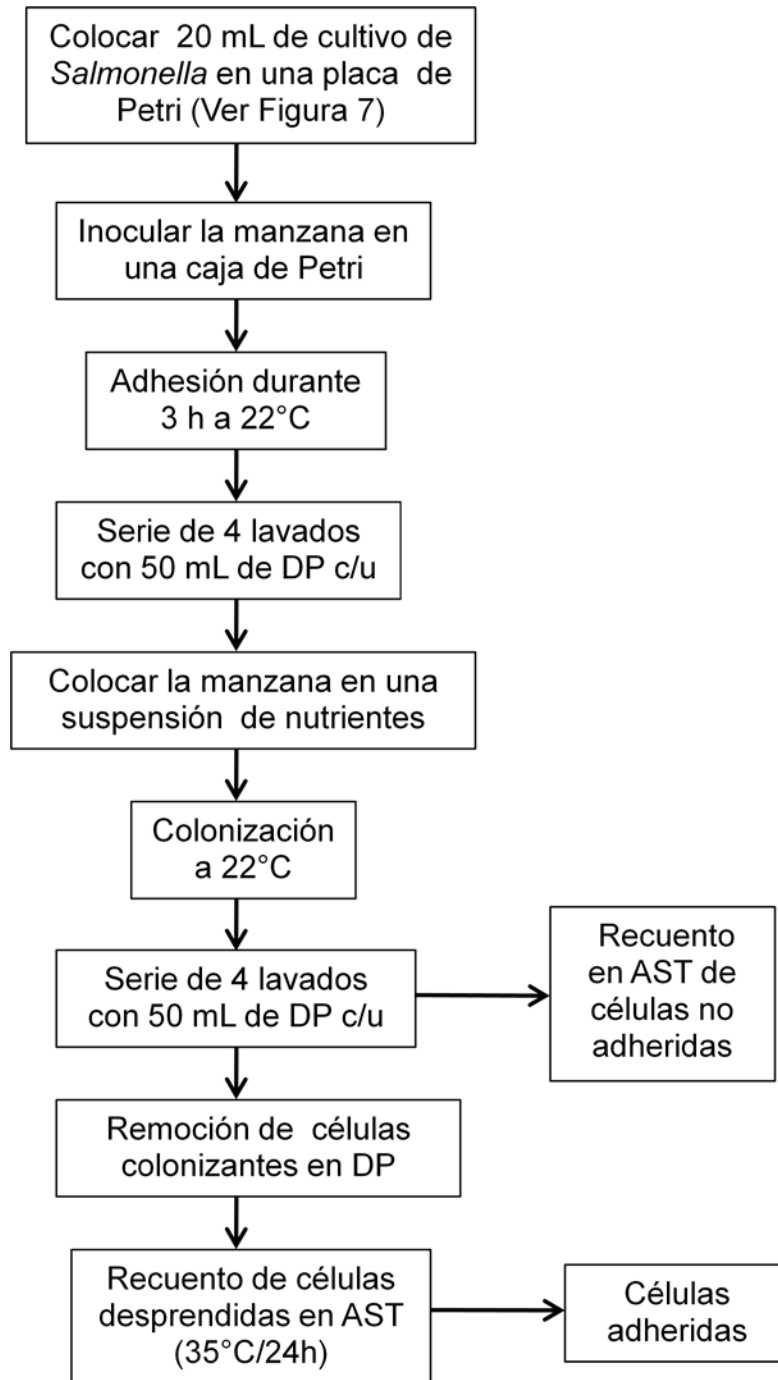


Figura 8. Diagrama general de inducción de la adhesión y colonización de *Salmonella* en superficie de manzana

Se calculó el porcentaje de adhesión de las cepas a la superficie de manzana, al inicio del proceso de colonización mediante:

$$\%Adhesión = \left(\frac{\text{Células que permanezcan en la manzana después de los lavados (UFC/manzana)}}{\text{Total de células inoculadas (UFC/manzana)}} \right) * 100$$

Análisis estadísticos

Fueron elaboradas curvas de desarrollo y se analizó el comportamiento cinético de *Salmonella* mediante el Programa DMfit (www.combase.cc). Del modelado de cada curva de desarrollo se obtuvieron tres variables cinéticas:

- Duración de la fase lag (h)
- Velocidad máxima alcanzada ($\text{Log UFC} \cdot (\text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^2)$)
- Población máxima alcanzada ($\text{Log UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$)

Estas variables fueron sometidas a análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey con el Programa estadístico JMP 5.1.1. (Castaño *et al.*, 2010).

4.3.5.2. Evaluación del efecto de la humedad relativa y la temperatura en la colonización de *Salmonella* sobre tres genotipos de manzana

Se modificó las condiciones de colonización siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 8 para realizar la evaluación del efecto de la temperatura de almacenamiento (5, 15 y 22 °C) y la humedad relativa (58, 79 y 96%), a través de recuentos periódicos en AST con rifampicina (200 ppm) de las células a manera de cinéticas de colonización: 0, 3, 6, 10, 12, 24, 48 y 72 h. Se realizaron por triplicado todos los experimentos y en cada punto se emplearon 3 unidades experimentales.

Para generar las humedades relativas necesarias se prepararon soluciones saturadas de NaBr (58%), NaCl (79%) y K₂SO₄ (96%) y se colocaron en cajas de plástico en una capa uniforme de aproximadamente 2 cm.

Se colocaron las manzanas con las células adheridas en cajas de Petri para impedir que contactaran las soluciones. La humedad relativa fue medida y registrada automáticamente usando un higrómetro-termómetro digital y se acondicionaron las cámaras de humedad previo a la experimentación en la incubadora con la temperatura pertinente al experimento.

4.3.6. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para confirmar la adhesión y formación de biopelículas de las cepas de *Salmonella* spp. sobre los diferentes genotipos de manzana se empleó MEB. Las porciones de las manzanas con las células adheridas al final de la colonización (2 y 5 días) se fijaron durante 2 h en glutaraldehído (3%), seguido de 2 h en tetraóxido de osmio (1%), ambos reactivos preparados en una solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.1 M (pH 7.36). También se utilizaron porciones de epidermis de manzana sin inocular como control. Las porciones de manzana con las películas fijadas, se deshidrataron en un gradiente de soluciones de alcohol etílico (10, 25, 50, 75 y 100%) a 4 °C. Se secaron en un desecador de punto crítico, debiéndose montar en un porta muestras y se recubrieron con oro. Finalmente se examinaron en un microscopio electrónico de barrido ZeissDSM-950 operado a 10 kV, provisto y operado por el laboratorio de Limnología y Ecología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

4.3.7. Evaluación de la susceptibilidad de *Salmonella* en biopelícula a germicidas químicos

En esta evaluación fueron utilizados como germicidas: ácido peracético, cloro, desinfectante cítrico y agua electrolizada neutra (AEN), mientras que el agua destilada se empleó como control.

Se promovió la adhesión y colonización en la superficie de las manzanas como se describió en la sección anterior (Figura 7). A los tres y cinco días de incubación se retiraron manzanas 'Golden Delicious' y 'Red Delicious', respectivamente, y se sometieron a los tratamientos de desinfección. Las manzanas se colocaron en bolsas de polietileno conteniendo los germicidas: ácido peracético (80 ppm por 2 min), desinfectante cítrico (dilución 1:2 por 10 min), agua electrolizada neutra (200 ppm de cloro activo por 10 min) y cloro (200 ppm por 10 min), sin agitación. Como control se utilizaron muestras que fueron expuestas a agua destilada estéril por 2 y 10 min. Finalmente, las manzanas se transfirieron a otra bolsa con 50 mL de caldo neutralizante frotándolas desde el exterior durante 1 min. El recuento de células sobrevivientes a los tratamientos germicidas se realizó en agar soya tripticaseína con rifampicina (200 ppm).

Análisis estadísticos

Las reducciones de *Salmonella* para cada cultivar, mezcla de cepas y tipo de germicida fueron comparadas mediante análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey en el paquete estadístico JMP 5.1.1. (Castaño *et al.*, 2010).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento de cepas de *Salmonella* de frutos y ambiente de una huerta

Inicialmente surgió el interés por recuperar cepas de *Salmonella* spp. del huerto “El Suspiro”, Cadereyta, en la Sierra de Querétaro (Figura 7), lugar de origen del material biológico experimental.

Se realizaron visitas al huerto para identificar las posibles fuentes de contaminación del patógeno hacia el fruto mediante un análisis observacional. En reiteradas ocasiones a pie de los manzanos se encontró: presencia de materia fecal humana y animal provenientes de pastoreo de ganado ovino y caprino que se practica dentro del huerto. Una situación que es importante destacar es que el huerto se encuentra en una lareda. Esto provoca que las ramas de los manzanos se pongan en contacto directo con el suelo, en la mayoría de los árboles, y por ende sus frutos. Estos acontecimientos representan un peligro directo para la inocuidad de las manzanas ya que se sabe que la superficie de las frutas que se cultivan muy próximas al suelo puede ser contaminada con patógenos de origen fecal como *E. coli* O157:H7, la cual permanece viable en heces de bovino hasta por más de 70 días (Wang *et al.*, 1996). Aunado a ello los principales factores propiciadores de brotes asociados al consumo de sidra y jugo de manzana sin pasteurizar fueron la presencia de fauna pastoreando en las huertas de origen del fruto (por ende presencia de materia fecal animal) como fue señalado por Pachtet (1923), CDC (1975, 1996, 1997), Steele (1982), Besser (1993), Millard (1994), Tamblyn (1999) y Farber (2000).

Otro factor prioritario a considerar es la ausencia de una infraestructura sanitaria que provea de una protección directa o indirecta contra las posibles fuentes de contaminación. Entre la infraestructura necesaria puede mencionarse: un cercado que impida el pastoreo dentro del huerto, trampas para roedores, la

distancia adecuada entre el huerto y corrales de animales de engorda. Desafortunadamente los recolectores y propietarios de huertas locales desconocen por completo programas preventivos como las Buenas Prácticas Agrícolas.

Esta serie de acontecimientos que exponen a las manzanas a fuentes potenciales de contaminación de patógenos señalan diversos mecanismos de contaminación (suelo, materia fecal, animales de pastoreo) como se describieron en la sección 2.2.1 (Figura 2).

En la región se presentan condiciones medioambientales muy favorecedoras para el desarrollo de patógenos, pues prevalecen humedades relativas entre 21 y 100 % y temperaturas que van de 7 a 25 °C durante el desarrollo y la maduración del fruto (entre mayo y agosto). Para el desarrollo de *Salmonella* se ha reportado una actividad de agua límite de 0.94 (ICMSF, 1996) y óptimas de desarrollo entre 35 y 37 °C. Su tasa de desarrollo disminuye por debajo de los 20 °C, así su temperatura mínima de crecimiento es de 6 °C (Fernández, 2009).

Un total de 120 muestras (manzana, suelo y materia fecal) se analizaron resultando 5 muestras positivas (Tabla 8).

Tabla 8. Incidencia de *Salmonella* spp. en muestras colectadas en la huerta “El Suspiro”

Tipo de muestra	Total de muestras	Muestras positivas a <i>Salmonella</i>	% Positividad
Materia Fecal	40	1	2.5
Suelo	40	1	2.5
Manzana	40	3	7.5
	120	5	4.2

Abadias *et al.* (2006) investigaron la incidencia de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. en manzanas 'Golden Delicious' a través de la cadena de producción, desde el huerto (36 muestras), después del almacenamiento y manipulación de los frutos (36 muestras) y en los puntos de venta (144 muestras). Ninguna de las muestras analizadas por métodos convencionales fueron positivas para ambos patógenos.

En otro estudio realizado por Abadias *et al.* (2008) en donde se determinó la calidad microbiológica de frutas mínimamente procesadas, hortalizas y semillas de varios establecimientos, se analizaron 21 muestras de manzana de las cuales ninguna resultó positiva para *Salmonella* spp., *E. coli* o *Listeria monocytogenes*.

La presencia de *Salmonella* spp. en suelo no es un evento común. Pérez-Barba (1998) analizó 178 muestras de tierras cercanas a lugares donde se cultivaba brócoli y detectó 5% de positividad en porciones de 20 g. En otros estudios Gay *et al.* (1994) y Wells *et al.* (2001) detectaron *S. Dublin* y *S. Typhimurium* en muestras de materia fecal de bovinos asintomáticos. Mientras que en cultivos de frutas y hortalizas que han sido fertilizados con estiércol se podría asociar a una elevada positividad de patógenos (Castañeda, 2010).

En 2007, un estudio reportado por Ruiz enfocado en evidenciar la presencia de *E. coli* y *Salmonella* en hortalizas (lechuga, chicoria, jitomate, brócoli y lechuga) arrojó 7.3 y 5 % de incidencia de ambos microorganismos, respectivamente, en huertos donde se detectó la presencia de animales silvestres en el área de cultivo así como su contacto con los reservorios de agua para riego de las hortalizas. A su vez, Rangel (2009) reportó un 19 y 4 % de positividad a *E. coli* y *Salmonella* en zanahoria en una empresa con presencia de animales silvestres en el área de cultivo y de empacado.

A pesar de que en la revisión bibliográfica realizada no se encontró información que demostrara el aislamiento de *Salmonella* spp. a partir de manzana

cruda, si existen numerosos reportes de brotes por *E. coli* O157:H7 asociados al consumo de sidra no pasteurizada (Steele, 1982; Besser, 1993; CDC, 1996; CDC, 1997; Tauxe, 1997; Tamblyn, 1999; Cody, 1999; Farber, 2000) y dos por *S. Typhi* y *S. Typhimurium* (Paquet, 1923; CDC, 1975)

5.2. Adhesión de *Salmonella* en superficie de manzana

Para evaluar el comportamiento de *Salmonella* sobre manzana se decidió utilizar una inoculación por inmersión parcial del fruto. Entre los métodos existentes tenemos la inmersión, asperjado y goteo. El problema principal asociado con la inoculación por inmersión o asperjado, es que el número de células realmente aplicado o adherido al producto no se conoce. Para resolver este inconveniente las manzanas fueron colocadas de lado, con una marca para identificar la posición, sobre una caja de Petri de esta manera el área que contactaría al inóculo permanecería fija durante el tiempo de exposición al inóculo; mientras que para conocer el células que se adherían al fruto en todos los experimentos se hizo el recuento de células al finalizar la etapa de adhesión (tiempo 0). Además los experimentos se realizaron por triplicado, incluyendo 2 o 3 muestras para conjunto de parámetros analizados.

5.2.1. Efecto del tiempo de contacto sobre la adhesión de *Salmonella* a manzana

La adhesión de las bacterias a una superficie ocurre mediante diversos mecanismos: interacciones electrostáticas (Mafu *et al.*, 1991; Barbara-Vu *et al.*, 2009), interacciones hidrofóbicas (Vigeant y Ford, 1997), producción exopolisacáridos (Costerton *et al.*, 1987; Waters *et al.*, 2005) y mediante la presencia de flagelos, pilis o fimbrias en la superficie bacteriana que también participan en el proceso de adhesión a superficies (Costerton *et al.*, 1987).

Para estudiar el fenómeno de adhesión a superficies se recurre a modelos de laboratorios. Estos consisten en inocular un número conocido de microorganismos usualmente a placas de superficie plana, propiciar adhesión mediante almacenamiento por un tiempo determinado, aplicar un enjuague con soluciones de sales o buffer de peptonas para eliminar células no adheridas y finalmente cuantificar la población remanente (Hernández-Iturriaga *et al.*, 2003).

Se evaluó el tiempo de contacto (0, 3 y 6 h) para determinar la influencia de éste parámetro sobre la adhesión de *Salmonella* a la superficie de manzana almacenada a 22 °C.

Los tiempos de contacto con el inóculo para *Salmonella* por inmersión parcial observaron poblaciones adheridas sin diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) (Tabla 10). El porcentaje de adhesión se determinó en función de las células que permanecen adheridas después de dos lavados. El número de células del inóculo inicial (tiempo 0) incrementó de 0.43 a 0.99, a las 6 h. Debido a que lo ideal para propiciar la colonización y, posteriormente, la formación de biopelículas es tener un número elevado inicial de células adheridas, se determinaron 3 h como suficientes para la etapa de colonización.

Tabla 10. Permanencia de células adheridas de *Salmonella* a superficie de manzana almacenadas a 22°C

Tiempo de adhesión (h)	Población adherida (Log UFC/manzana)	% Adhesión
0	5.57 ± 0.27 a	0.43 ± 0.13
3	5.83 ± 0.17 a	0.73 ± 0.16
6	5.98 ± 0.08 a	0.99 ± 0.09

Los valores con la misma letra son estadísticamente iguales mediante una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Hernández-Iturriaga (2003) evaluó el tiempo de contacto del inóculo de *Salmonella* en jitomate a 0, 60, 90 y 120 min, en este ensayo se inocularon en promedio 7.75 log UFC/fruto del cual se logró adherir 3.5 log UFC (0.005%) inmediatamente después de la inoculación. Hubo un incremento significativo ($p < 0.05$) en el número de células adheridas en los tiempos evaluados comparado con el número inicial que se adhirió al tiempo 0. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre 60, 90 y 120 min.

Un estudio sobre manzana inoculando *S. Chester* reportó que el número de bacterias adheridas sobre discos de manzana no fue afectado por el tiempo de inmersión pero si fue directamente proporcional a la concentración bacteriana en la suspensión del inóculo (Liao y Sappers, 2000). Por su parte, Padilla (2010) en un estudio de cepas de *Leuconostoc* ssp. Sobre acero inoxidable y polipropileno determinó que 4 h fue el tiempo mínimo de contacto del inóculo con la superficie para inducir la máxima adhesión y mantener el porcentaje de adhesión, para posteriormente favorecer la etapa de colonización y formación de biopelículas sobre esas superficies.

5.2.2. Efecto de los lavados tiempo sobre la adhesión de *Salmonella* a manzana

Fue necesario evaluar si el procedimiento de enjuague para remover las células de *Salmonella* que no se adhirieron resultaba eficiente, considerando que es necesario tener una población considerablemente mayor a la que se pueda desprender con los enjuagues que se realicen sobre el fruto.

En la Figura 9 se representan las células adheridas mediante barras y con una línea las células no adheridas de *Salmonella*. La adhesión inicial fue cercana a 5 Log UFC/manzana y se fue diluyendo esa concentración hasta el cuarto lavado (2 Log UFC/manzana), mientras que la concentración de células no

adheridas se mantuvo constante después del tercer lavado y hasta el quinto lavado (3.5 Log UFC/manzana en promedio). Entre el cuarto y quinto lavado se lograron recuperaciones muy similares de células no adheridas. Para estudios posteriores se decidió realizar cuatro lavados al fruto inoculado para desprender las células no adheridas y pasar el fruto a la etapa de colonización. En el análisis estadístico de las células adheridas mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) mediante una prueba de Tukey entre los diferentes lavados.

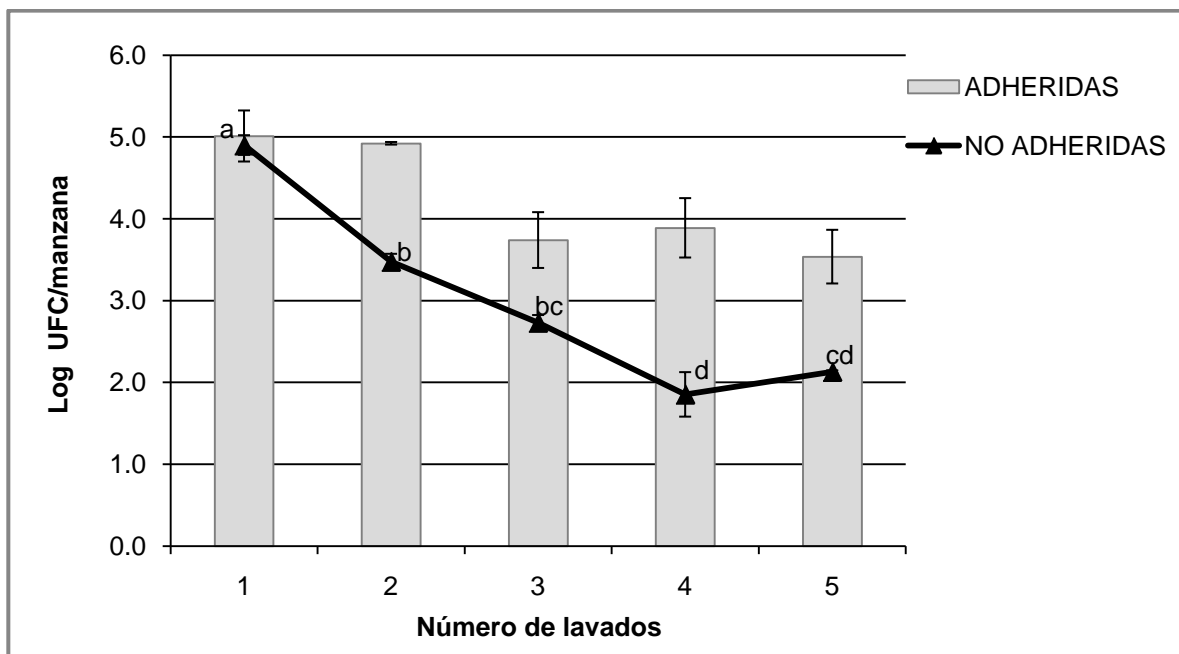


Figura 9. Permanencia de células adheridas y no adheridas de *Salmonella* a la superficie de manzana después de varios lavados con diluyente de peptona.

Liao y Sapers (2000) demostraron que las células adheridas irreversiblemente de *S. Chester* sobre trozos de manzana no se remueven luego de aplicar dos lavados continuos de 500 mL de PBS. Al aplicar un tercer enjuague con agitación (200 rpm) por 5 min no se observó un incremento significativo sobre el número de células desprendidas a los que solo tenían dos lavados continuos.

En un estudio en jitomate realizado por Hernández-Iturriaga (2003) sobre jitomate se evaluó la población de *Salmonella* recuperada después de aplicar un enjuague con agua destilada (100 mL, 200 mL y 500 mL), sin observar diferencias significativas entre los volúmenes. En este mismo trabajo de investigación fueron objeto de estudio determinar el tipo de agente empleado en la remoción de *Salmonella*, se utilizaron soluciones de Tween 80 (0.1, 0.2 y 0.5 g/L), Lauril Sulfato de Sodio (1, 2 y 5 %), Zwittergent (1, 2, 5 μ M) y diluyente de peptona aplicándolos a dos temperaturas, 10 y 40 °C, sin embargo ninguno de las combinaciones de los tratamientos resultó con diferencias estadísticamente significativas en la recuperación de *Salmonella*. Se observó que el diluyente de peptona resultó ser igual de eficaz que los detergentes evaluados en la remoción.

5.2.3. Colonización de *Salmonella* en manzanas

Para la selección del medio de nutrientes que *Salmonella* pudiera tener disponibles en el huerto de manzanos se decidió evaluar suspensiones de suelo (10%), materia fecal (10%) y caldo soya tripticaseína (10%) como control, pues se quiso recrear condiciones lo más cercanas posibles a las medio ambientales prevalentes en el huerto experimental para el trabajo del laboratorio.

Se observó el comportamiento de *Salmonella* sobre el fruto a lo largo de tres días (Figura 10).

Las cinéticas de *Salmonella* en las dos soluciones de nutrientes se comportaron de forma muy similar al control. Todas las muestras partieron de la misma concentración inicial (4.5 Log UFC/manzana).

La suspensión de suelo (10%) tendió a inactivar el crecimiento de *Salmonella* el primer par de horas de la cinética. Después de 6 h de estar en contacto con esa suspensión el microorganismo alcanzó la misma concentración celular cuando fue expuesta a la suspensión de materia fecal. El análisis estadístico de las poblaciones del patógeno en contacto con las tres diferentes

suspensiones de nutrientes no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) a partir de las 12 h y hasta finalizar la cinética (72 h).

Debido a que el comportamiento de *Salmonella* no presentó diferencias significativas al cambiar la fuente de nutrientes durante la colonización de manzana, por practicidad para los estudios posteriores se seleccionó como suspensión de nutrientes la de suelo (10%) para la etapa de colonización.

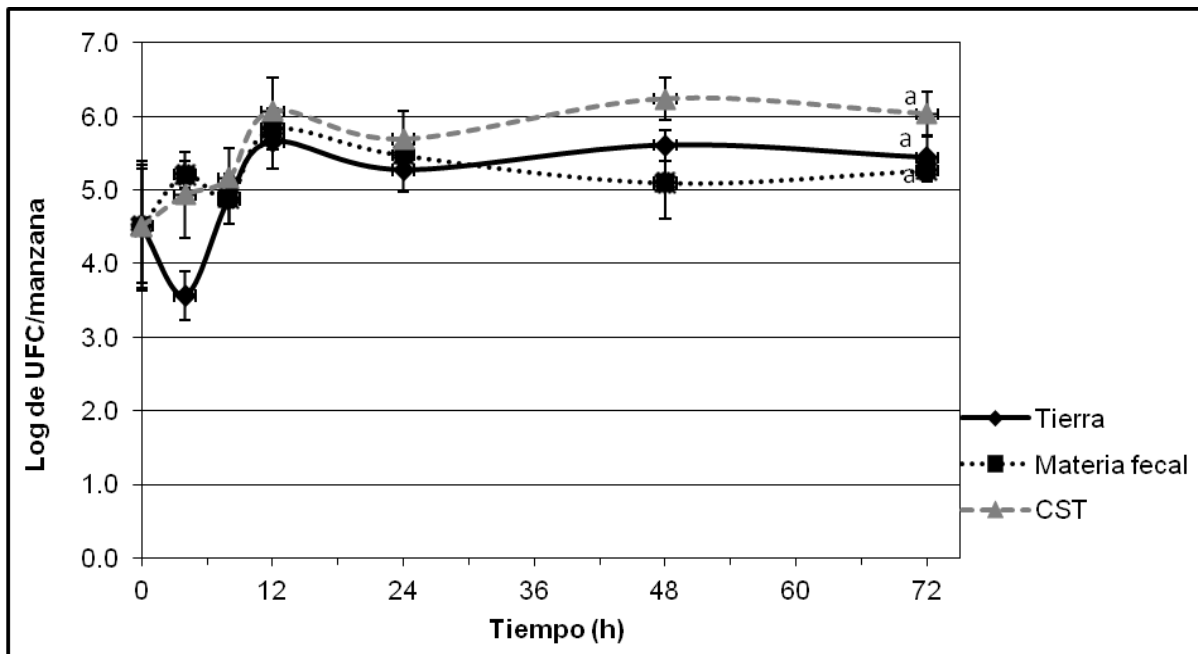


Figura 10. Colonización de *Salmonella* en manzana ‘Golden Delicious’, ‘Rayada’ y ‘Red Delicious’ utilizando tres tipos de nutrientes

5.3. Estudio de la capacidad de cepas de *Salmonella* para colonizar y formar biopelículas sobre manzana

Se evaluó la capacidad de *Salmonella* para colonizar y formar biopelículas sobre las variedades ‘Golden Delicious’, ‘Rayada’ y ‘Red Delicious’. Para ello se empleó una mezcla de *Salmonella* spp. que incluyó a las cepas aisladas del huerto

(manzana, materia fecal y suelo), *S. Typhimurium* y *Salmonella* spp. aislada de composta. A través de este estudio se pretendió conocer las cinéticas de desarrollo de *Salmonella* sobre cada variedad para identificar diferencias entre ellas mediante los parámetros de fase lag, velocidad de crecimiento y máxima población alcanzada. Además se realizaron cinéticas de colonización con las cepas de manera individual después de dos días de colonización, para establecer parámetros de adhesión y desarrollo final de *Salmonella*, pues en general el comportamiento de cepas provenientes de otros ambientes ajenos es diferente de aquellas cepas adaptadas a las condiciones medioambientales objeto de estudio. La confirmación de la formación de biopelículas se obtuvo a partir de micrografías de electrónico de barrido.

5.3.1. Evaluación de la capacidad de *Salmonella* en mezcla para colonizar y formar biopelículas en tres cultivares de manzana

La diferencia entre cultivares es visiblemente identificada. La manzana 'Golden Delicious' presenta forma cónica, su cáscara es amarilla verdosa con pequeños puntos oscuros llamados lenticelas. La manzana 'Rayada' es de tamaño chico a mediano, de color rojo claro, estriado, fondo verde-amarillo. La manzana 'Red Delicious' es un fruto grande, alargado, firme, de color rojo brillante con rayas rojas sobre el 25 a 50 % de la superficie. La coloración de la epidermis de la manzana de cada cultivar está determinada por distintos compuestos, para las variedades rojas los compuestos que principalmente otorgan su coloración son licopeno, antocianinas, fenoles, flavonoides y ácido elágico, mientras que en las variedades amarillas son carotenoides (β -caroteno), quercetina, luteína, zexantina y limoneno (Mazza y Miniati, 1993). Debido a la diversa composición de la superficie de las variedades de estudio de manzana se realizó la evaluación del comportamiento de *Salmonella* sobre cada variedad para establecer la relación entre su superficie y la formación de biopelículas en ellas.

Durante las cinéticas de colonización (Figura 11) se observó un comportamiento de desarrollo inicial más acelerado de *Salmonella* sobre 'Golden Delicious' llegando a desarrollar hasta 5.8 Log UFC/manzana después de 10 h de almacenamiento, luego de un día de colonización su población tendió a decrecer pero mantuvo hasta 5 Log UFC. Asimismo sobre 'Red Delicious' y 'Rayada' se registró un comportamiento de *Salmonella* muy similar al observado en el cv. 'Golden Delicious', las poblaciones máximas fueron de 4.7 y 4.8 Log UFC/manzana, respectivamente; el análisis estadístico de la población adherida a manzana no arrojó diferencias significativas en las cinéticas entre las diferentes variedades, lo cual se representa mediante las letras sobre el final de la cinética de la Figura 11.

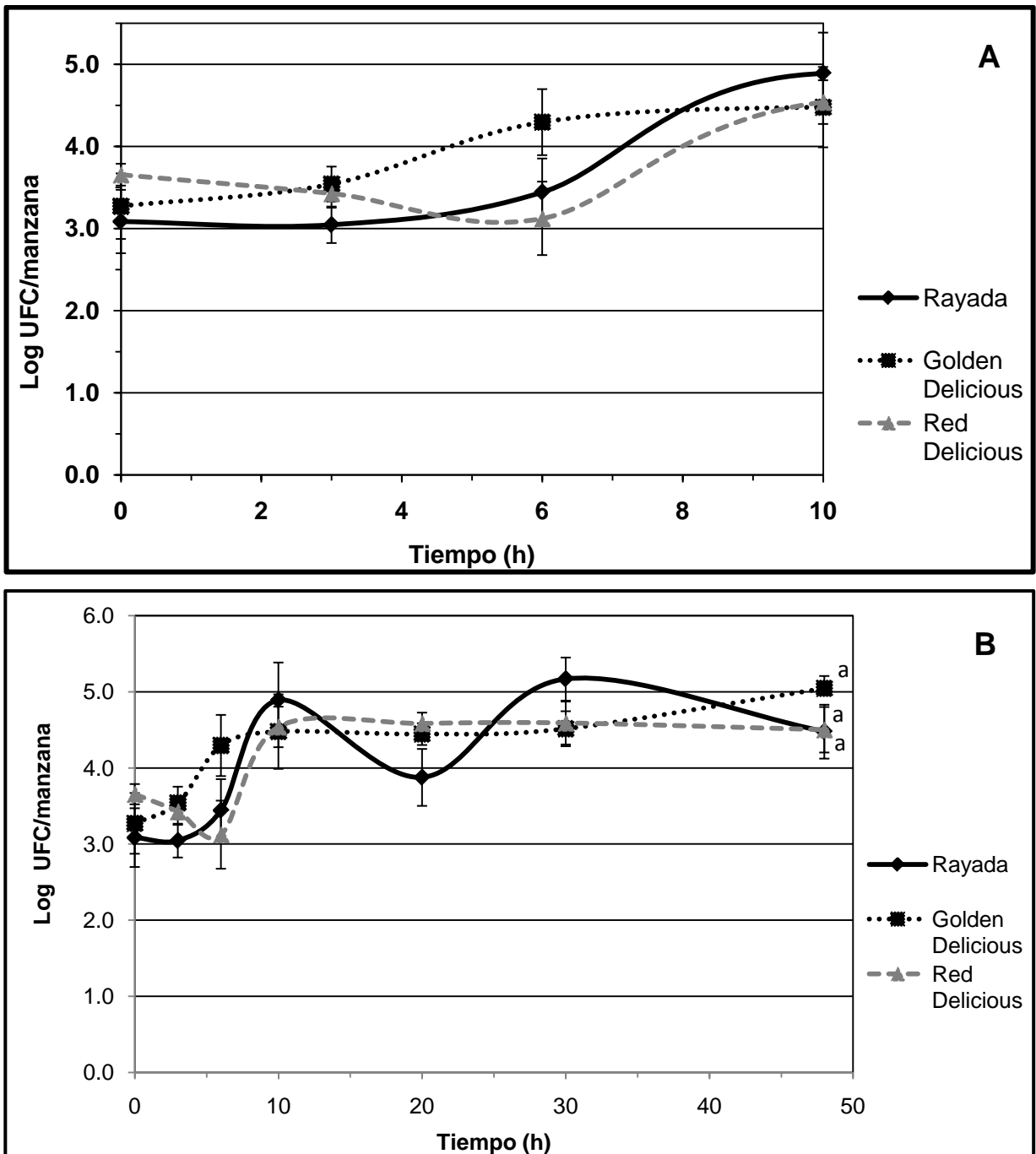


Figura 11. Colonización de *Salmonella* en manzana ‘Golden Delicious’, ‘Rayada’ y ‘Red Delicious’ (22 °C). A. Primeras 10 h de las cinéticas. B. Cinéticas completas

Los parámetros cinéticos de la colonización de *Salmonella* sobre manzana fueron calculados con el macro DMFit en Excel 2007 y se registraron en la Tabla 11.

Tabla 11. Parámetros cinéticos promedio de *Salmonella* colonizando manzana 'Golden Delicious', 'Rayada' y 'Red Delicious'

Cultivar	Población máxima (Log UFC/manzana)	Velocidad (Log UFC/h)
'Golden Delicious'	4.896 ± 0.455	0.044 ± 0.018
'Rayada'	ND	0.033 ± 0.010
'Red Delicious'	ND	0.021 ± 0.015

ND No determinado

En primera instancia la fase lag de *Salmonella* no se logró estimar con los datos experimentales obtenidos debido al poco ajuste de los datos al modelo, además de que la población máxima alcanzada solo se logró obtener para la variedad 'Golden Delicious'. La enorme dispersión en los datos experimentales nos impidió calcular estos parámetros cinéticos debido a los pocos datos y su enorme dispersión; éste comportamiento del patógeno sobre el fruto pudo haber sido causado por diferentes factores, entre los posibles: el estadio fisiológico y la propia naturaleza de los frutos, la flora asociada al fruto y ineludiblemente al error experimental. Ejemplos del comportamiento de *Salmonella* sobre manzana se muestran en la Figura 12.

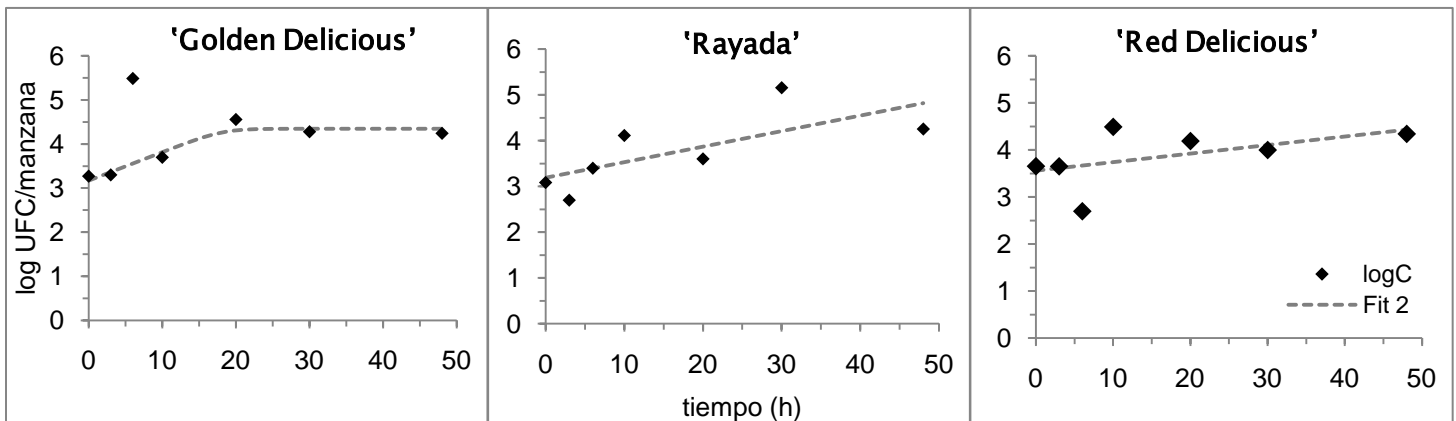


Figura 12. Comportamiento de *Salmonella* en manzana 'Golden Delicious', 'Rayada' y 'Red Delicious' (22 °C). Las curvas de desarrollo fueron obtenidas utilizando el modelo de Baranyi.

En manzana 'Golden Delicious' se observó la mayor variabilidad de los datos, esto quizás se deba a una mayor heterogeneidad en los frutos y su estado de madurez; en contraste con las variedades rojas, cuya dispersión de datos experimentales fue mucho menor. De manera general el crecimiento al final de las cinéticas de *Salmonella* en las tres variedades fue muy semejante, desde 4.6 a 4.9 log UFC/manzana. La velocidad de desarrollo fue mayor en la variedad amarilla, puede ser que las lenticelas de su superficie provean de sitios de refugio a los microorganismos y esto facilite aún más su crecimiento.

Existen diversos estudios que reportan el mismo comportamiento de un patógeno inoculado sobre la superficie de una hortaliza. En cilantro se observó una clara dispersión de los datos relacionados inherentemente al tipo de alimento y se obtuvieron errores estándar de aproximadamente 30%. Dicha variabilidad se explicó atribuyó al muestreo y desarrollo del experimento y no necesariamente al comportamiento del patógeno en el cilantro (Neri-Herrera, 2007).

Los resultados del comportamiento de *Salmonella* sobre manzana se compararon con imágenes de MEB para poder evidenciar la colonización sobre las diferentes variedades estudiadas. Se obtuvieron micrografías electrónicas de barrido de la superficie de las manzanas sin inocular, obtenidas luego de 5 días de almacenamiento a 22 °C. Los detalles de las características superficiales que presentaron en función de las variedades se observan en la Figura 13.

Es de conocimiento generalizado que en ambientes naturales las bacterias tienden a adherirse y formar biopelículas (Costerton *et al.*, 1995). Mediante microscopia electrónica de barrido se ha demostrado la presencia de biopelículas bacterianas en hojas de numerosas especies de plantas, tanto en su follaje como en sus frutos (Morris *et al.* 1997).

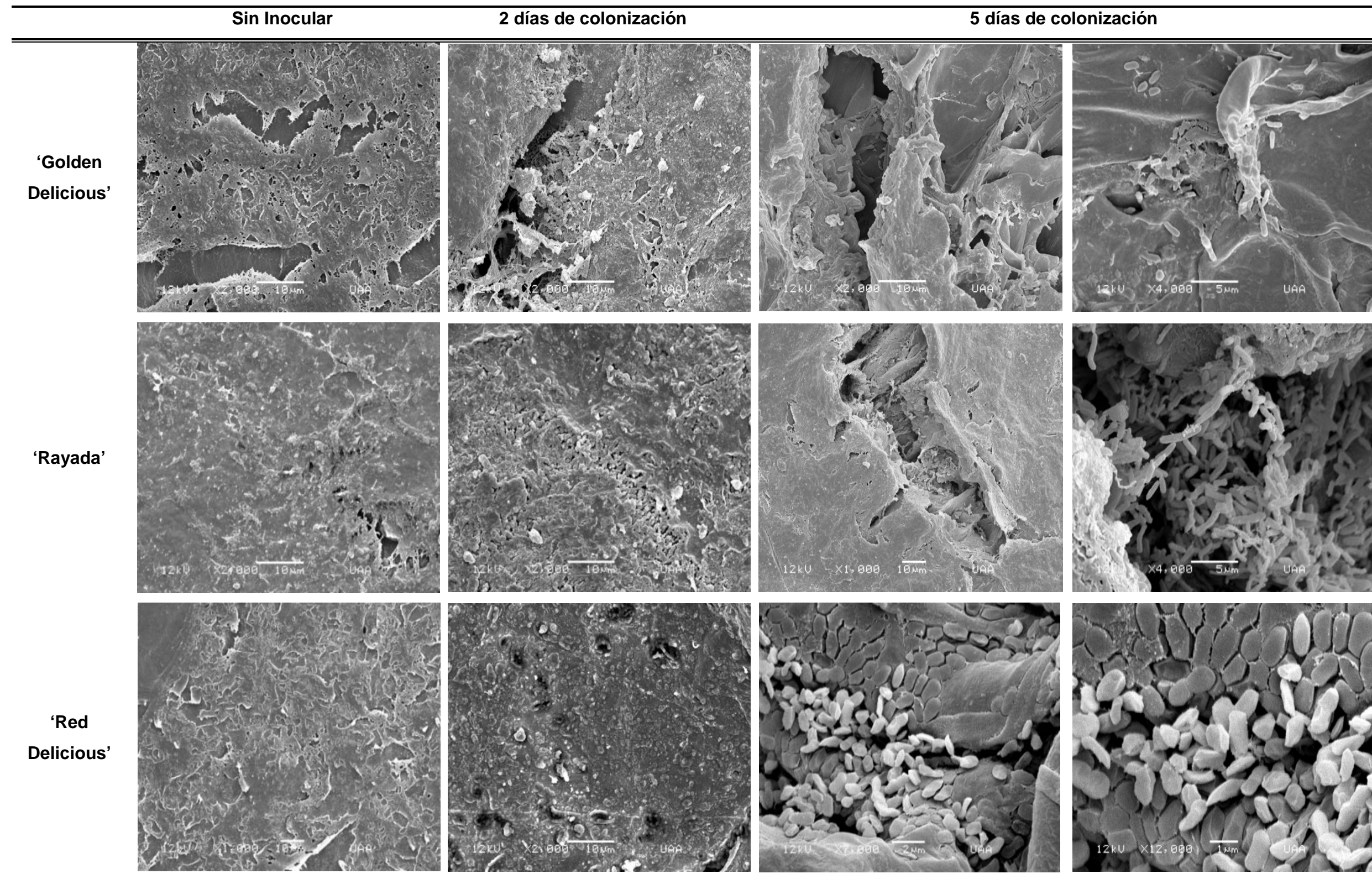


Figura 13. MEB de la superficie de manzana 'Golden Delicious', 'Rayada' y 'Red Delicious' sin inocular e inoculadas con *Salmonella* después de la etapa de colonización.

5.3.2. Evaluación de la capacidad de cepas individuales de *Salmonella* para colonizar y formar biopelículas en tres cultivares de manzana

Se realizaron estudios de colonización de manera individual con 5 cepas de *Salmonella* (provenientes del huerto y del cepario) sobre las tres variedades de estudio de manzana luego de 2 días de colonización. Se complementó el estudio con MEB.

Salmonella spp. aislada de materia fecal mostró los mayores porcentajes de adhesión en las variedades rayadas, así como la cepa de *S. Typhimurium* presentó la mayor capacidad de adhesión sobre ‘Golden Delicious’ (Tabla 12).

Tabla 12. Porcentaje de adhesión de *Salmonella* sobre manzana ‘Golden Delicious’, ‘Rayada’ y ‘Red Delicious’ previo a la colonización.

Origen de la cepa	‘Golden Delicious’	‘Rayada’	‘Red Delicious’
Manzana	0.175	0.025	0.033
Suelo	0.276	0.033	0.059
Materia fecal	0.634	6.632	1.856
Composta	0.068	0.068	0.135
Cepario (<i>S. Typhimurium</i>)	2.666	3.181	0.873
Promedio	0.288	1.689	0.521

La cepa de *Salmonella* aislada de suelo presentó los mayores incrementos en la población inicialmente adherida a la superficie de manzana, lo cual quizá se deba a que la suspensión de nutrientes empleada para la etapa de colonización fue una suspensión de suelo (10%) y probablemente la cepa se hayan adaptado con mayor facilidad dado la fuentes de aislamiento. Aunado a ello se observó un desarrollo muy similar entre todas las cepas de *Salmonella* sobre el cultivar ‘Golden Delicious’, donde se presentaron incrementos desde 0.6 a 1.2 Log UFC/manzana. Mientras que sobre las variedades rojas el comportamiento de cada cepa fue distinto en cuanto a su capacidad de desarrollo sobre los frutos, sin embargo en general se pudo observar tendencias similares de desarrollo de las

cepas, por mencionar, en ambos cultivares la cepa de *Salmonella* aislada de suelo fue la que presentó los mayores incrementos en la población (1.8 – 2 Log UFC) y la cepa de *S. Typhimurium* prácticamente se inhibió su desarrollo (Figura 14).

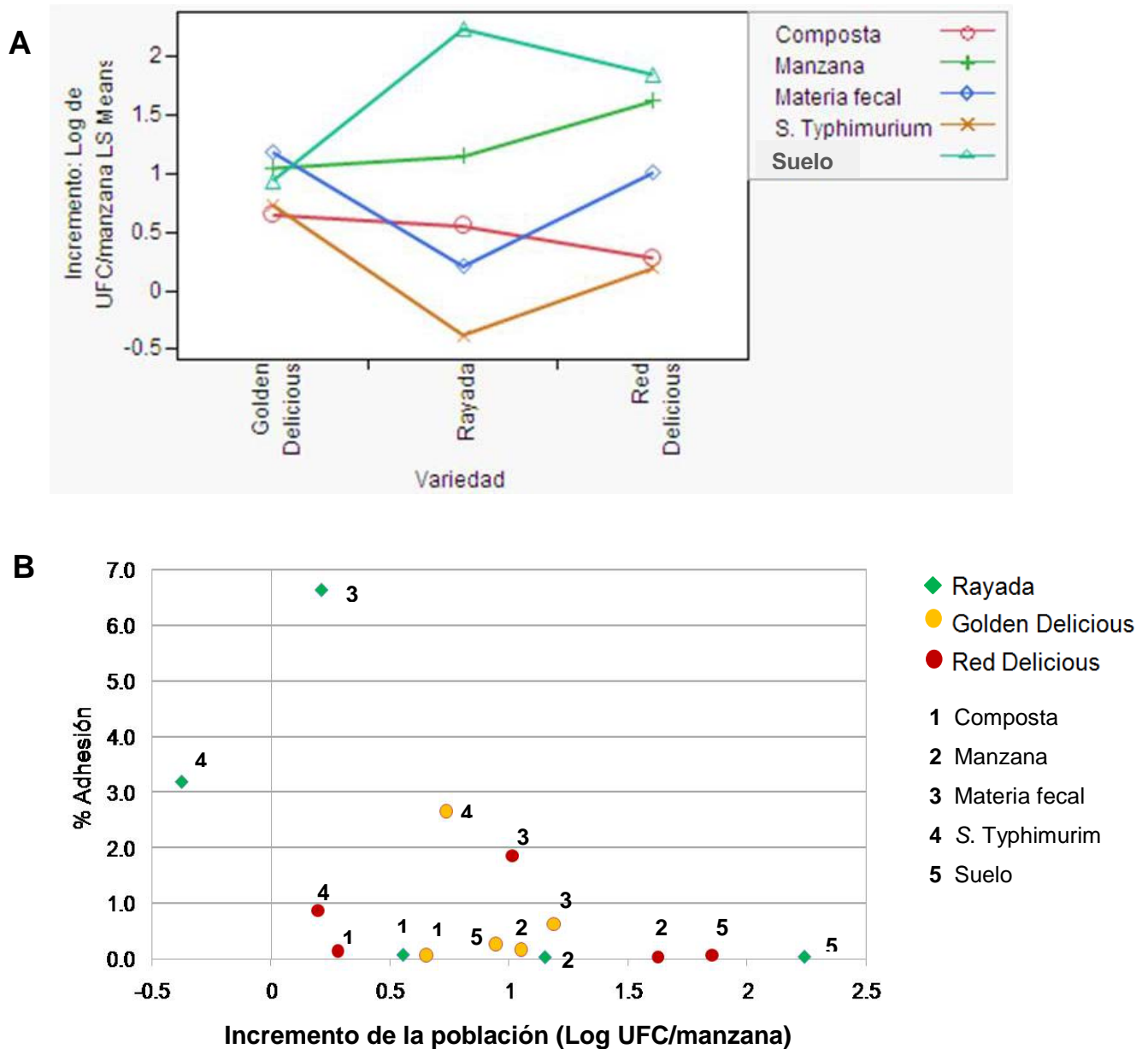


Figura 14. Análisis bidimensional del incremento de las diferentes cepas de *Salmonella* inoculadas sobre los tres cultivares de manzana. A. Análisis de interacciones. B. Relación entre % adhesión e incremento poblacional

Los resultados anteriores fueron contrastados con las micrografías obtenidas. Aparentemente presentaron correspondencia, en la mayoría de éstas se observaron abundantes cantidades de células de *Salmonella* adheridas irreversiblemente, las cuales lograron colonizar la superficie de los distintos cultivares hasta desarrollar y constituir biopelículas claramente definidas por varias capas celulares. Además se pudieron observar algunas levaduras y artefactos que pudieron provenir de la suspensión de suelo y/o propiamente de la manzana estudiada que se empleó en la colonización.

En las MEB que se tomaron después de 5 días de colonización, cuando se inoculó *Salmonella* spp. aislada de composta sobre manzana, se lograron observar asociaciones bacterianas (aconglomerados celulares en capas) más evidentes entre las células del patógeno, en particular sobre la variedad 'Rayada' en donde se formaron aglomerados en multicapas muy complejos (Figura 15).

Estudios realizados por diversos autores acerca de la capacidad de adhesión de *E. coli* O157:H7 sobre manzana lograron observar mejores asociaciones bacterianas en zonas inaccesibles de la manzana, sus extremos superiores (pedúnculo) e inferiores hundidos (Sapers *et al.*, 2002; Fatemi *et al.*, 2006). Burnett *et al.* (2000) demostraron en un estudio de MEB del tallo y las áreas de cáliz que células de *E. coli* fueron capaces de penetraren el corazón de la manzana y formar biopelículas en la región del cáliz y en tallo.

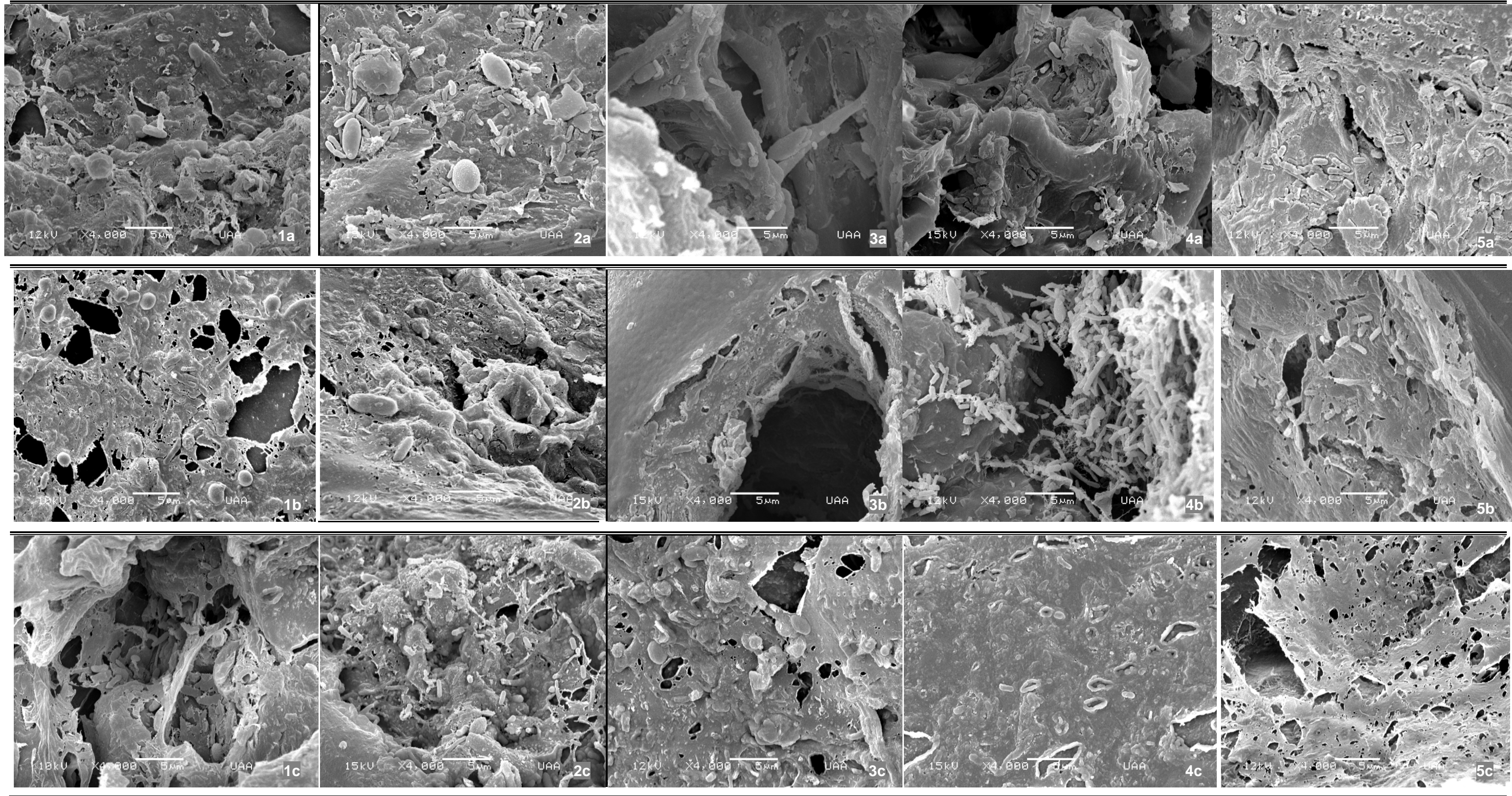


Figura 15. MEB (4000X) de manzanas 'Golden Delicious' (a), 'Rayada' (b) y 'Red Delicious' (c) inoculada con *Salmonella* spp. aislada de: 1. Manzana, 2.Suelo, 3.Materia fecal, 4.Composta y 5.*S. Typhimurium* después de 3 días de colonización a 22 °C

La superficie de 'Golden Delicious' se observa totalmente erosionada con varias opciones de reservorios por el tamaño de las grietas, incluidas las lenticelas que proporcionan una extraordinaria oportunidad de refugio para los microorganismos. En los recuentos de *Salmonella* sobre 'Golden Delicious', durante la mayor parte del tiempo logró mantener una mayor población adherida a su superficie esto pudiera estar relacionado con la superficie observada por MEB. En el estudio realizado por Liao y Sapers (2000) se observó que la adhesión de *S. Chester* en tejido dañado de manzana fue más eficiente y firme que en las superficies que no presentaron dañada la cáscara.

En contraste, las superficies de las variedades rojas presentaron menor erosión, algunas rugosidades, lográndose distinguir algunas grietas y cavidades que pudiesen funcionar como reservorios para los microorganismos.

Además se presentan las MEB en manzanas inoculadas con *Salmonella* después de 2 días de colonización, en las cuales no se lograron distinguir asociaciones bacterianas totalmente definidas pues únicamente se observaron algunas bacterias aisladas pero adheridas a la superficie de manera irreversible, resultaron contrastantes en contexto a los recuentos poblacionales realizados durante la cinética donde al cabo de ese tiempo se logró recuperar entre 4.8 y 5 log UFC/manzana en cualquiera de las tres variedades.

En las micrografías obtenidas luego de 5 días de colonización para las variedades rojas se observaron resultados impactantes en las cuales se aprecian largas cadenas de un microorganismo que podría ser *Salmonella*. También se observan aglomerados en monocapa y multicapas en las grietas y fisuras del tejido de las manzanas lo cual son producto del desarrollo microbiano de las células adheridas irreversiblemente y que llegaron a colonizar y formar el inicio de una biopelícula bien constituida. Aun así se presentaron dos morfologías distintas entre las células que colonizaron la variedad 'Rayada', bacilos largos y delgados en cadenas, y la variedad 'Red Delicious', bacilos regordetes, más cortos, aplanados y dispuestos en monocapa. Mientras que en 'Golden Delicious' se

lograron observar solo bacterias aisladas en muy poca cantidad lo cual contrasta totalmente con los altos recuentos durante su cinética.

5.3.3. Evaluación del efecto de la humedad relativa y la temperatura en la colonización de *Salmonella* sobre distintos cultivares de manzanas

Eventualmente un microorganismo adherido a un fruto podrá sobrevivir, multiplicarse o inactivarse, destino que depende de las características propias del germen, de los sustratos presentes y de las condiciones que prevalecen en su entorno.

Para apegar el estudio a condiciones medioambientales prevalentes en la huerta y acondicionar las muestras de manzana a situaciones más reales se realizó un análisis de datos de temperatura y humedad relativa de agosto de 2008 a noviembre de 2011 reportados por la estación meteorológica de San Joaquín, Querétaro (CEA Querétaro, 2011). En función a un análisis de prevalencia en horas promedio por día a través de todos los datos analizados de temperatura se logró establecer tres temperaturas (5, 15 y 22°C) representativas de un día promedio en la huerta, mientras que en función a un análisis de prevalencia de humedad relativa se seleccionaron tres condiciones de humedad relativa (58, 79 y 96%) para abarcar un mayor rango de posibles escenarios que pudiera enfrentar el patógeno en el huerto.

Para conocer el efecto de la temperatura y humedad relativa sobre la colonización y formación de biopelículas por parte de *Salmonella* se inoculó una mezcla de cepas sobre los tres cultivares de manzana y se almacenaron bajo diferentes combinaciones de humedad relativa y temperatura. Los resultados obtenidos a partir de este estudio se muestran en las Figura 16.

La temperatura fue un factor primordial en el desarrollo de *Salmonella* observándose el mayor desarrollo a 22 °C, mientras que a 15 °C se observaron niveles de crecimiento más retardados. Resultó evidente que al combinar temperatura y humedad relativa, *Salmonella* presentó un decremento en su población en la medida que las temperaturas de almacenamiento fueron menores independientemente de la humedad relativa. Es posible que *Salmonella* sobreviva sobre manzana hasta por más de 21 días bajo refrigeración (5 °C) y en diferentes humedades relativas (96%, 79% y 58%). En un estudio sobre jitomate verde inoculado en contacto con lodo se reportó que *Salmonella* permaneció viable luego de 45 días con un incremento en su población de hasta 2.5 log UFC/jitomate, después de 4 días de almacenamiento a 20 °C (Guo *et al.*, 2002).

En la Figura 16 se representan las cinéticas de crecimiento de *Salmonella* en la superficie de manzana. A 58 % HR se observó en general una adhesión inicial entre 2.2 – 3.8 log UFC/manzana para las tres variedades y a lo largo del almacenamiento el comportamiento de *Salmonella* fue similar ($p > 0.5$). Sin embargo, se observó un efecto muy marcado en función a la temperatura de almacenamiento pues a mayor temperatura mayor desarrollo mientras que a 5°C el microorganismo se inactivó, aun así las células continuaron viables luego de 20 días de incubación.

Ukuku *et al.* (2009) realizaron un estudio para conocer las cinéticas de crecimiento de microorganismos patógenos en sidra almacenadas en refrigeración (5 °C). Observaron un decremento en la población de *Salmonella* de 5 log UFC/mL a 4.5 log UFC/mL después de 16 días de almacenamiento.

En nuestro estudio, cuando la humedad relativa se mantuvo a 96% se registraron comportamientos de *Salmonella* muy similares en las tres variedades de manzana independientemente de la temperatura de incubación ($p > 0.5$). En una investigación realizada por Hernández *et al.* (2003) se observaron comportamientos similares de *S. Montevideo* inoculada en jitomate rojo, jitomate

verde y tomate después de 90 min de incubación a 12, 22 y 30 °C y humedades relativas de 75, 85 y 97 %.

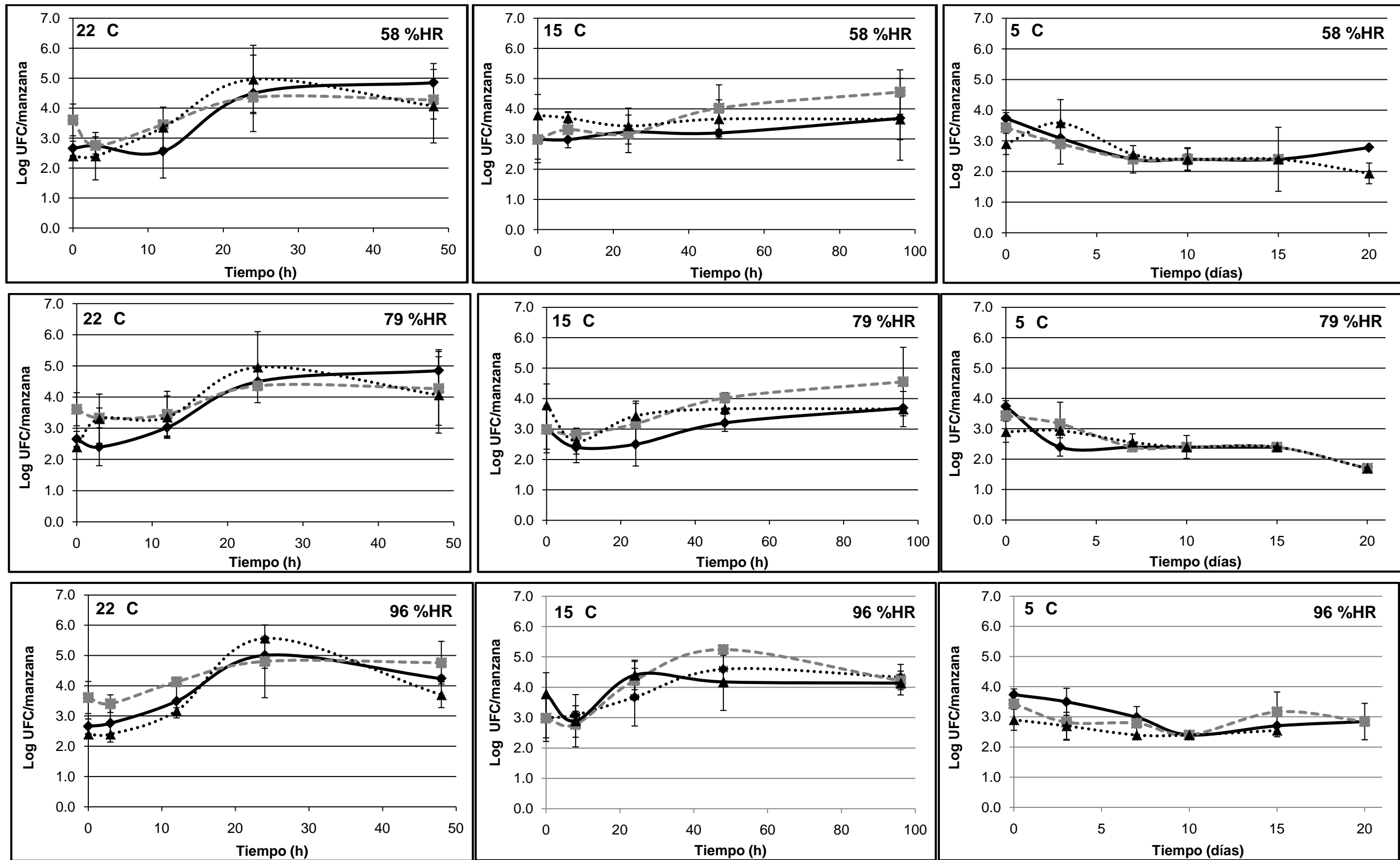


Figura 16. Cinéticas de desarrollo de *Salmonella* sobre manzana 'Golden Delicious', 'Rayada' y 'Red Delicious' almacenadas a distintas Humedades Relativas (HR) de 58%, 79% y 96% a 22 °C, 15 °C y 5 °C

En nuestro estudio se observó la epidermis de manzana mediante micrográficas electrónicas de barrido cuando se almacenaron a 22 °C a las diferentes humedades relativas (58, 79 y 96 %), para observar la presencia de formaciones tridimensionales de aglomerados celulares sobre la superficie de los distintos cultivares considerados (Figura 17).

En la Figura 17 a 96% HR de almacenamiento para 'Golden Delicious', se observó producción de exopolisacáridos que lograron embeber completamente las células de *Salmonella* adquiriendo protección en algunos sitios de refugio, dicha producción se vio limitada por la humedad relativa, pues en 79 y 58% HR la producción de exopolisacáridos fue muy poca o nula.

La colonización en la variedad 'Rayada' se logró en pequeños cúmulos aglomerados de bacterias con ligera producción de exopolisacáridos que les permitieron sobrevivir y desarrollar sobre la superficie de los frutos en humedades de 96 y 79%, mientras que en 58% la presencia de sitios de refugio en la epidermis (lenticelas) y las ceras que las recubren pueden ser los principales motivos para que *Salmonella* pudiese permanecer sobre éstas. Finalmente, en 'Red Delicious', luego de 2 días de colonización se recuperó un menor número de células adheridas en su superficie. Estos datos que coincidieron con las imágenes de MEB, en las que se observó la presencia de bacterias únicamente en grietas o sitios de la cáscara con poca o nula producción de exopolisacáridos, mientras que el resto de la superficie solo observó unas pocas bacterias aisladas.

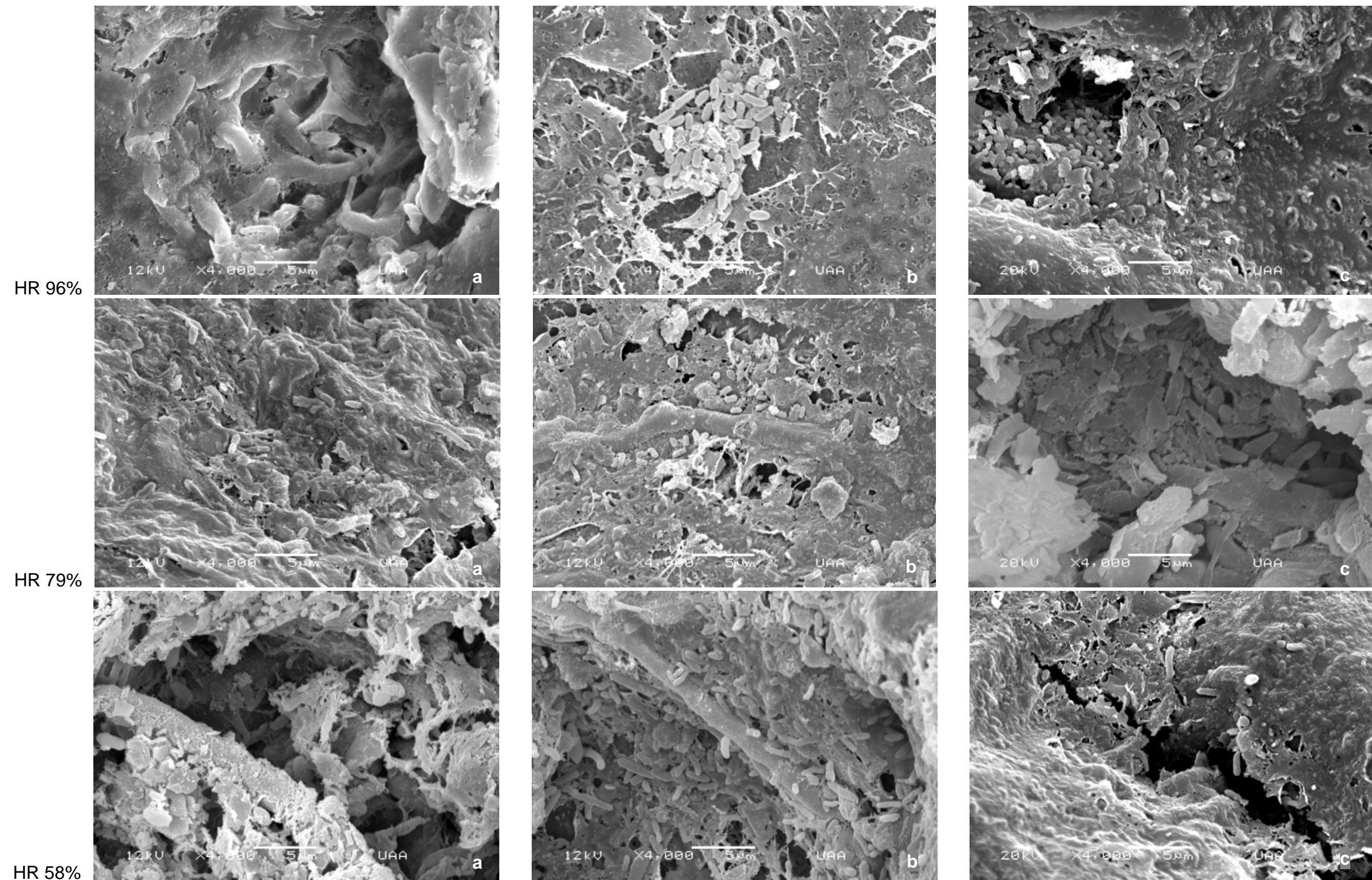


Figura 17. MEB de manzana inoculada con *Salmonella* después de 3 días de colonización a 22°C y almacenadas a diferentes humedades relativas (96%, 79% y 58%): a. 'Golden Delicious', b. 'Rayada', c. 'Red Delicious'.

5.4. Evaluación de la susceptibilidad de *Salmonella*, con capacidad de formar biopelículas, a germicidas químicos

Para evaluar los tratamientos germicidas como método de desinfección sobre las manzanas inoculadas con *Salmonella* spp., y específicamente sobre las biopelículas formadas, inicialmente fue necesario determinar el tiempo que requiere el microorganismo para colonizar el fruto a su nivel máximo y a la vez permanecer viable en su totalidad en estas estructuras. A partir de este experimento establecimos el tiempo de colonización de *Salmonella* en función de la variedad de manzana. Se realizó una medición a través de 5 días de la maduración de la biopelícula. Para ambos cultivares se observó que la población que desarrolló luego de 2 días de colonización se mantuvo sin cambios significativos hasta 5 días. Para el caso particular de 'Golden Delicious' decidimos aplicar los tratamientos luego de 3 días de colonización pues el fruto perdía integridad si se prolongaba su incubación, mientras que para 'Red Delicious' se prefirió aplicar los tratamientos al cabo de 5 días de colonización para tener biopelículas más consolidadas sin que esto afectara al fruto pues permanecía en perfecto estado fisiológico aparentemente.

Posteriormente, se determinó aplicar los tratamientos germicidas luego de la etapa de colonización establecida para cada cultivar con dos tipos de mezclas de *Salmonella*, una que incluyera solo cepas aisladas del huerto y otra con cepas control (cepario), para observar la variabilidad en el comportamiento entre las cepas, sobre dos cultivares ('Golden Delicious' y 'Red Delicious') después de aplicar varios tratamientos germicidas, ácido peracético, agua electrolizada neutra, cloro, desinfectante cítrico y agua destilada como control de arrastre.

En virtud de que no existe un protocolo estandarizado para el análisis de frutos ni para la evaluación de la eficiencia de tratamientos descontaminantes sobre frutos, es necesario adoptar estrategias referenciadas para evaluar una metodología sobre el fruto modelo, manzana, que se apegue a las necesidades de este estudio. Las principales consideraciones para el estudio de frutas crudas

se mencionan en la Tabla 9 (FDA, 2001a).

Tabla 9. Consideraciones al examinar frutas crudas para la presencia de microorganismos patógenos

<p>Procedimiento del muestreo. Lugar de origen de la muestra: campo, almacenamiento, planta de procesamiento, tienda de autoservicios, servicios de comida, hogar. Número y tamaño de las muestras. Distribución de las muestras en el lote de prueba. Protección de las muestras para su transporte al laboratorio. La manipulación de muestras entre la recolección y su análisis. Protección contra la contaminación cruzada. Temperatura entre la selección y el análisis de la muestra. Tiempo entre la selección y análisis de las muestras. Procesamiento de las muestras. Peso o número de piezas que representan muestras. Área o porción a ensayar (pieza entera, sólo la piel, cortado en dados, cortar). La selección de fluido de lavado o diluyente y el volumen que se utilizará. Temperatura de producir y fluido de lavado o diluyente Empapado o no empapado antes de procesar Tipo de tratamiento: lavado, frotando, homogeneizado, macerado, mezclado. Tiempo de procesamiento. Técnicas de cultivo. Enriquecimiento y / o siembra directa. Composición y volumen de caldo de enriquecimiento. Composición del medio de siembra directa. Técnica para el recuento del microorganismo. Temperatura y tiempo de incubación. Procedimientos de confirmación.</p>

FDA, 2001a

Las fuentes de variación son numerosas; pueden destacarse como indispensables para la a estandarización de una técnica las siguientes (Beuchat *et al.*, 2001): forma de inoculación, vehículo del patógeno, temperatura del producto a ser inoculado, tiempo de contacto con los germicidas, agitación durante el tratamiento, recuperación de los microorganismos, tipo de diluyente y neutralizante para inactivar al germicida residual y forma de liberar al microorganismo.

Al aplicar los tratamientos control (arrastre) sobre las manzanas 'Golden Delicious' con ambas mezclas de cepas se logró recuperar en promedio 6.2 Log UFC/manzana y sobre 'Red Delicious' hasta 6.4 Log UFC/manzana luego de ser expuestas las manzanas a agua destilada estéril 2 y 10 min.

Cuando se trataron las manzanas con las soluciones germicidas se observó la mayor reducción de *Salmonella* en biopelícula en manzana 'Golden Delicious', 2.3 log de UFC, y de 2.5 log de UFC en 'Red Delicious' con ácido peracético (80mg·L⁻¹ por 2 min), mientras que con agua electrolizada neutra y cloro las reducciones fueron semejantes en la misma variedad (Figura 18).

Las diferencias marcadas prevalentes fueron debidas a la mezcla de cepa, siendo más variable a los efectos germicidas la del cepario, mientras que la del huerto mantuvo los niveles de reducción únicamente en función al agente germicida. La mezcla de cepario mostró mayor susceptibilidad en la variedad 'Golden Delicious', en particular ante ácido peracético. La menor reducción se observó con el agente cítrico. Un mayor efecto germicida se correlacionó a tiempos de exposición mayores únicamente en 'Golden Delicious'.

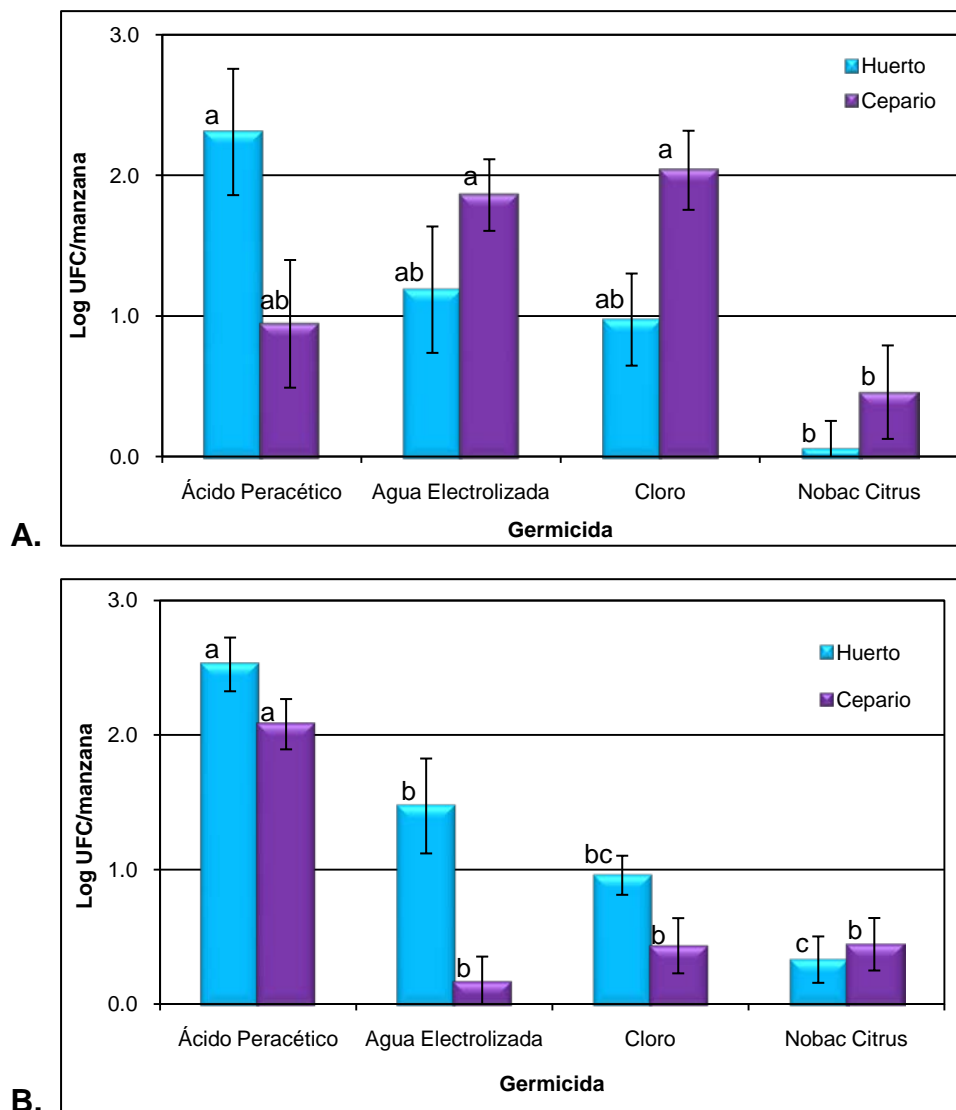


Figura 18. Reducción de dos mezclas de *Salmonella* spp. (huerto y cepario) sobre manzanas A. 'Golden Delicious' y B. 'Red Delicious' expuestas a cuatro germicidas

En un estudio realizado por Masson (1990) para evaluar la efectividad del ácido peracético (90 ppm) como tratamiento de desinfección sobre frutas y hortalizas listas para su consumo en ensaladas reportó una reducción cercana a 100 veces en la cuenta total de bacterias mesófilas aerobias y de coliformes fecales, en el mismo estudio se obtuvieron reducciones similares al aplicar 100 ppm de cloro sobre productos frescos listos para su consumo.

La reducción de la microbiota durante el almacenamiento posterior se atribuyó a los efectos residuales de ácido que se libera por la degradación del ácido peracético. El ácido peracético se ha utilizado ampliamente como desinfectante para equipos de procesamiento de alimentos donde es particularmente efectivo contra las biopelículas. Aunque tiene potencial como desinfectante de frutas su eficacia en la eliminación de microorganismos infecciosos adheridos a la superficie no ha sido estudiado.

En una investigación a cerca de la capacidad de *S. entérica* para formar biopelículas sobre la corteza de melón (Annous *et al.*, 2004) se observó mediante microscopia electrónica de barrido que la formación de la biopelícula se produjo en un par de horas. Los exopolisacáridos fueron vistos sobre la corteza de melón después de solo dos horas posteriores a la etapa de inoculación y secado (20 °C). La eficacia de la aplicación de desinfectantes en melón disminuyó significativamente si el organismo permanecía más de 24 h en la superficie, lo que sugiere que un tiempo de permanencia mayor conduce a la formación de una biopelícula antes de la aplicación del desinfectante (Annous *et al.*, 2004).

La unión de las células a sitios inaccesibles, tales como las rugosidades en la cáscara, junto con la formación de biopelículas son probablemente las principales causas responsables de la resistencia bacteriana a los desinfectantes (Annous *et al.*, 2004). Por lo tanto, se necesitan nuevas estrategias para mejorar la eficacia de los desinfectantes químicos contra patógenos en tratamientos de desinfección de tejidos vegetales.

Posteriormente decidimos evaluar una condición distinta que nos permitiera mejorar la reducción del patógeno. En virtud de que la máxima concentración permitida por la FDA para el uso de ácido peracético como desinfectante en frutas y hortalizas es de 60 ppm, se decidió incrementar el tiempo de exposición a esta solución (2 y 4 min). Mientras que el agua electrolizada neutra decidimos utilizar

también la misma concentración de cloro activo que en el anterior experimento ($200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y exponerlas manzanas a 10 y 20 min a este solución.

Se obtuvieron las mayores reducciones del microorganismo cuando se evaluaron los tratamientos para 'Golden Delicious' y con ácido peracético sin importar el tiempo de exposición (2.5 a 3 Log UFC/manzana), al aplicarlo sobre la variedad 'Red Delicious' solo se redujo en promedio 1.3 Log. Mientras que cuando se evaluó el tratamiento con agua electrolizada neutra se obtuvieron reducciones entre 1.2 y 2 Log UFC/manzana sin importar la variedad ni el tiempo de exposición.

En base al análisis estadístico el tiempo de exposición a los tratamientos resultó sin significancia estadística, resultó lo mismo emplear 2 min ó 4 min a ácido peracético y 10 min ó 20 min a agua electrolizada neutra. Y el mejor tratamiento germicida siguió siendo la exposición a ácido peracético (Figura 19).

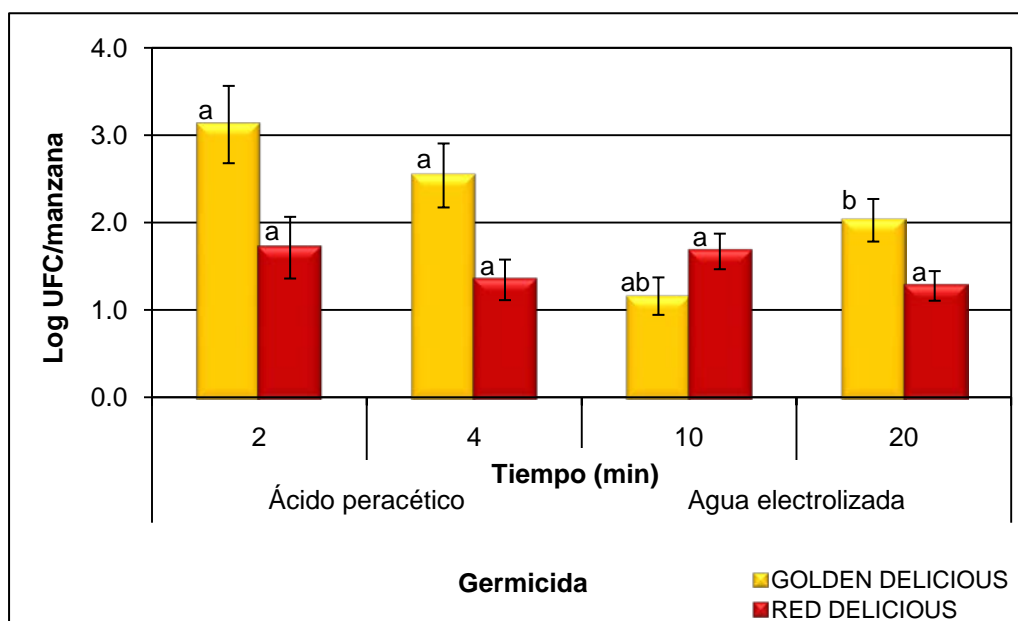


Figura 19. Reducción de mezcla de *Salmonella* spp. (Huerto) sobre manzanas 'Golden Delicious' y 'Red Delicious' expuestas a ácido peracético y agua electrolizada neutra

5.4.1. Efecto del ácido peracético y agua electrolizada neutra sobre biopelículas de cepas individuales de *Salmonella* en manzana

Para finalizar el trabajo se decidió evaluar el comportamiento de manera individual de las cepas aisladas y control contra los mejores tratamientos germicidas obtenidos, ácido peracético ($60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) por 2 min y agua electrolizada neutra ($200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloro activo) por 10 min sobre la variedad 'Golden Delicious'.

El tratamiento germicida con ácido peracético afectó de sobremanera la sobrevivencia de *Salmonella* ssp. aislada de suelo hasta 4.5 Log UFC/manzana de reducción, resultando ésta cepa como la más susceptible al tratamiento. A su vez la reducción con las demás cepas individuales resultó muy importante (3.0 – 3.5 Log UFC/manzana) y se pudo observar que el efecto del ácido peracético es mayor al enfrentar a las cepas de manera particular que si se expone a una mezcla de estas.

La reducción que se obtuvo con agua electrolizada neutra en el estudio de cepas individuales resultó sin diferencias estadísticamente significativas obteniendo se en promedio 2 Log UFC/manzana de reducción de *Salmonella* (Figura 20).

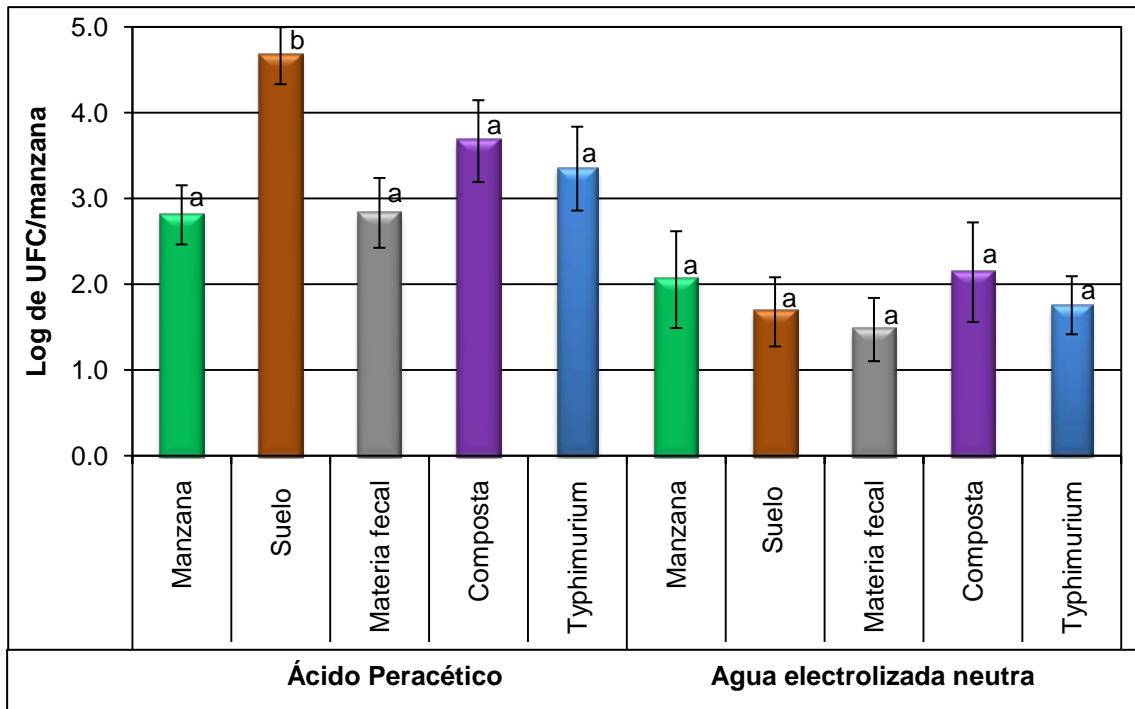


Figura 19. Reducción de cepas individuales de *Salmonella* spp. sobre manzanas 'Golden Delicious' expuestas a ácido peracético y agua electrolizada neutra

VI. CONCLUSIONES

- ❖ *Salmonella* spp. es capaz de adherirse en la superficie de manzana después de 3 h de incubación y de colonizar teniendo como única fuente de nutrientes de una suspensión de suelo (10%).
- ❖ La adhesión de *Salmonella* spp. resultó similar en los tres cultivares de manzana estudiados.
- ❖ Los estudios de microscopía electrónica de barrido confirmaron la presencia de biopelículas de *Salmonella* spp. en las variedades evaluadas después de 5 días de colonización.
- ❖ La cepa aislada de materia fecal fue la que presentó la mayor capacidad de adhesión en manzana 'Golden Delicious', mientras que *Salmonella* spp. aislada de suelo presentó el mayor incremento en su población durante la colonización en las variedades 'Rayada' y 'Red Delicious'.
- ❖ La temperatura resultó el factor determinante para el desarrollo de *Salmonella* spp. Las mejores condiciones para la colonización de *Salmonella* spp. sobre manzana fueron: humedad relativa de 96% y temperatura de 22°C, mientras que a 5°C se inhibió su desarrollo en todos los niveles de humedad relativa estudiados, tendiéndose a la inactivación del patógeno.
- ❖ La mayor reducción de *Salmonella* spp. en biopelícula en manzana se obtuvo mediante la exposición de 80 mg.L⁻¹ de ácido peracético durante 2 min en los dos cultivares evaluados (2.3 y 2.5 log UFC en 'Golden Delicious' y 'Red Delicious', respectivamente).

VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abadias, M., T.P. Cañamás, A. Asensio, M. Anguera and I. Viñas. 2006. Microbial quality of comercial 'Golden Delicious' apples throughout production and shelf-life in Lleida (Catalonia, Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 108:404-409.
- Al-Haq, M. I., J. Sugyama and S. Isobe. 2005. Applications of electrolyzed wáter in agricultura and food industries. *Food Sci. Technol. Res. Int.* 11: 135-150.
- Álvarez, R. S. 1996. El manzano. 4ta. Ed. Publicaciones de Extensión Agraria. Ministerios de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. p. 503
- Annous, B. A., G. M. Sapers, A. M. Mattrazzo and D. Riordan. 2001. Efficacy of washing with a commercial flatbed brush washer, using conventional and experimental washing agents, in reducing populations of *Escherichia coli* on artificially inoculated apples. *J. Food Prot.* 64:159-163.
- Annous, B. A., A. Burke and J. E. Sites. 2004. Surface pasteurization of whole fresh cantaloupes inoculated with *Salmonella* Poona or *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 67:1876-1885.
- Annous, B. A., G. M. Sappers, D. M. Jones and A. Burke. 2005a. Improved recovery procedure for evaluation of sanitizer efficacy in disinfecting contaminated cantaloupes. *J. Food Sci.* 70:242-247.
- Annous, B. A., E. B. Solomon, P. H. Cooke and A. Burke. 2005b. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on cantaloupe melons. *J. Food Safety.* 25:276-287.
- Arias, V. 2011. *Enterobacteriaceae, Escherichia coli y Salmonella* spp. como parámetros en la verificación de las prácticas sanitarias agrícolas durante el manejo poscosecha de hortalizas en empresas exportadoras. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química. Querétaro, México. 112 p.
- Bang, I. S., B. H. Kim, J. W. Foster and Y. K. Park. 2000. OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella* enteric serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 182:2245–2252.
- Barbara-Vu, M., R. Crawford and E. Ivanova. 2009. Review: Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules.* 14:2535-2554.
- Bartz, J. A. and R. K. Showalter. 1981. Infiltration of tomatoes by aqueous bacterial suspensions, *Phytopathology*, 71: 515-518.

- Bartz, J. A., 1982. Infiltration of tomatoes immersed at different temperatures to different depths in suspensions of *Erwinia carotovora* subsp *carotovora*, Plant. Dis., 66: 302-305.
- Besser, R. E., S. M. Lett, J. T. Weber, M. P. Doyle, T. J. Barrett, J. G. Wells and P. M. Griffin. 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. J. Am. Med. Assoc. 269:2217–2220.
- Beuchat, L.R., 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. J. Food Prot. 59:204–216.
- Beuchat, L. R. and J. H. Ryu. 1997. Produce handling and processing practices. Emerg. Infect. Dis. 3: 459-465.
- Beuchat, L.R., 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. Microbes Infect. 4: 413-423.
- Blostein, J. 1993. An outbreak of *Salmonella javiana* associated with consumption of watermelon. J. Environ. Health 56(1):29-31.
- Brackett, R. E. 1999. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. Postharvest Biol. Technol. 15: 305–311.
- Brandl, M. T. and R. E. Mandrell. 2002. Fitness of *Salmonella* enteric serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. Appl. Environ. Microbiol. 68:3614-3621.
- Brandl, M. T. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. Annu. Rev. Phytopathol. 44:367-392.
- Buchanan, R. L., S. G. Edelson, R. L. Miller and G. M. Sapers. 1999. Contamination on intact apples after immersion in an aqueous environment containing *Escherichia coli* O157 :H7. J. Food Prot. 62 : 444-450.
- Buck, J. W., R. R. Walcott and L. R. Beuchat. 2003. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. Online. Plant Health Progress doi: 10.1094/PHP-2003-0121-01-RV.
- Burnet, S. L., J. Chen and L. R. Beuchat. 2000. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. Appl. Environ. Microbiol. 66:4679-4687.
- Butler, M. E. 2000. *Salmonella* outbreak leads to juice recall in Western states. Food Chem News 42(10):19.

- Castañeda, J. A. 2010. Incidencia de *Salmonella* y *Escherichia coli* en apio durante su cultivo, empaque, comercialización y consumo. Comportamiento de *Salmonella* en jugo de apio. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro. México.
- Castaño, T. E. y D. J. Domínguez. 2010. Diseño de Experimentos. Estrategias y Análisis en Ciencia y Tecnología. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. 418 p.
- CDC, 1975. *Salmonella* Typhimurium outbreak traced to commercial apple cider—New Jersey. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 24:87–88.
- CDC, 1979. *Salmonella* Oranienburg gastroenteritis associated with consumption of precut water melons — Illinois. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 28:522–523. Fecha de consulta: marzo de 2011. Página consultada: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091265.htm>
- CDC. 1991. Multi-state outbreak of *Salmonella poona* infections - United States and Canada 1991. MMWR 40:549-52.
- CDC. 1995. Outbreak of *S. hartford* among travellers to Orlando, FA, May 1995. Atlanta, GA: CDC.
- CDC, 1996. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice, British Columbia, California, Colorado and Washington. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 1997. 45(44):975. Fecha de consulta: marzo de 2011. Página consultada: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00044358.htm>
- CDC, 1997. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection and cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider: Connecticut and New York, October 1996, Morbid. Mortal. Weekly Rep. 46:4–8.
- CDC, 1997. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with drinking unpasteurized apple cider—October 1996. Update on emerging infections from the Center for disease Control and Prevention. Annu. Emergency Med. 29:645–646.
- CDC. 1998. Outbreak of cyclosporiasis--Ontario, Canada, May 1998. MMWR 47:806-9.
- CDC. 1999. Outbreak of *Salmonella* serotype Muenchen infections associated with unpasteurized orange juice--United States and Canada, July 1999. MMWR 48:582-5.

- CDC. 2000. CDC surveillance summaries; March 17, 2000. MMWR 49(SS-1):1-51.
- CDC, 2008. Outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections associated with multiple raw produce items. United States. Weekly. 57(34): 929-934.
- CDC, 2008. Investigation of outbreak of infections caused by *Salmonella* Litchfield. United States. Página web consultada (agosto 2012):
<http://www.cdc.gov/salmonella/litchfield/>.
- CDC, 2011. Investigation update: Multistate outbreak of *Salmonella* Panama infections linked to cantaloupe. Página web consultada (agosto 2012):
<http://www.cdc.gov/salmonella/panama0311/062311/index.html>
- CDC, 2011. Investigation update: Multistate outbreak of human *Salmonella* Agona infections linked to whole, fresh imported papayas. Página web consultada (agosto 2012):
<http://www.cdc.gov/salmonella/agona-papayas/082911/index.html>
- CDC, 2012. Multistate outbreak of *Salmonella* Typhimurium infections linked to cantaloupe. Página web consultada (agosto 2012):
<http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-cantaloupe-08-12/index.html>
- Chmielewski, R. A. N. and J. F. Frank. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive Reviews in Food Sci. and Food Safety. 2: 22-32.
- Cody, S.H., Glynn, M.K., Farrar, J.A., Cairns, K.L., Griffin, P.M., Kobayashi, J., Fyfe, M., Hoffman, R., King, A.S., Lewis, J.H., Swaminathan, B., Bryant, R.G., Vugia, D.J., 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. Annals of Internal Medicine 130: 202–209.
- Comisión Estatal de Aguas de Querétaro (CEA Querétaro), 2011. Clima y pronóstico. Conoce la red de estaciones. Red de Estaciones Meteorológicas. Consulta electrónica:
<http://www.ceaqueretaro.gob.mx/contenido.aspx>
<http://www.wunderground.com/weatherstation/WXDailyHistory.asp?ID=ICADEREY2>
- Cook, K. A., T. E. Dobbs and W. G. Hlady. 1998. Outbreak of *Salmonella* serotype Hartford infections associated with pasteurized orange juice. J. Am. Assoc. 280:1504–1509.
- Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu. Rev. Microbiol, 41: 435-464.

- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber and H. M. Lappin-Scott. 1995. Microbial biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.* 49:711-745.
- D'Aoust, J. Y. and J. Maurer. 2007. *Salmonella* species, In M.P. Doyle and L.R. Beuchat (ed.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* 3rd edition. ASM Press, Washington, D.C. 187-236.
- Deeks S, A. Ellis, B. Ciebin, R. Khakhria, M. Naus and J. Hockin. 1998. *Salmonella oranienburg*, Ontario, *Can. Comm. Dis. Rep.* 24:177-9.
- Del Rosario, B. A. and L. R. Beuchat. 1995. Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. *J. Food Prot.* 58(1):105-7.
- De Roever, C. 1998. Microbial safety evaluations and recommendation on fresh produce. *Food Ctrl.* 9:321-347.
- Deza, M. A., M. Araujo y M. J. Garrido. 2005. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces by neutral electrolyzed water. *Lett. Appl. Microbiol.* 40: 341-346.
- Donlan, R. M. and I. W. Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (2):167-193.
- Drouin, G. 2002. Obtención artesanal de sidra: Evaluación de mezclas de manzanas producidas en la Sierra de Querétaro y de cepas de levadura sobre la calidad del producto. Querétaro, México, p. 72.
- Erickson, M. C., H. Islam, C. Sheppard, I. Liao and M. Doyle. 2004. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* enteric serovar Enteritidis in chicken manure by larvae of the black soldier fly. *J. Food Prot.* 67(4):685-690.
- Espinal, P., E. Prieto, V. Otero y S. Máttar. 2006. Presencia del gen de invasividad *invA* en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de alimentos del caribe colombiano. *Revista Cubana de Salud Pública*, abril-junio, Sociedad Cubana de Administración de Salud. 32 (002): 115-120.
- EU Scientific Committee on Food, 2002. Risk Profile on the Microbiological Contamination of Fruits and Vegetables Eaten Raw.
- FAOSTAT, 2008. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Producción. Cultivos. México. Manzanas. 2009.

<http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>. Consulta electrónica: marzo de 2011.

Farber, J. M., 2000. Qualitative risk assessment unpasteurized fruit juice/cider. Ottawa, Ontario: Health Canada, Food Directorate, Health Products and Food Branch. 27 p.

Fatemi, P. and S. Knabel. 2006. Evaluation of sanitizer penetration and its effect on destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in 'Golden Delicious' apples. J Food Prot. 69 (3):548-555.

FDA, 1998. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091389.htm>. Consulta electrónica: febrero de 2011

FDA. 1999. Report of 1997 inspections of fresh, unpasteurized apple cider manufacturers. Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov>. Consulta electrónica: febrero de 2011

FDA, 2001a. Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce. Cap. IV. Outbreaks associated with fresh and fresh produce, incidence, growth and survival of pathogens in fresh and fresh produce. <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift3-4o.html> Consulta electrónica: febrero de 2011, agosto 2012.

FDA, 2001b. Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce. Cap. III. Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift3-4o.html> Consulta electrónica: agosto de 2012.

Fernández, E. 2009. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. 2da. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. p. 214, 279, 409.

Fernández, F. 2003. Efecto de la aplicación de ethrel y cloruro de calcio sobre la calidad y la capacidad de conservación de manzana 'Golden Delicious' y 'Red Delicious' producidas en Cadereyta, Querétaro. Tesis de Maestría Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química. Querétaro, México. p. 88.

Ferreira, M. A. 2009. Influencia de cepas del origen de *Listeria monocytogenes* en la Eficacia de Tratamientos de Desinfección en Espinaca. Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad de Guanajuato. Facultad de Química. Guanajuato, México. p. 56, 57.

- Francis, G. A., C. Thomas and D. O'Beirne. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *Int. J. Food. Sci. Technol.*, 34: 1-22.
- García, E. 1998. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 4^{ta}. Ed. UNAM. D. F., México. 217p. 27.
- Gay, J. M., D. H. Rice and J. H. Steiger. 1994. Prevalence of fecal *Salmonella* shedding by cull dairy cattle marketed in Washington State. *J. Food Prot.* 57:195-197.
- Gayler, G. E., R. A. MacCready, J. P. Reardon and B. F. McKernan. 1955. An outbreak of Salmonellosis traced to watermelon. *Public Health Reports* 70(3):311-3.
- González, H. A., M. R. Fernández, R. F. Aroldo, E. Castaño y R. Martínez. 2005. Diversidad genética en poblaciones de manzano en Querétaro, México. Revelada por marcadores RAPD. *Rev. Fitotec. Mex.* 28(2):83-91.
- Goto, M. 1992. *Fundamentals of bacterial plant pathology*. Academic Press Inc. San Diego, California, USA. p. 458.
- Greenberg, C. 1992. Annex 7. Live feed production section A Determination of active chlorine content in comercial grade bleach. FAO. Consulta electrónica (febrero, 2012): <http://www.fao.org/docrep/005/x3980e/x3980e0k.htm>
- Greenspan, F and D. Mackellar. 1948. Analysis of Aliphatic per acids. *Analytical Chemistry.* 20(11): 1061 – 1063.
- Guo, X., J. Chen, R. Brackett and L. Beuchat. 2002. Survival of *Salmonella* on tomatoes stored at high relative humidity, in soil, and on tomatoes in contact with soil. *J. Food Prot.* 65(2): 274 – 279.
- Gutiérrez-Cogco, L. 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública de México.* 42(6):490-495.
- Hedberg, C. W., K. L. MacDonald and M. T. Osterholm. 1994. Changing epidemiology of food-borne disease: a Minnesota perspective. *Clin. Infect. Dis.* 18:671–682.
- Hedberg, C. W., F. J. Angulo, K. E. White, C. W. Langkop, W. L. Schell, M. G. Stobierski, A. Schuchat, J. M. Besser, S. Dietrich, L. Helsen, P. M. Griffin, J. W. Issa-Zacharia, Y. Kamitani, H. Muhimbula and K. Iwasaki. 2010. Antimicrobial effect of slightly acidic electrolyzed water for inactivation of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* on fresh strawberries (*Fragaria L.*), *Af. J. Microbiol. Research.* 4 (20):2174-2180.

- Hernández-Iturriaga, M. 2003. Adhesión, colonización y remoción de *Salmonella* en jitomate. Tesis de Doctorado en Ciencia de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. 118 p.
- Hernández-Iturriaga, M., E. Escartín, L. Beuchat and R. Martínez-Peniche. 2003 Effect of inoculum size, relative humidity, storage temperature and ripening stage on the attachment of *Salmonella* Montevideo to tomatoes and tomatillos. J. Food Prot. 66(10): 1756 - 1761.
- Hernández-Iturriaga, M., M. Tamplin and E. Escartín. 2007 Colonization of tomatoes by *Salmonella* Montevideo is affected by relative humidity and storage temperature. J. Food Prot. 70(1): 30 – 34.
- Herwaldt, B. L. and M. L. Ackers. 1997. An Outbreak in 1996 of cyclosporiasis associated with imported raspberries. New England. J. Med. 336(22):1548-56.
- Herwaldt, B. L. and M. J. Beach. 1999. The return of Cyclospora in 1997: another outbreak of cyclosporiasis in North America associated with imported berries. Ann. of Intern. Med. 130:210-9.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 1996. Microorganism in Foods 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens. Black Acad. & Professional, London.
- Islam, M., J. Morgan, M. P. Doyle, S. C. Phatak, P. Millner and X. Jiang. 2004a. Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. J. Food Prot. 67 (7):1365-1370.
- Islam, M., J. Morgan, M. P. Doyle and X. Jiang. 2004b. Fate of *Escherichia coli* O157: H7 in manure compost amended soil and on carrots and onions grown in an environmentally controlled growth chamber. J. Food Prot. 67(3):574-578.
- Islam, M., J. Morgan, M. P. Doyle, S. C. Phatak, P. Millner and X. Jiang. 2004c. Fate of *Salmonella* enteric serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. Appl. Environ. Microbiol. 70(4):2497-2502.
- Islam, M., J. Morgan, M. P. Doyle, S. C. Phatak, P. Millner and X. Jiang. 2004d. Persistence of *Salmonella* enteric serovar Typhimurium on lettuce and parsley and in soil on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. Foodborne Pathog. Dis. 1(1):27-35.

- Issa-Zacharias, A., Yoshinori, K., Nami, M. and Koichi, I. 2011. Application of slightly acidic electrolyzed water as a potential non thermal food sanitizer for decontamination of fresh ready to eat vegetables and sprouts. *Food control*. 22: 601-607.
- Issa-Zacharias, A., K. Yoshinori, M. Happiness and I. Koichi. 2010. Antimicrobial effect of slightly acidic electrolyzed water for inactivation of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* on fresh strawberries. *African J. Microbiol. Res*. 4(20): 2174-2180.
- Janick, J., J. N. Cummins, S. K. Brown and I. Hemmat. 1996. *Fruit Breeding: tree and tropicals fruits*. Ed. Sons Inc. Indiana, USA. 1:1-117.
- Janisiewicz, W. J., W. S. Conway and B. Leverentz. 1999. Biological Control of Postharvest Decays of Apple Can Prevent Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Apple Wounds. *J. Food Prot.* 62 (12): 1372-1375(4).
- Japakast, J., S. Siriporn, C. Pornthip and P. Wanchai. 2006. Efficacy of Electrolyzed – oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* inoculated on holy basil. *Nat. Sci.* 40: 716-720.
- Jasso, H. 2008. *Procedimientos Estándares Operacionales en la Industria Alimentaria*. Programa Universitario de Alimentos. UNAM.
- Kader, A. A., 2002. *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. Third Edition. University of California. Agriculture and Natural Resources. Publication 3311.
- Kasková, A., O. Ondrasovicová, M. Vargová, M. Ondrasovic and J. Venglovsky. 2007. Application of peracetic acid and quaternary ammonium disinfectants as a part of sanitary treatment in a poultry house and poultry processing plant. *Zoonoses and Public Health*. 54: 125-130.
- Kaspar, C. W. and M. L. Tamplin. 1993. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2425-2429.
- Keller, S. E., S. J. Chirtel, R. I. Merker, K. T. Taylor, H. L. Tan and A. J. Miller. 2004. *J. Food Prot.*, 67:2240.
- Knee, M. 2002. *Fruit Quality and its Biological Basis*. Ed. CRC Press. USA and Canada, p. 2, 180-224.

- Kenney, S. J. and L. Beuchat. 2002. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Muenchen on apples as affected by application of commercial fruit waxes. *Int. J. Food Microbiol.* 77:223–233.
- Lalatta, F. 1999. Guía completa del cultivo de las manzanas. Ed. Vecchi Barcelona, España. p. 43–50.
- Lampel, K. A. 2012. Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. *Salmonella* spp. 2nd Edition. Food Drug Administration. p 12-16.
- Liao, C. and G. Sapers. 2000. Attachment and growth of *Salmonella* Chester on apple fruits and in vivo response of attached bacteria to sanitizer treatments. *J. Food Prot.* 63:876-883.
- Liao, L. B., W. M. Chen and X. M. Xiao. 2007. The generation and inactivation mechanism of oxidation-reduction potential of electrolyzed oxidizing water. *J. Food. Eng.* 78: 1326-1332.
- Liu, T., K. Liljebelke, E. Bartlett, C. Hofacre, S. Sánchez and J. J. Maurer. 2002. Application of nested polymerase chain reaction to detection of *Salmonella* in poultry environment. *J. Food. Prot.* 65:1227-1232.
- Lund, B. M. 1992. Ecosystems in vegetable foods. *J. Appl. Bact.* 73(21):115S-135S.
- Lund, B. M. and A. L. Snowdon. 2000. Fresh and processed fruits, Chapter 27. In: Lund BM, Baird-Parker TC, Gould GW, editors. The microbiological safety and quality of food, Volume I. Gaithersburg (MD): Aspen. p 738-58.
- Mafu, A. A., D. Roy, J. Goulet and L. Savoie. 1991. Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1969-1973.
- Mahon, B. E., A. Ponka, W. N. Hall, K. Komatsu, S. E. Dietrich, A. Siitonen, G. Cage, P. S. Hayes, M. A. Lambert-Fair, N. H. Bean, P. M. Griffin and L. Slutsker. 1997. An international outbreak of *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *J. Infect. Dis.* 175:876–882.
- Masson, R.B. 1990. Recherche de nouveaux désinfectants pour les produits de 4^{ème} gamme. Proc. Congress Produits de 4^{ème} Gamme et de 5^{ème} Gamme. Brussels, CERIA.
- Manson, S. 2004. Manzanas y más. Extensión de la Universidad de Illinois. <http://www.urbanext.uiuc.edu>. Fecha de consulta: 10 de junio de 2011.

- Marchand, L. L., P. S. Murphy, H. J. Hankin, R. L. Wilkens and N. L. Kolonel. 2000. Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Nat. Cancer Inst.* 92:150–160.
- Martínez, P. R., F. R. Montes, T. J. Castillo, J. Simpson y G. C. Venegas. 2003. Estudio de diversidad genética, la calidad y la capacidad de almacenamiento del fruto de las poblaciones de manzano (*Mallus spp.*) en Querétaro y Guanajuato. Cuaderno de trabajo. Sist. Inv. Miguel Hidalgo, Área de Alimentos. CONACYT. Querétaro, México. p. 23.
- Masson, R. B. 1990. Recherche de nouveaux désinfectants pour les produits de 4ème gamme. Proc.Congress Produits de 4ème Gamme et de 5ème Gamme. Brussels, CERIA.
- Mazza, G. and E. Miniati.. 1993. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains.CRC Press.ISA.29–57.
- McFarland and M. T. Osterholm. 1999. Outbreaks of salmonellosis associated with eating uncooked tomatoes: implications for public health. *Epidemiol. Infect.* 122:385–393.
- Mendoza, L. A., M. Kushad, C. Zavala y R. Martínez. 2006. Efecto del número de frutos por racimo y fecha de corte en la calidad de manzana ‘Rayada’. *Rev. Fitotec. Mex.* 29 (2):45–50.
- Millard, P.S., K. F. Gensheimer, D. G. Addiss, D. M. Sosin, G. A. Beckett, A. Houck-Jankoski and A. Hudson. 1994. An outbreak of Cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider, *J. Am. Med. Assoc.*, 272:1592–1596.
- Mohle-Boetani, J., R. Reporter and S. B. Werner. 1999. An outbreak of *Salmonella* serogroup Saphra due to cantaloupes from Mexico. *J. Infect. Dis.* 180:1361–1364.
- Moore, J. and J. Ballington. 1991. Genetic resources of temperate fruit and nutgroup: Apples. *Int. Soc. Hort. Sci.* 199:3–62.
- Moreira, J. 2000. Washington apples. <http://www.bestapples.com>. Fecha de consulta: 10 de junio de 2011.
- Morris, C. E., J. M. Monier and M. A. Jacques. 1997. Methods fro observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1570-1576.
- Neri-Herrera, E. 2007. Aplicación de modelos matemáticos en la evaluación de algunos factores que afectan el comportamiento de *Salmonella enterica* en cilantro. Tesis de maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. p. 94

- NMX-FF-061-SCFI (2003). Fruta fresca – Manzana (*Malus pumila* Mill) – Especificaciones. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 17 de febrero de 2003.
- Nguyen-the, C. and F. Carlin. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews Food Sci. Nutrition* 34:371–401.
- Niu, M. T, L. B. Polish, B. H. Robertson, B. K. Khanna, B. A. Woodruff, C. N. Shapiro, M. A. Miller, J. D. Smith, J. K. Gedrose and M. J. Alter. 1992. Multistate outbreak of hepatitis A associated with frozen strawberries. *J. Inf. Dis.* 166:518-24.
- Ojeda, C. P. 2009. Aplicación de ácidos orgánicos en la reducción de microorganismos Aerobios mesófilos y, Coliformes Totales y Fecales en canales de bovinos. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Mecánica. Escuela Superior Politécnica de Litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Ecuador. p. 43.
- Orozco, L., L. Romero and E. Escartín. 2008. Microbiological profile of greenhouses in farm producing hydroponic tomatoes. *J. Food Prot.* 71(1): 60 - 65.
- Padilla, J. 2010. Diversidad genética y capacidad para formar biopelículas de cepas de *Leuconostoc* spp. Aisladas de una planta procesadora de salchichas. Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. p. 33, 34, 37, 40–46.
- Paquet, P. 1923. Épidémie de fièvre typhoïde: Déterminée par la consommation de petit citre. *Revue d'Hygiène*, 45: 165-169.
- Parish, M. E., 1996. Incidence of coliforms, *E. coli* and *Salmonella* associated with a citrus processing facility. 1996 IFT Annual Meeting, Book of Abstracts, 44.
- Parish, M. E., J. A. Narcisco and L. M. Friedrich. 1997. Survival of *Salmonella* in orange juice. *J. Food Saf.* 17:273–281.
- PHAC, 2001. Infect. Dis. News Brief. August and October, 2001. Public Health Agency of Canada. <http://www.phac-aspc.gc.ca/bid-bmi/dsd-dsm/nb-ab/2001/nb4201-eng.php>. Fecha de consulta: marzo de 2011.
- Pirovani, M. 2004. Reduction of chlorine concentration and microbial load during washing-disinfection of shredded lettuce. *Int. J. Food Sci. Tech.* 39: 341-347.

- Pérez-Barba, R. 1998. Contaminación y dinámica de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* en brócoli. Tesis maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
- Ponce, G. A., T. A. Sanz, G. A. Gómez y C. I. Caamal.. 1999. Producción y comercialización de manzana en México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo, México, D.F., p. 20-25.
- Ramírez, R. H. y M. Cepeda. 1993. El manzano. 2^{da}. Ed. Trillas. México, D.F., p. 160.
- Ramírez-Mora, E., 2005. Efecto de la concentración de azúcar y del tipo de manzana sobre la calidad de sidra tipo Champaña. Tesis de maestría en Ciencia y Tecnología de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Querétaro, México.
- Ramsey, C. N. and P. A. Upton. 1989. Hepatitis A and frozen raspberries. *Lancet*. 1:43.
- Rangel, D. M. 2009. Incidencia y fuentes de contaminación de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y bacterias indicadoras en zanahoria a lo largo del cultivo, acondicionamiento y empaque en dos empresas productoras. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro. México.
- Ruiz, A. M. 2007. Fuentes y mecanismos de contaminación de *Salmonella* hacia frutas y hortalizas durante su cultivo y cosecha. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro. México.
- Ryser, E. T. y E. H. Marth. 1991. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. New York, Estados Unidos. Marcel Dekker. p 632.
- Saenz, F. y M. Laclette. 1999. Enciclopedia de los municipios de México, Querétaro. Centro Nacional de Desarrollo Municipal. Gobierno del Estado de Querétaro.
- SAGARPA, 2011. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera (SIAP), <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>. Fecha de consulta: marzo de 2011.
- SAGARPA, 2012. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera (SIAP), http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351 Fecha de consulta: agosto de 2012.
- Sánchez, V. S.E. 2004. Antagonismo de Levaduras nativas de manzana producida en la sierra de Querétaro contra *Penicillium expansum* Link. Tesis de

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. p. 116.

- Sapers, G. M., R. L. Miller and A. M. Mattrazzo. 1999. Effectiveness of sanitizing agents in inactivating *Escherichia coli* in golden delicious apples. *J. Food Saf.* 64: 734-737.
- Sapers, G. M., R. L. Miller, M. Jantschke, M. and A. M. Mattrazzo. 2000. Factors limiting the efficacy of hydrogen peroxide washes for decontamination of apples containing *Escherichia coli*. *J. Food Sci.* 65:529-532.
- Sapers, G. M., 2001. Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. *Food Technol. Biotechnol.* 39(4): 305-311.
- Sapers, G. M., R. L. Miller, B. A. Annous and A. M. Burke. 2002. Improved antimicrobial wash treatments for decontamination of apples. *J. Food Sci.* 67(5):1886-1891.
- Sapers, G. M. 2003. Washing and sanitizing raw materials for minimally processed fruit and vegetable products. In *Microbial safety of minimally processed foods*. Novak, J.S. Ed. CRS Press. 221-253.
- Seymour, G. B. and K. C. Gross. 1996. Cell wall disassembly and fruit softening. *Postharvest News and Information* 7: 45N-52N.
- Sharma, M. 2000. Survival in *Salmonella* in orange juice fortified with calcium. MS thesis. University of Georgia.
- Singh, B.R., S. B. Kulshereshta and K. N. Kapoor. 1995. An orange juice borne diarrhoeal outbreak due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food Sci. Tech.* 32:504-6.
- SSA. 2009. Paratifoidea y otras salmonelosis. *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica*. ISSN 1405-2636. 40(26):1-3.
- Steele, B.T., N. Murphy, G. S. Arbus and C. P. Rance. 1982. An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice. *J. Pediatrics* 101: 963-965
- Stuttgart. 1991. Souci-Fachmann-Kraut. WVG. Garchingbei Munchen. Internet Symposium on Food Allergens 2 (Suppl. 4) 1- 23 (2000). [http://www.food-allergens.de/symposium-vol1\(3\)/data/apple/apple-composition.htm](http://www.food-allergens.de/symposium-vol1(3)/data/apple/apple-composition.htm).
Fecha de consulta: 05 de mayo de 2011.

- Tamblyn, S., J. de Grosbois, D. Taylor and J. Stratton. 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with unpasteurized non-commercial, custom-pressed apple cider – Ontario, 1998. *Canada Communicable Disease Report*, 25: 113-120.
- Tauxe, R. V. 1997. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerging Infectious Diseases* 3:425–434.
- Teixidó, N., J. Usall, N. Magan and I. Viñas. 1999. Microbial population dynamics on ‘Golden Delicious’ apples from bud to harvest and effects of fungicide applications. *An. Applied Biology*. 134:109–116.
- Ukuku, D. and G. Sapers. 2001. Effect of sanitizer treatments on *Salmonella* Stanley attached to the surface of cantaloupe and cell transfer to fresh-cut tissues during cutting practices. *J Food Prot.* 64:1286-1291.
- Ukuku, D., H. Zhang and L. Huang. 2009. Growth parameters of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and aerobic mesophilic bacteria of apple cider amended with Nisin-EDTA. *Foodborne Path. and Disease*. 6(4):487 – 494.
- Usall, J., N. Teixidó, R. Torres, E. J. Ochoa de and I. Viñas. 2001. Pilot Test of *Candida sake* (CPA-1) Applications to Control Postharvest Blue Mold on Apple Fruit. *Postharvest Biol. Technol.* (21):147–156.
- Vigeant, M. A. and R. M. Ford. 1997. Interactions between motile *Escherichia coli* and glass in media with various ionic strengths, as observed with a three-dimensional-tracking microscope. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3474-3479.
- Walker, S. P., A. Demirci, R. E. Graves, S. B. Spencer and R. F. Roberts. 2005. Cleaning milking systems using electrolyzed oxidizing water. *Am. Soc. Agricultural Eng.*, 48(5):1827–1833.
- Wang, G., T. M. Zhao and M. P. Doyle. 1996. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: (25) 67-70.
- Waters, C. M. and B. L. Bassler. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 21:319-346.
- Wells, S. J., P. J. Fedorka-Cray and E. A. Dargatz. 2001. Fecal shedding of *Salmonella* spp. by dairy cows on farm and at cull cow markets. *J. Food Prot.* 64:3-11.
- Westwood, N. M. 1993. *Temperate – Zone Pomology*. 3rd. Ed. Timber Press. Philippines, Singapour. 65–425.

- Zavala, I. 2005. Efecto del raleo y el acolchado sobre la calidad de manzanas 'Red delicious' y 'Golden delicious' producidas en la Sierra de Querétaro. Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México. p. 109.
- Zhao, T., M. P. Doyle and R. E. Besser. 1993. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2526–2530.

ANEXO A

Titulación del cloro disponible

1. Adicionar 10 mL de la muestra a valorar en un matraz Erlenmeyer.
2. Agregar 4 mL de yoduro de potasio (10% p/v) y 2 mL 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 canario pálido.
4. Adicionar 0.4 mL de una solución de almidón al 0.5% y mezclar completamente.
5. Titular con una solución valorada de tiosulfato de sodio 0.01 N hasta la desaparición del color azul y permanezca traslúcida la sustancia.
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:

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

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

N_1 : Normalidad del tiosulfato de sodio.

m : cantidad de muestra.

(Greenberg *et al.*, 1992)

ANEXO B

Titulación del ácido peracético

1. Adicionar 10 mL de la muestra a valorar en un matraz Erlenmeyer.
2. Agregar 4 mL de ácido sulfúrico 1 N, agitar para homogeneizar.
3. Titular con una solución valorada de permanganato de potasio 0.1 N hasta la aparición de un color rosa pálido que cambia inmediatamente a marrón permanente.
4. Adicionar 1 mL de yoduro de potasio (10% p/v) y 0.4 mL de una solución de almidón al 0.5%. Mezclar hasta observar una coloración uniforme.
5. Titular con una solución valorada de tiosulfato de sodio 0.01 N hasta la desaparición del color azul y permanezca traslúcida la sustancia.
6. Registrar el volumen total de tiosulfato de sodio 0.01 N utilizado para la valoración.
7. Determinar la concentración de ácido peracético en la muestra mediante la siguiente ecuación:

$$\% = \frac{V_1 \times N_1 \times m_{eq} \text{AcPA} \times 100}{m}$$

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

N_1 : Normalidad del tiosulfato de sodio

$m_{eq} \text{AcPA}$: PM Acido peracético/No. \bar{e} cargados en la reacción redox= 0.038

m : cantidad de muestra

(Greenspan, F., 1948; Ojeda, C.P., 2009; Ferreira, M. A., 2009)