

Informe Final



Búsqueda e innovación de nuevas alternativas de mejoramiento de la inocuidad en la industria del mango

Presentada por:

Dra. Nohelia Castro del Campo
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Culiacán
Carretera a Eldorado km 5.5. Campo El Diez. C.P. 80110.
Culiacán, Sinaloa, México.
ncastro@ciad.mx
(52) 667 760 55 36

Presentado a:

Leonardo Ortega
National Mango Board



Culiacán, Sinaloa a 22 de julio de 2015

I. Índice

II. Introducción

III. Objetivos

IV. Materiales y Métodos

IV.1 Selección y Desinfección de Frutos

IV.2 Desinfectantes Químicos

IV.3 Preparación de la Turbidez

IV.4 Preparación del Inóculo de las Cepas Bacterianas en Estudio

IV.5 Inoculación de Frutos de Mango

IV.6 Determinación de la eficiencia de desinfectantes de cada paso de lavado en la remoción de microorganismos de la superficie de frutos de mango (Objetivo 1)

1. Tanques de lavado
2. Espreas
3. Hidroenfriado

IV.7 Tasas de transferencia de *Salmonella Choleraesuis* y de *Listeria monocytogenes* (Objetivo 2)

IV.8 Ensayo de la evaluación del desinfectante cobre en simulador de hidrotérmico, a distintas calidades de agua (Objetivo 3)

IV.8.1 Evaluación *in vitro* de la constante de muerte (K) del microorganismo *E. coli* utilizando cobre en condiciones ajustadas.

IV.9 Análisis Estadístico

IV.9.1 Objetivo 1. Determinar la efectividad de los desinfectantes para reducir *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* en cada paso de lavado de mango

IV.9.1.1 Efectividad de los desinfectantes en la reducción de *Salmonella* y *Listeria* durante el lavado de mango fue analizada por la prueba de Tukey para la diferencia de medias.

IV.9.1.2 Efectividad de los desinfectantes en la reducción de *Salmonella* y *Listeria* durante el hidroenfriado de mango.

IV.9.2 Objetivo 2. Tasas de transferencia

IV.9.3 Objetivo 3. Efectividad de cobre en el tratamiento hidrotérmico.

V. Resultados

V.1 Objetivo 1. Resultados de los ensayos de la determinación de la eficiencia de los desinfectantes para reducir *Salmonella enterica* ser. *Choleraesuis* y *Listeria monocytogenes* en los pasos de lavado.

Tinas

Espreas

Hidroenfriado

V.2 Objetivo 2. Transferencia de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* del fruto al agua y del agua al fruto

V.3 Objetivo 3. Resultados del ensayo de la evaluación del desinfectante cobre en simulador de hidrotérmico, a distintas calidades de agua.

V.4 Objetivo 4. Resultados de la determinación del desinfectante más efectivo para el control de *Salmonella enterica* ser. Choleraesuis y *Listeria monocytogenes* durante los pasos de lavado en el empaque de mango.

VI. Conclusiones

VII. Bibliografía

Anexo I. Visitas a empaque y huerto de mango

Anexo II. Actividades de laboratorio

Anexo III. Caracterización de suelo de huerto de mango

II. Introducción

La producción en ascenso y la comercialización de frutas y hortalizas contaminadas ha traído consigo un incremento inusual de riesgo de adquisición de enfermedades. La contaminación cruzada ha representado una vía para bacterias, parásitos y virus para encontrar el acceso a frutas y vegetales (Beuchat, 1996). En los Estados Unidos de América (EUA) varios brotes de enfermedades gastrointestinales han sido reportados en años recientes, los cuales han sido asociados al consumo de productos frescos contaminados. Estudios previos, así como recientes que han usado el rastreo de la fuente microbiana indican que la contaminación de los productos frescos se lleva a cabo en el campo y/o durante el empaclado, especialmente cuando las Buenas Prácticas Agrícolas y de Manufactura no son estrictamente seguidas (CDC 2001; CDC 2002; CDC 2003; CDC 2005; CDC 2008). Brotes infecciosos de *Salmonella*, asociados con el consumo de mangos frescos se han reportado; en 1999, mangos provenientes de Brasil ocasionaron un brote por *Salmonella enterica* Newport en EUA, reportándose 78 pacientes infectados de 13 estados con la cepa del brote, 15 de estos fueron hospitalizados y 2 murieron (Sivapalasingan et al. 2003); *Salmonella enterica* serotipo Saintpaul fue la responsable de un brote ocurrido en EUA en 2001, ocasionado por el consumo de mangos provenientes de Perú contaminados con la cepa (Beatty et al. 2004); en 2012, mangos provenientes de México contaminados con *Salmonella* Braenderup ocasionó un brote que involucró un total de 127 personas infectadas en 15 estados de los EUA (CDC, 2012). El propósito del presente trabajo de investigación es evaluar la eficacia de cloro, dióxido de cloro y los iones de cobre, aplicados en el agua lavado, tratamiento hidrotérmico e hidrogenado, en la reducción de *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* así como las tasas de transferencia bacteriana del agua al fruto y viceversa. Para ello, se realizaron ensayos a nivel laboratorio que simulaban las condiciones reales de los procesos ocurridos durante el empaclado de mango. Los resultados muestran información relevante que puede contribuir con alternativas de desinfección para la mejora de los procesos practicados en la actualidad en materia de inocuidad en la industria del mango.

III. Objetivos

a. Objetivo general

Desarrollar mejores prácticas de inocuidad en la industria del mango con relación al uso del agua en las empacadoras, a fin de garantizar la inocuidad de los frutos asegurando consigo un impacto positivo en la salud del consumidor y en la comercialización del producto.

b. Objetivos específicos

- i. Determinar la efectividad en cada paso de lavado del mango para reducir *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* en la superficie del fruto.
- ii. Determinar las tasas de transferencia de *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* de los tanques de agua al mango y viceversa.
- iii. Determinar la efectividad de los desinfectantes químicos cloro y cobre contra *Escherichia coli* cuando se utilizan en el tratamiento hidrotérmico.

- iv. Determinar que desinfectantes son más efectivos en controlar y asegurar la calidad microbiana del agua de lavado para controlar, reducir o eliminar la contaminación cruzada con *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes*.

IV. Materiales y Métodos

IV.1 Selección y Desinfección de Frutos

La variedad de mango evaluada en este estudio fue Tommy Atkins con madurez fisiológica, sin daño mecánico y peso uniforme. Los frutos fueron proveídos por un productor de mangos de la región y llevados al Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria de CIAD Unidad Culiacán para realizar los ensayos.

Los mangos se desinfectaron utilizando una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) a una concentración de 200 mg L⁻¹ de cloro libre; para eliminar el cloro residual, los frutos se lavaron con tiosulfato de sodio al 1% y después se enjuagaron con agua purificada estéril. En cada uno de estos 3 pasos los frutos se frotaron por 1 min. Finalmente, los frutos se dejaron secar sobre una parrilla estéril por 60 minutos en una campana de flujo laminar.

IV.2 Desinfectantes Químicos

Los desinfectantes a ser evaluados en este estudio fueron hipoclorito de sodio (Clorallex^{MR}) y dióxido de cloro (TwinOxide[®]), cuyas concentraciones y modo de preparación se describen a continuación.

Hipoclorito de sodio

Este desinfectante tiene un campo de acción que incluye bacterias, virus, algas, hongos. Su composición es hipoclorito de sodio al 5.25 % de cloro libre y se mantiene estable en un rango de pH de 6.5-7.5. Las concentraciones de Clorallex^{MR} utilizadas en este estudio fueron 100 y 200 ppm. Para alcanzar estas concentraciones se procedió a preparar las soluciones deseadas por separado tomando 1.90 y 3.80 mL del concentrado del desinfectante y depositándolos en recipientes conteniendo 1,000 mL de agua purificada estéril. Para la determinación de la concentración de cloro libre presente en cada una de las preparaciones se utilizó un espectrofotómetro marca HACH modelo DR 3900, reactivo de DPD para cloro total marca HACH, realizándose de la siguiente manera:

1. El espectrofotómetro se encendió y se eligió el programa 83 (rango de lectura de 0.2 a 3 mgL⁻¹).
2. Para corroborar la concentración final se procedió a tomar una alícuota de 1 mL de la solución y se aforó a 100 mL con agua destilada, de esta dilución se tomaron 10 mL en una celda.
3. La celda se colocó en el aparato para determinar la lectura cero y se retiró del aparato.
4. En otra celda se colocaron 10 mL de la misma dilución y se le agregó un sobre de DPD (N, N-Dietil-p-fenilen-diamina) con reactivos para determinación de cloro total.
5. La celda se tapó con parafilm para disolverla y se dejó reposar por 1 min.

6. Inmediatamente después de transcurrir el minuto de reposo, la celda se introdujo en el equipo para realizar la medición de la muestra.
7. El resultado se expresa en mg de cloro libre por litro de muestra (mgL^{-1}) (APHA, 1998).

Dióxido de cloro

Este desinfectante posee un campo de acción que incluye bacterias, virus, algas, hongos. La composición de este consta de dióxido de cloro a 3,000 ppm y se mantiene estable en un rango de pH 3-9. El dióxido de cloro (TwinOxide[®]) fue preparado siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, en un matraz color ámbar conteniendo 1 L de agua destilada se agregó el reactivo A, el cual contiene clorito de sodio. Acto seguido, el reactivo B, compuesto de bisulfato de sodio, fue vertido en este matraz. Esta solución compuesta se dejó reposar por 3 h, la cual teóricamente se encuentra en una concentración final de 3,000 ppm de dióxido de cloro. Las concentraciones de este desinfectante utilizadas en este estudio fueron 3 y 5 ppm, por lo que fueron ajustadas mediante la fórmula (1)

$$V_1C_1 = V_2C_2 \quad (1)$$

Para la determinación de la concentración de dióxido de cloro presente en cada una de las muestras se utilizó un espectrofotómetro marca HACH modelo DR 3900, reactivo de DPD cloro libre marca HACH, realizándose de la siguiente manera.

1. El espectrofotómetro fue encendido y se escogió el programa 76 para dióxido de cloro (0 a 5.00 mg L^{-1}).
2. De la solución preparada de dióxido de cloro a la concentración deseada, se tomaron 10 mL y se agregaron en una celda de 10 mL.
3. La celda fue colocada en el aparato para determinar la lectura cero y posteriormente la celda fue retirada del aparato.
4. En otra celda se colocaron 10 mL de esta misma solución y se le agregaron 4 gotas del reactivo de glicina
5. La celda se tapó con parafilm para ser mezclada y posteriormente se le agregó un sobre de DPD (N, N-Dietil-p-fenilen-diamina) con reactivos para determinación de cloro libre.
6. Esta mezcla se agitó y se observó un color rosa. Posteriormente se dejó reposar 1 minuto.
7. Finalmente, transcurrido el minuto de reposo, la celda fue inmediatamente introducida en el equipo para realizar la medición de la muestra.

El resultado se expresó en mg de dióxido de cloro por litro de muestra (mgL^{-1}) (APHA, 1998).

IV.3 Preparación de la Turbidez

La turbidez del agua en los experimentos durante el tratamiento de hidrogenofriado de este estudio fue ajustada a 2 y 50 UNT con un turbidímetro marca Hach 2100 P. Para ello, suelo proveniente de huertos de mango de Escuinapa, Sinaloa, previamente caracterizado fisicoquímicamente (Anexo 3) y esterilizado fue utilizado para estos fines.

IV.4 Preparación del Inóculo de las Cepas Bacterianas en Estudio

Las cepas *Salmonella enterica* ser. Choleraesuis ATCC 10708, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por el cepario del Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Culiacán, y utilizadas en los distintos procesos de hidrotratamiento. La cepa de *Salmonella* Choleraesuis fue utilizada en estos ensayos debido a que es una cepa descrita para su uso en la evaluación de ensayos de agentes antimicrobianos y desinfectantes.

La preparación del inóculo bacteriano se llevó a cabo tomando una colonia de cada cepa almacenada en ultracongelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada colonia se sembró por separado en Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD) (Bioxon, Estado de México, México), CHROMagar ECC y Agar Palcam (Fluka, Suiza) para *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Listeria*, respectivamente. Las cajas se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 y $48\text{ h} \pm 2$ h, respectivamente. Después de este tiempo de incubación se seleccionó una colonia característica para cada género bacteriano y se sembró en Caldo de Soya Trypticaseína (TSB) (Difco, México), para *Salmonella* y *E. coli*, y en TSB-YE (Caldo de Soya Trypticaseína y extracto de levadura al 0.6%) (Becton Dickinson Sparks MD, USA), para *Listeria*, incubándose a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 ± 2 h. Después, los caldos de cultivo de ambas bacterias se centrifugaron a $13,800\text{ g}$ por 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante fue descartado y el pellet celular fue lavado en dos ocasiones usando solución amortiguadora de fosfatos (solución de fosfato de potasio monobásico, pH 7.2) para minimizar los constituyentes no celulares asociados a la solución (APHA, 2001).

La concentración de la suspensión bacteriana se determinó por la técnica de extensión en placa. Para ello, los pellets bacterianos fueron resuspendidos en buffer de fosfatos de los cuales se realizaron diluciones decimales (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7}). Posteriormente, se tomó 0.1 mL de la dilución 10^{-5} y 10^{-7} y se extendieron sobre Agar XLD, CHROMagar ECC y Agar PALCAM. Las cajas petri se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $24 \pm 2\text{ h}$ y $48 \pm 2\text{ h}$ para permitir la cuantificación de *Salmonella* Choleraesuis, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, respectivamente. La concentración del inóculo bacteriano utilizado fue de $7.0\text{ Log}_{10}\text{ UFC mL}^{-1}$ (APHA, 2001).

IV.5 Inoculación de Frutos de Mango

La inoculación de los frutos de mango se realizó de acuerdo al método descrito por Ukuku y Sapers (2001) con algunas modificaciones. Los mangos fueron colocados en una tina que contenía 4 L de la suspensión de bacteriana ($7\text{ Log}_{10}\text{ UFCmL}^{-1}$ de *Salmonella* Choleraesuis, *Escherichia coli* o *Listeria monocytogenes*), la cual se encontraba con agitación constante, dejándose por un tiempo de contacto de 60 min para posteriormente ser sustraídos y colocados en una cabina de flujo laminar para permitir su secado.

Para determinar el inóculo bacteriano adherido a la superficie del mango, tres mangos inoculados fueron seleccionados al azar y colocados de manera independiente en bolsas de cierre hermético conteniendo agua destilada estéril en una proporción 1:1 peso/volumen; se agitaron de forma manual durante un minuto y se tomó una alícuota de $0.1\text{ }\mu\text{L}$, la cual se sembró de manera directa sobre el agar, y 1 mL a partir del cual se realizaron diluciones, sembrándose por duplicado en extensión en placa en agar XLD para *Salmonella*, CHROMagar para *E. coli* o Agar Palcam para *Listeria*, incubándose a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 y

48 h, respectivamente. Una vez transcurrido el tiempo se cuantificaron las UFC mL⁻¹ para determinar el inóculo adherido a la superficie del fruto, lo cual se expresó como UFC Log₁₀.

A continuación, se describe el procedimiento experimental llevado a cabo para realizar las mediciones de las variables de respuesta relacionadas con cada uno de los objetivos planteados en esta investigación:

IV.6 Determinación de la eficiencia de desinfectantes de cada paso de lavado en la remoción de microorganismos de la superficie de frutos de mango (Objetivo 1)

El paso de lavado del mango en la recepción del mismo a la llegada del empaque se considerará en dos modalidades: 1) Lavado en tanques, 2) Lavado con espreas y 3) Hidroenfriado

1. Tanques de lavado

En tanque de lavado (recepción e hidroenfriado) de una capacidad de 80 L de agua se ajustaron concentraciones de hipoclorito de sodio de 100 y 200 ppm y turbideces de 2 y 50 UNT y una temperatura de 25 °C. Una vez estandarizadas estas condiciones un batch de mangos, inoculado previamente con una solución bacteriana (*Salmonella enterica* ser. Choleraesuis y *Listeria monocytogenes*) a una concentración de 8 log₁₀ UFC, fue introducido en la tanque de lavado y expuesto a un tiempo de contacto de 1 minuto. Transcurrido el tiempo de contacto una muestra representativa de mangos fue extraída de los tanques para el análisis microbiológico y fueron colocados en una bolsa de cierre hermético conteniendo agua destilada estéril en una relación 1:1 peso/volumen y 0.5 mL de tiosulfato de sodio (3 %) y se agitaron manualmente durante 1 minuto y se determinó la concentración bacteriana resultante después del tratamiento desinfectante. El análisis de estos datos arrojó la eficiencia del desinfectante aplicado. En el caso del desinfectante dióxido de cloro, el procedimiento fue el mismo que el anterior citado, sin embargo, las concentraciones a utilizar fueron 3 y 5 ppm. El experimento fue realizado por triplicado.

2. Espreas

Un batch de mangos, previamente inoculados con una solución bacteriana (*Salmonella enterica* ser. Choleraesuis y *Listeria monocytogenes*) a una concentración de 8 log₁₀, fueron colocados en un rotador mecánico (ATR, RKVSD) a una velocidad de 60 rpm, y estos fueron asperjados desde una distancia de 30 cm (Chaidez et al 2007) con cada solución desinfectante (hipoclorito de sodio 100 y 200 ppm, dióxido de cloro 3 y 5 ppm) por 20 s a 25 °C. Para parar la acción del desinfectante y cuantificar la concentración bacteriana en cada mango, estos fueron colocados en una bolsa de cierre hermético conteniendo agua destilada estéril en una relación 1:1 peso/volumen y 0.5 mL de tiosulfato de sodio (3 %) y se agitaron manualmente durante 1 minuto. Después, se tomó una alícuota de la bolsa para realizar la enumeración bacteriana como se describe en el apartado de preparación del inóculo (APHA, 2001). Ambos desinfectantes fueron preparados a una turbidez de 2 UNT. El experimento fue realizado por triplicado.

3. Hidroenfriado

Para fines de análisis, este objetivo fue dividido en dos (Cinética de inactivación y Efecto de los factores), los tratamientos consistieron de combinaciones de niveles de los factores: tipo de desinfectante, turbidez y tiempo de contacto, los cuales se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Definición de tratamientos para el hidrogenfriado				
Desinfectante y Dosis¹	Tiempo de Contacto (min)			
	0	1	5	10
	2 UNT²	50 UNT	2 UNT	50 UNT
NaClO 100	xxx	xxx	xxx	xxx
NaClO 200	xxx	xxx	xxx	xxx
ClO₂ 3	xxx	xxx	xxx	xxx
ClO₂ 5	xxx	xxx	xxx	xxx

Desinfectante; NaClO: hipoclorito de sodio; ClO₂: dióxido de cloro y X: réplica.

¹ppm

²Unidades Nefelométricas de Turbidez

La aplicación de los tratamientos arriba descritos se llevó a cabo de la manera siguiente: Los mangos, inoculados previamente con una solución bacteriana a una concentración conocida de *Salmonella Choleraesuis* o *Listeria monocytogenes*, fueron sumergidos en un recipiente que contenía 1L de agua destilada estéril, un tipo de desinfectante (dióxido de cloro 3 o 5 ppm, hipoclorito de sodio 100 o 200 ppm) y suelo estéril suficiente para generar una turbidez (2 o 50 UNT), por un determinado tiempo de contacto (0, 1, 5 o 10 min). Transcurrido el ensayo, cada mango fue colocado en agua destilada estéril con 0.5 mL de solución neutralizante y se procedió a realizar la determinación de la concentración bacteriana restante sobre la superficie del fruto, de acuerdo con el apartado de *Inoculación de frutos de mango*. La variable de respuesta registrada fue la supervivencia bacteriana expresada como

$$\text{Log}_{10} \left(\frac{N_t}{N_0} \right).$$

IV.7 Tasas de transferencia de *Salmonella Choleraesuis* y de *Listeria monocytogenes* (Objetivo 2)

Para la determinación de la transferencia bacteriana del fruto al agua se tomaron mangos inoculados previamente con una concentración de 7 Log₁₀ de *Salmonella Choleraesuis* o *Listeria monocytogenes*, tal como se describe en el apartado de *Inoculación de Frutos de mango*. Tres de estos mangos fueron utilizados para cuantificar la bacteria y determinar el inóculo inicial adherido a la superficie del mango, tal como se describe en el apartado *Inoculación de Frutos de mango*. Los mangos restantes fueron colocados en una tina de acero inoxidable con 12 L de agua destilada estéril, agitándose durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se sacaron 3 mangos al azar, para determinar la concentración bacteriana restante sobre la superficie de cada fruto. Para ello, cada mango se colocó de manera independiente en bolsas de cierre hermético conteniendo agua destilada estéril en una proporción 1:1 peso/volumen; se

agitaron de forma manual durante un minuto y se tomó una alícuota de 0.1 µL, la cual se colocó directamente en agar, y otra alícuota de 1 mL a partir del cual se realizaron 3 diluciones hasta llevar a una concentración de 10⁻³. Luego, las diluciones 10⁻¹ y 10⁻³ se sembraron por duplicado por extensión en placa en agar XLD para *Salmonella* o Agar Palcam para *Listeria*, incubándose a 37 °C por 24 y 48 h, respectivamente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se cuantificaron las UFC mL⁻¹ promediando el resultado de las 2 cajas sembradas para determinar, por diferencia, la concentración bacteriana transferida (CBT) del fruto al agua. La CBT se calculó mediante la fórmula siguiente (Fórmula 2):

$$CBT = \frac{\text{Promedio de UFC (en las 2 cajas)}}{(\text{Dilución de lectura})(\text{Volumen sembrado})} \quad (2)$$

Finalmente, el resultado se transformó a unidades logarítmicas, expresándose como Log₁₀(UFC).

Para determinar la tasa de transferencia (TT) se utilizó la siguiente operación matemática (Fórmula 3):

$$TT = \frac{\text{Log}_{10}(\text{receptor})}{\text{Log}_{10}(\text{donador})} \times 100 \quad (3)$$

Dónde:

“Log₁₀ (receptor)” es UFC Log₁₀ restante en el mango después de haber estado en el agua 30 min y “Log₁₀ (donador)” es UFC Log₁₀ inicial de los mangos control inoculados.

Para la determinación de la tasa de transferencia bacteriana del agua al fruto, primero se agregaron 11 L de agua destilada estéril y 1L de inóculo de *Salmonella Choleraesuis* o *Listeria monocytogenes* en una tina de acero inoxidable. Posteriormente, se procedió a determinar la concentración bacteriana de esta solución mediante diluciones impares (de 10⁻¹ a 10⁻⁷), las cuales se sembraron en cajas Petri por extensión en placa en agar XLD o Agar Palcam para *Salmonella* y *Listeria*, respectivamente. Las cajas con XLD se incubaron a 37 °C por 24 y las cajas con Agar Palcam por 48 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las colonias se cuantificaron para determinar la concentración final del inóculo en la solución, la cual se expresó como UFC Log₁₀.

Una vez determinado el inóculo bacteriano del agua, los frutos desinfectados, enumerados y pesados de manera independiente, se colocaron en la tina durante un tiempo de 30 min. Transcurrido este tiempo de contacto, se sacaron mangos al azar y se colocaron de manera separada en bolsas de cierre hermético que contenían agua destilada estéril en una relación 1:1 peso/volumen, y se agitaron de forma manual durante un minuto. Posteriormente, se realizaron diluciones como se describió anteriormente y se sembró por extensión en placa en agar XLD para *Salmonella* y Palcam para *Listeria*. Las placas Petri se incubaron a 37 °C por 24 h para *Salmonella* y 48 h para *Listeria*.

Transcurrido este tiempo se contaron las colonias crecidas, y se realizaron los cálculos de Log₁₀, siguiendo las operaciones de la fórmula (3) para determinar la tasa de transferencia bacteriana del agua al fruto.

IV.8 Ensayo de la evaluación del desinfectante cobre en simulador de hidrotérmico, a distintas calidades de agua (Objetivo 3)

En un termobañó con agitador marca Thermo Scientific Modelo 2872 con capacidad de 26.5 litros, se acondicionó con agua purificada estéril, ajustando la turbidez a 2 UNT o 50 UNT, a una temperatura de 46.1 °C, se agregó la dosis de desinfectante cobre (8.5, 12 o 17 ppm). Se simularon casos extremos de contaminación con la adición del microorganismo *E. coli* a una concentración 10^6 UFC mL⁻¹ y se colocaron los mangos dentro de la tina. Posteriormente, se monitoreó el desinfectante por 90 minutos. Las muestras fueron tomadas a distintos tiempos (45 y 90 minutos), donde alícuotas de 0.1 mL (concentración directa) fueron sustraídas de las cuales se realizaron diluciones y se sembraron de manera directa en CHROMOagar ECC por método de extensión en placa. Posteriormente, las cajas se incubaron a 37°C por 24 ± 2 h y se determinó la concentración bacteriana resultante después del tratamiento con el desinfectante. El experimento fue realizado por duplicado. Al término de la evaluación se tomaron muestras de mango hidrotratado y agua para realizar análisis de residualidad del desinfectante.

IV.8.1 Evaluación *in vitro* de la constante de muerte (K) del microorganismo *E. coli* utilizando cobre en condiciones ajustadas.

Las siguientes concentraciones mínimas efectivas del desinfectante cobre en forma iónica a dos calidades de agua fueron seleccionadas: 8.5 ppm a 2 UNT y 12.5 ppm a 50 UNT. La evaluación se realizó de la siguiente manera. En un termobañó con agitador marca Thermo Scientific con capacidad de 26.5 litros, se adicionó 20 litros de agua estéril, ajustando su turbidez a 2 UNT o 50 UNT según lo requiriera el ensayo, se simularon casos extremos de contaminación agregando el microorganismo *E. coli* en una concentración de 10^6 UFC mL⁻¹, se aplicó agitación y mantuvo la temperatura a 46.1 °C, se adicionó la dosis del desinfectante que se estaba evaluando. Una vez ajustadas las condiciones, se tomó muestras de agua cada 5 minutos por un lapso de 90 minutos, se tomaron alícuotas de 0.1 mL (concentración directa), y se realizaron diluciones y se sembraron de manera directa en CHROMOagar ECC por método de extensión en placa (APHA, 2001). Posteriormente, las cajas se incubaron a 37°C por 24 ± 2 h y se determinó la concentración bacteriana resultante después del tratamiento con el desinfectante. Se observó la sobrevivencia del microorganismo *E. coli* realizando curvas de decaimiento microbiano obteniendo los valores de K.

IV.9 Análisis Estadístico

IV.9.1 Objetivo 1. Determinar la efectividad de los desinfectantes para reducir *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* en cada paso de lavado de mango

IV.9.1.1 Efectividad de los desinfectantes en la reducción de *Salmonella* y *Listeria* durante el lavado de mango fue analizada por la prueba de Tukey para la diferencia de medias.

IV.9.1.2 Efectividad de los desinfectantes en la reducción de *Salmonella* y *Listeria* durante el hidrogenfriado de mango

Para el caso de las cinéticas de inactivación para NaClO y ClO₂ a 2 UNT, estas fueron estimadas mediante el modelo de Weibull para curvas de supervivencia usando regresión no lineal, con el paquete estadístico MINITAB. $\text{Log}_{10}\left(\frac{N_t}{N_0}\right)$ fue la variable dependiente y t la variable independiente.

Para el caso de los efectos de los factores: tipo de desinfectante, turbidez y tiempo de contacto se procedió a determinar un ANOVA para un diseño de tres factores totalmente al azar, con tres réplicas por tratamiento. La variable de respuesta fue la supervivencia bacteriana expresada como $\text{Log}_{10}\left(\frac{N_t}{N_0}\right)$

. Las diferencias de medias en los tratamientos que resultaron significativos ($P < 0.05$) se realizaron mediante la prueba de Tukey.

IV.9.2 Objetivo 2. Tasas de transferencia

Las tasas de transferencia se estimaron mediante técnicas de estadística descriptiva a partir de tres réplicas.

IV.9.3 Objetivo 3. Efectividad de cobre en el tratamiento hidrotérmico.

Para obtener los valores de (K) se utilizó una estimación estadística de regresión lineal, en donde la pendiente de las curvas de sobrevivencia representaba los valores de la constante cinética (K). Se realizaron 2 réplicas del experimento. Una vez obtenido los valores de (K) se utilizó el modelo cinético de Chick, el cual es el siguiente:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -kN(t)$$

Donde:

N(t) es el número de células al tiempo t, y k es la constante de velocidad de inactivación.

V. Resultados

Esta sección muestra los resultados de esta investigación por objetivos.

V.1 Objetivo 1. Resultados de los ensayos de la determinación de la eficiencia de los desinfectantes para reducir *Salmonella enterica* ser. Choleraesuis y *Listeria monocytogenes* en los pasos de lavado.

Tinas

El cuadro 2 muestra el análisis de varianza de los resultados de la eficiencia de reducción bacteriana del hipoclorito de sodio y el dióxido de cloro a diferentes condiciones en los ensayos en tina de lavado. Los factores Turbidez, Tiempo y la interacción Desinfectante*Tiempo de contacto fueron estadísticamente significativos con un valor de $P < 0.05$.

Cuadro 2. Análisis de Varianza de los factores desinfectante, turbidez y tiempo de contacto en la reducción de *Salmonella Choleraeausis* sobre la superficie de mango en tinas de lavado.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Desinfectante	3	0.3284	0.10946	0.64	0.594
Turbidez	1	1.2675	1.26750	7.42	0.010
Tiempo	1	8.0688	8.06880	47.21	0.000
Desinfectante*Turbidez	3	1.3281	0.44268	2.59	0.068
Desinfectante*Tiempo	3	2.5635	0.85448	5.00	0.005
Turbidez*Tiempo	1	0.0008	0.00083	0.00	0.945
Error	35	5.9816	0.17090		
Falta de ajuste	3	0.5990	0.19965	1.19	0.330
Error puro	32	5.3826	0.16821		
Total	47	19.5386			

A partir de los valores P obtenidos del análisis de varianza, se procedió a analizar las interacciones de los factores que resultaron estadísticamente significativas, ya que es la conjunción de estos la de mayor impacto en la efectividad de cualquier desinfectante durante el proceso. La figura 1 nos muestra la tendencia de la interacción Desinfectante*Tiempo, la cual fue significativa, sobre la reducción de *Salmonella* en los distintos tratamientos; en ella se puede observar que el mayor tratamiento lo representó el dióxido de cloro a 5 ppm registrando una reducción de 1.50 log₁₀, mientras que el tratamiento con una reducción menor fue el hipoclorito de sodio con un 0.21 log₁₀. El hipoclorito de sodio a 200 ppm y el dióxido de cloro a 3 ppm obtuvieron reducciones similares, con un 0.83 y 0.75, respectivamente.

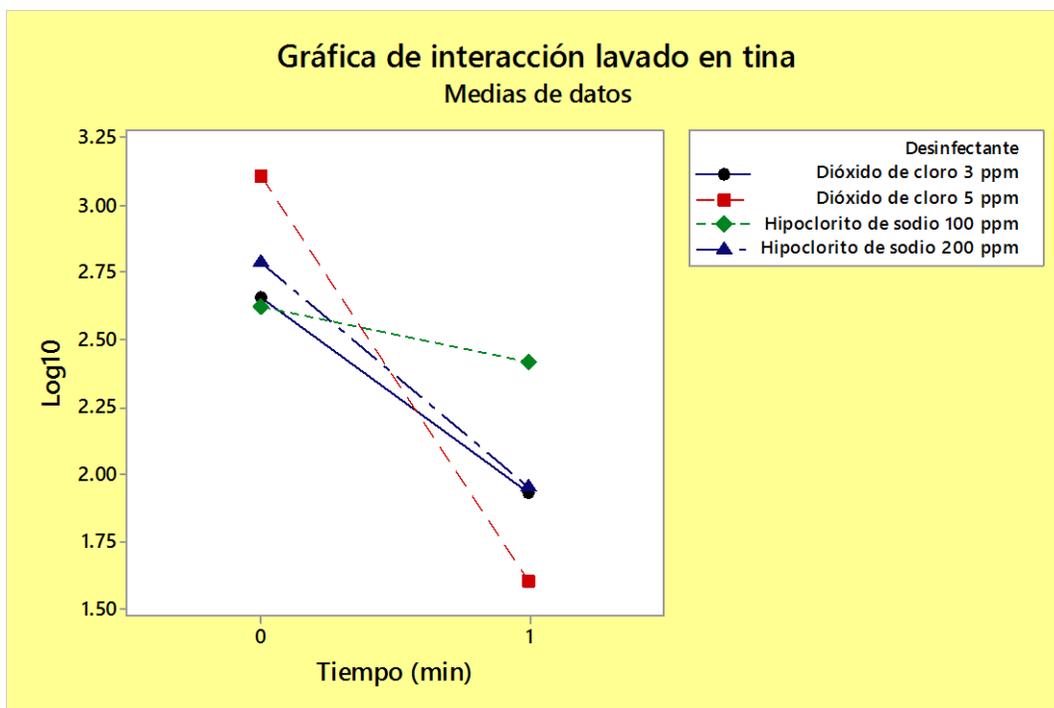


Figura 1. Gráfica de efectos de la interacción de los factores Desinfectante y Tiempo de contacto sobre la reducción de *Salmonella enterica* ser. Choleraesuis en mangos lavados por el método inmersión en tina.

La comparación de medias para la interacción Desinfectante*Tiempo se realizó con la prueba de Tukey y una confianza de 95% obteniendo lo siguiente:

Desinfectante*Tiempo	Media	Agrupación
5 0	3.11167	A
200 0	2.78500	A
3 0	2.65667	A B
100 0	2.62333	A B
100 1	2.41333	A B
200 1	1.95167	B C
3 1	1.92833	B C
5 1	1.60333	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Las reducciones bacterianas en los tratamientos con turbidez de 50 UNT fueron inferiores a los alcanzados a 2 UNT. Ya que el cloro reacciona con la materia orgánica, esta puede neutralizar el desinfectante antes de que alcance las células microbianas, por lo tanto, reduciendo su efectividad (Zhang y Farber 1996). Adicionalmente, las cavidades, grietas y pequeñas fisuras en la superficie del fruto junto con la naturaleza hidrofóbica de la cutícula cerosa de muchos frutos y vegetales, pueden servir de barrera al cloro y otros sanitizantes para alcanzar a los microorganismos (Zhang y Farber 1996).

Los resultados en los tratamientos por ambos desinfectantes sobre la reducción de *Listeria monocytogenes* muestran un porcentaje de reducción del 100%, esto pudo ser debido a la baja adherencia inicial de la bacteria sobre la superficie del fruto y a que *Listeria* presentó una mayor susceptibilidad que *Salmonella* a los desinfectantes aquí estudiados. De acuerdo a la literatura, las bacterias Gram +, como lo es *Listeria*, presentan menor resistencia a los desinfectantes que las bacterias Gram -, como lo es *Salmonella* (Russell et al. 1997; Maillard, 2002).

Espreas

El cuadro 3 muestra el análisis de varianza de los resultados de la eficiencia de reducción bacteriana del hipoclorito de sodio y el dióxido de cloro en los ensayos en espreas. El factor Desinfectante y factor Tiempo fueron estadísticamente significativos con un valor de $P < 0.05$.

Cuadro 3. Análisis de Varianza de los factores desinfectante y tiempo de contacto en la reducción de *Salmonella* Choleraeausis sobre la superficie de mango mediante espreas.

Fuente	G.L.	SC Sec.	SC Ajust.	F	P
Desinfectante	3	2.5969	0.8656	3.49	0.040
Tiempo	1	8.1667	8.1667	32.92	0.000
Desinfectante*Tiempo	3	0.7169	0.2390	0.96	0.434
Error	16	3.9690	0.2481		
Total	23	15.4495			

La información agrupada para el análisis de datos, obtenidos de los tratamientos en el lavado de mangos mediante el método de aspersión, utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% muestra los siguientes resultados:

Desinfectante	Media	Agrupación
100	3.24667	A
200	3.24333	A
3	2.61667	A
5	2.56000	A

Tiempo	Media	Agrupación
0	3.50000	A
20	2.33333	B

Valores que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

El análisis de datos con el método de Tukey muestra que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los desinfectantes, no así para los tiempos de contacto los cuales resultaron significativos. A pesar de que la reducción bacteriana por los diferentes desinfectantes no presentó diferencias significativas, se discuten los resultados de los efectos de los factores principales para efecto de diferencias prácticas.

Las gráficas de efectos principales muestran las tendencias ejercidas por los factores de un tratamiento sobre la variable de respuesta. En este sentido, la Figura 2 muestra que a pesar de que las diferencias estadísticas no fueron suficientes para designar a ambos desinfectantes como diferentes, se puede observar que las reducciones bacterianas alcanzadas por los tratamientos de hipoclorito de sodio fueron inferiores que las alcanzadas por el dióxido de cloro durante el lavado de mango por el método de aspersión. De acuerdo a los resultados mostrados para *Salmonella*, el mejor tratamiento fue el dióxido de cloro a 5 ppm registrando una concentración bacteriana de 2.56 Log₁₀ al final del tratamiento, lo cual representa una reducción de 0.94 log₁₀; mientras que el menos efectivo fue el hipoclorito de sodio a 100 ppm con un 3.24 Log₁₀, representando una reducción de 0.25 log₁₀. En relación al factor tiempo de contacto, el cual resultó estadísticamente significativo, mostró lograr una reducción bacteriana de 1.16 log₁₀ en los 20 s de tratamiento desinfectante.

Por otro lado, los resultados para *Listeria monocytogenes* muestran un 100% de reducción bacteriana para ambos desinfectantes; de nueva cuenta la baja capacidad de adherencia inicial de *Listeria monocytogenes* a la superficie del mango, así como la sensibilidad a los desinfectantes probados contribuyeron a la eliminación total de este patógeno durante este procedimiento.

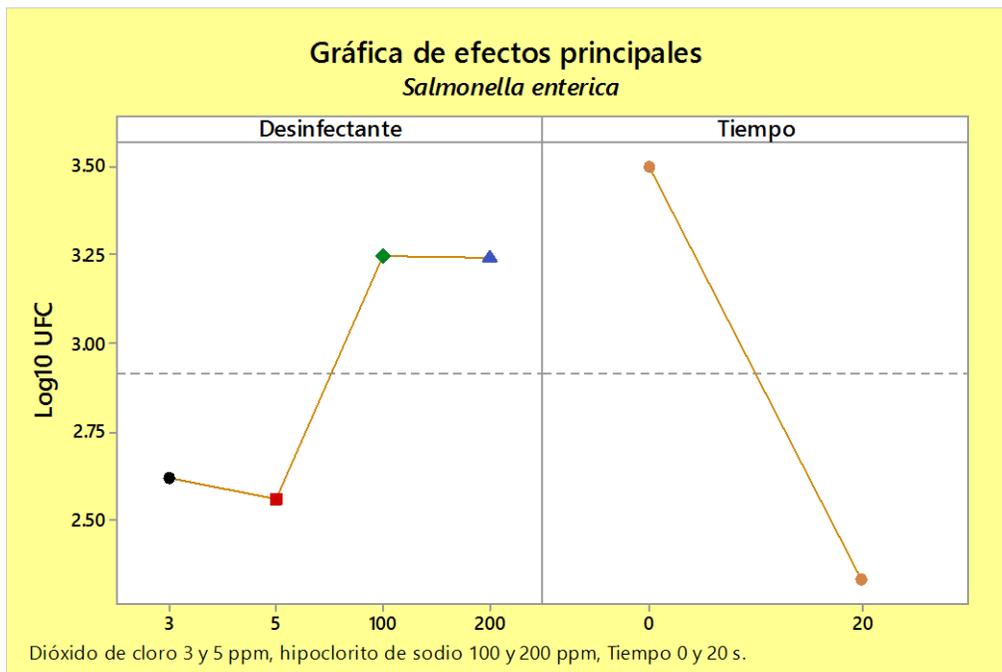


Figura 2. Gráfica de efectos principales de los factores desinfectante y tiempo de contacto sobre la reducción de *Salmonella enterica* ser. Choleraesuis en mangos lavados por el método de aspersión.

La comparación de ambos métodos de lavado en la aplicación del desinfectante, es decir inmersión en tinas (2 UNT) y aspersión, mostraron ser efectivos y sin diferencias para la reducción de *Listeria monocytogenes* en un 100%. Mientras que, para el caso de *Salmonella*, el método de inmersión en tina presentó una ligera diferencia alcanzando reducciones mayores, posiblemente debido a un tiempo de contacto mayor que el método de aspersión; sin embargo, estas no fueron estadísticamente significativas.

La utilización del método de aspersión puede favorecer la reducción bacteriana adherida a la superficie del fruto debido a la acción de arrastre que ejerce la presión del asperjado del agua adicionada con el desinfectante empleado en este proceso de lavado. Aunado a esto, en el método de lavado por aspersión el no reúso de agua favorece al poder oxidante del desinfectante al no permitir la acumulación de materia orgánica.

Por otro lado y como se había expuesto anteriormente, la morfología de los frutos que puede presentar irregularidades tales como las cavidades, grietas y pequeñas fisuras en la superficie del fruto junto con la naturaleza hidrofóbica de la cutícula cerosa de muchos frutos y vegetales, pueden servir de barrera al cloro y otros sanitizantes para alcanzar a los microorganismos (Zhang y Farber 1996), es por ello importante señalar que de manera general en los empaques de productos frescos, el uso del método de aspersión es acompañado de la utilización de cepillos acoplados a las bandas transportadoras del fruto, los cuales buscan la remoción de suelo y materia orgánica, para que de esta manera los desinfectantes ejerzan su mayor acción sobre las células microbianas y no sobre los detritos. En este sentido, Adams et al (1989) y Zhang y Farber (1996), mencionan que el uso de detergentes, desinfectantes y otros acoplados a una manipulación física tales como el cepillado, puede ser usado para favorecer la disminución de la hidrofobicidad y remover parte de la cera para incrementar la exposición de los microorganismos a los sanitizantes.

Hidrogenfriado

Para este apartado del tratamiento de hidrogenfriado, los resultados fueron analizados desde dos ángulos:

- 1) Cinética de inactivación bacteriana, donde se analizó el tiempo en que el efecto del desinfectante ejercía una reducción bacteriana de 1 Log₁₀, es decir, del 90% de la población bacteriana.
- 2) Efecto de los factores desinfectante, turbidez y tiempo de contacto sobre la reducción de la sobrevivencia bacteriana.

1) Cinética de inactivación bacteriana

Cinética de inactivación de *Salmonella Choleraesuis*.

El análisis de regresión no lineal, basado en el modelo Wiebull, para la supervivencia de *Salmonella Choleraesuis* usando dióxido de cloro, arrojó los parámetros estimados siguientes:

Parámetro	Estimado	Error de estimación
α	0.00015	0.00116
β	0.15081	0.11240

La falta de ajuste del modelo no resultó significativa ($P = 0.844$) (Cuadro 4), por lo que podemos afirmar que el modelo Weibull estimado es adecuado.

Cuadro 4. Prueba de ANOVA para el ajuste del modelo utilizando dióxido de cloro.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Error	6	2.16071	0.36011		
Falta de ajuste	1	0.01844	0.01844	0.04	0.844
Error puro	5	2.14227	0.42845		

El modelo de predicción estimado es

$$\text{Log} \left(\frac{Nt}{No} \right) = -\frac{1}{2.303} \times \left[\left(\frac{\text{Tiempo}}{0.00015} \right) \right]^{0.15081} \quad (4)$$

Resolviendo la Ecuación (4) para la variable *Tiempo* podemos estimar el tiempo al cual se alcanza una disminución en supervivencia de *Salmonella* de 1 Log_{10} mediante dióxido de cloro a 5 ppm, el cual ocurre a los 0.39 min. La gráfica de la cinética de inactivación se muestra en la Figura 3.

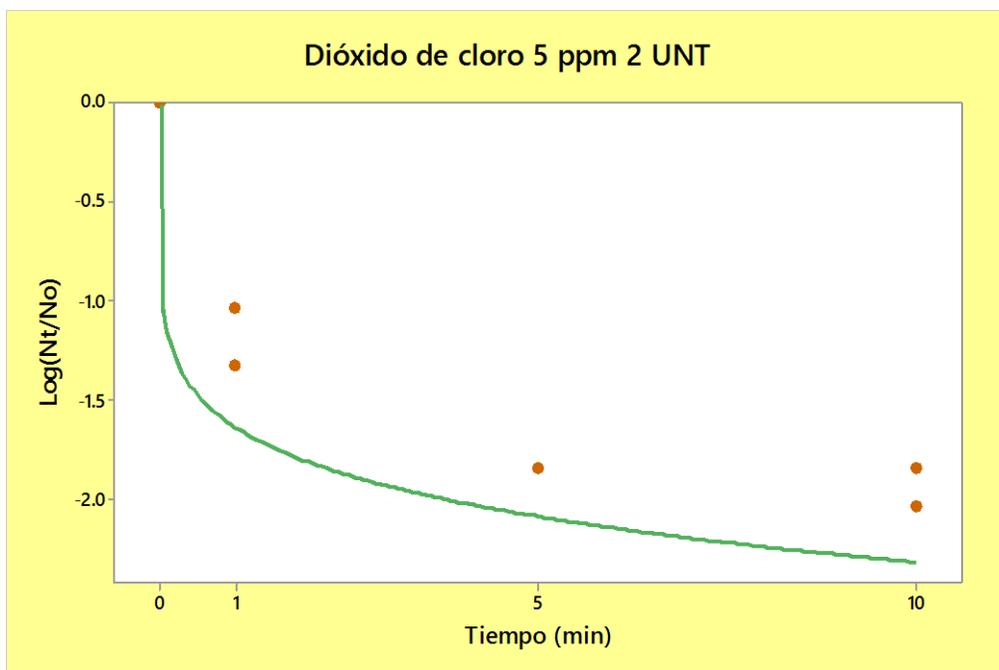


Figura 3. Cinética de desinfección de dióxido de cloro a 5 ppm para *Salmonella Choleraesuis*

Otras investigaciones usando cinética de inactivación, como la de Mahmoud et al., 2007 obtuvieron una reducción de 1 Log_{10} UFC en 2.7 min en la superficie de fresa, con 5 ppm de dióxido de cloro gas, y Mahmoud et al., 2008, lograron una reducción de *Salmonella* Poona de 1 Log_{10} UFC en 1.5 min por 5 cm^2 en melón cantaloupe con 5 ppm de dióxido de cloro gas. En esta investigación se alcanzó la reducción de 1 Log_{10} en 0.39 min de *Salmonella Choleraesuis*, mostrando que la causa de esta divergencia podría atribuirse a que se utilizó dióxido de cloro acuoso en la inactivación de *Salmonella Choleraesuis* adherida en mango y que la adhesión microbiana está relacionada al tipo de superficie de cada fruto, ya que hay diferencias en la cutícula de fresa, melón y mango, permitiendo por ello una mayor reducción de microorganismos en el mango por presentar una superficie más lisa y que aplicando el desinfectante en forma acuosa, en vez de gas, tiene un mejor contacto con toda la superficie del fruto.

Por otro lado, el análisis de regresión no lineal, basado en el modelo Weibull, para la supervivencia de *Salmonella Choleraesuis* usando hipoclorito de sodio, arrojó los parámetros estimados siguientes:

Parámetro	Estimado	Error de estimación
A	0.02807	0.06028
B	0.13521	0.05598

La falta de ajuste del modelo no resultó significativa ($P = 0.608$) (Cuadro 5), por lo que podemos afirmar que el modelo Weibull estimado es adecuado.

Cuadro 5. Prueba de ANOVA para el ajuste del modelo utilizando hipoclorito de sodio.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Error	4	0.04302	0.01076		
Falta de ajuste	1	0.00421	0.00421	0.33	0.608
Error puro	3	2.14227	0.42845		

El modelo de predicción estimado es

$$\text{Log}\left(\frac{Nt}{No}\right) = -\frac{1}{2.303} \times \left[\left(\frac{\text{Tiempo}}{0.02807}\right)\right]^{0.13521} \quad (5)$$

Resolviendo la Ecuación (5) para la variable *Tiempo* se estimó una disminución en una reducción en supervivencia de 1 Log₁₀ a los 13.42 min mediante hipoclorito de sodio a 200 ppm, lo que demuestra que este microorganismo adherido en la superficie del mango se protege de la acción del desinfectante en las rugosidades de la cutícula. La gráfica de la cinética de inactivación se muestra en la Figura 4.

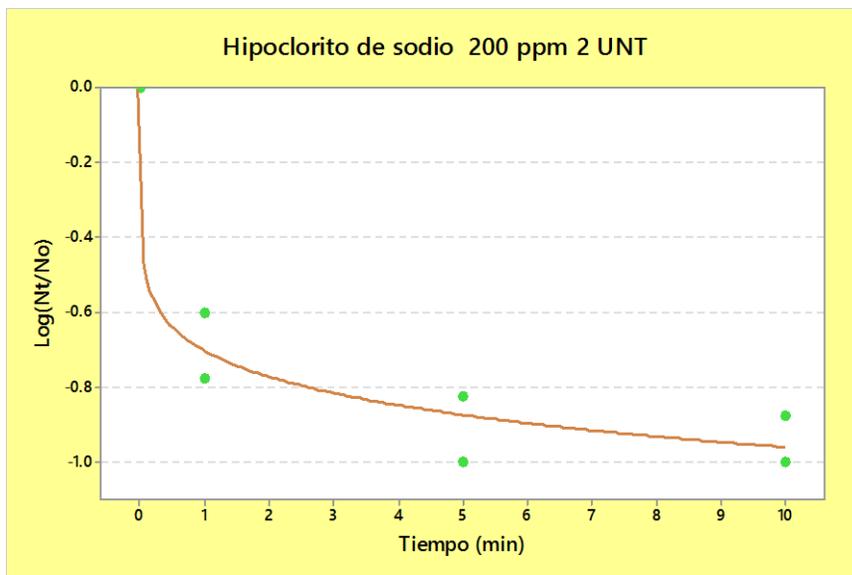


Figura 4. Cinética de desinfección de hipoclorito de sodio a 200 ppm para *Salmonella Choleraesuis*.

La reducción en la supervivencia de 1 Log₁₀ de *Salmonella Choleraesuis* a los 13.42 min mediante hipoclorito de sodio a 200 ppm demuestra que este microorganismo adherido en la superficie de este fruto es menos afectado por este desinfectante y que el dióxido de cloro a 5 ppm fue una rápida y mejor alternativa de desinfección para *Salmonella Choleraesuis*.

Otros trabajos con *Salmonella Typhimurium* adherida en superficie de mango mediada por productos clorados a 200 ppm, presentaron una reducción de 2.15 Log₁₀ UFC cm⁻² en un tiempo de 10 min (Fernandes et al., 2014). Además, autores como (Richards y Beuchat, 2004; Ukuku y Fett, 2006) reportan la reducción de 1-2 Log₁₀ UFC en productos frescos lavados con agua clorada a 200 ppm.

Cinética de inactivación de *Listeria monocytogenes*.

La cinética de inactivación para *Listeria monocytogenes* no pudo estimarse debido a que, en ambos desinfectantes, se produjo una reducción total del microorganismo antes de un minuto de contacto. Esto puede explicarse por la poca adherencia que *Listeria monocytogenes* presenta a la superficie del fruto de mango.

2) Efecto de los factores desinfectante, turbidez y tiempo de contacto sobre la reducción de la sobrevivencia bacteriana.

A continuación, se presenta el análisis de varianza, las comparaciones de medias de los efectos que resultaron estadísticamente significativos y un análisis gráfico de los mismos.

Análisis de resultados para *Salmonella Choleraesuis*

El Cuadro 6 muestra que los efectos de tiempo de contacto, tipo de desinfectante y los efectos de interacción, turbidez*desinfectante y tiempo*desinfectante fueron estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

Cuadro 6. Análisis de varianza (ANOVA) de reducción de *Salmonella Choleraesuis* mediante dióxido de cloro a 3 y 5 ppm e hipoclorito de sodio a 100 y 200 ppm.

Fuente	G.L.	SC Sec.	SC Ajust.	F	P
Turbidez	1	0.2240	0.2240	0.11	0.746
Tiempo	3	30.6136	10.2045	48.01	0.000
Desinfectante	3	10.7068	3.5689	16.79	0.000
Turbidez*Tiempo	3	0.1743	0.0581	0.27	0.844
Turbidez*Desinfectante	3	3.5071	1.1690	5.50	0.002
Tiempo*Desinfectante	9	4.8687	0.5410	2.54	0.013
Falta de ajuste	9	1.9017	0.2113		
Error	64	13.6152	0.2127	0.99	0.455
Total	95	65.4099			

$R^2 = 76.28\%$, GL: grados de libertad. SC Sec: suma de cuadrados, SC Ajust: suma de cuadrados ajustados, F: valor de prueba estadístico F y P: nivel de significancia.

Efectos principales para *Salmonella Choleraesuis*

La Figura 5 muestra las medias de tratamientos de los efectos principales y los resultados de las comparaciones de medias en los mismos. En cuanto a los desinfectantes, dióxido de cloro a 5 ppm

mostró la mayor reducción (1.28 Log₁₀), mientras que el hipoclorito de sodio a 100 fue el menos efectivo (0.36 Log₁₀). No se encontraron diferencias entre dióxido de cloro a 3 ppm e hipoclorito de sodio a 100 ppm. Para el tiempo de contacto, la reducción en la supervivencia microbiana resultó diferente para los tiempos 0, 1 y 5 min (Tukey, P < 0.05), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos 5 y 10 min, mostrando reducciones logarítmicas a los 0, 1, 5 y 10 min de 0.0, 0.62, 1.15 y 1.49 Log₁₀; respectivamente. La turbidez no fue significativa.

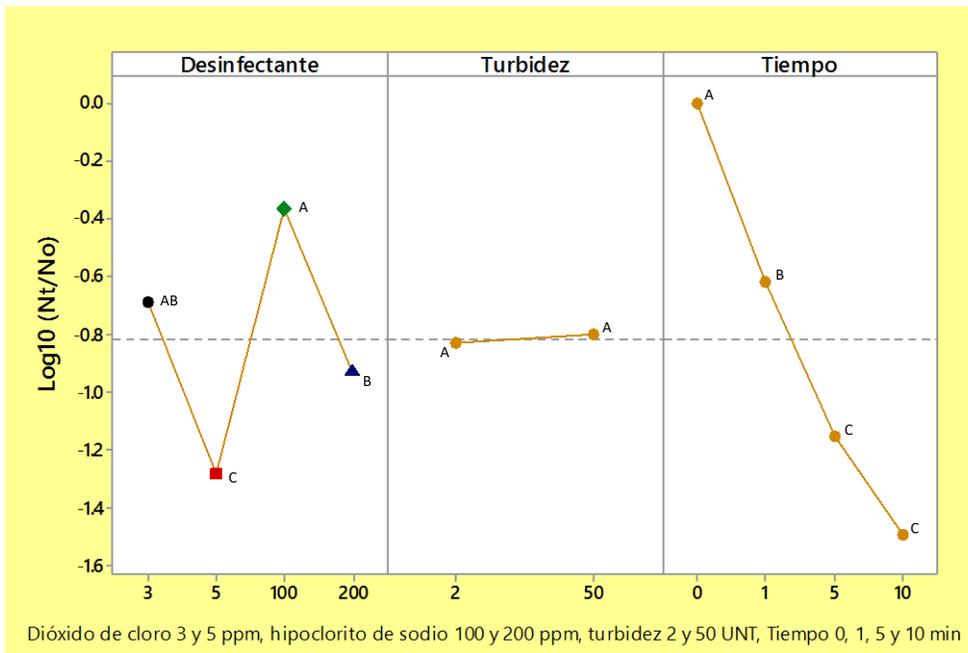


Figura 5. Efectos principales Tiempo*Desinfectante*Concentración para *Salmonella Choleraesuis*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey. Valores promedio de 3 repeticiones \pm error estándar.

Efectos de interacción Turbidez*Desinfectante para *Salmonella Choleraesuis*

La Figura 6 muestra los resultados de los efectos de interacción entre la Turbidez y el Tipo de desinfectante. El dióxido de cloro a 3 ppm y 2 UNT resultó significativamente inferior ($P < 0.05$) a las otras combinaciones de estos niveles de los factores en la reducción de la supervivencia de *Salmonella Choleraesuis*. En el caso del hipoclorito de sodio, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las concentraciones 100 y 200 ppm para 50 UNT, más no así para las otras combinaciones de estos niveles de factores. En general, Dióxido de cloro a 5 ppm a 2 y 50 UNT e hipoclorito de sodio a 200 y 50 UNT resultaron los mejores tratamientos en la reducción de la supervivencia logarítmica de *Salmonella Choleraesuis*.

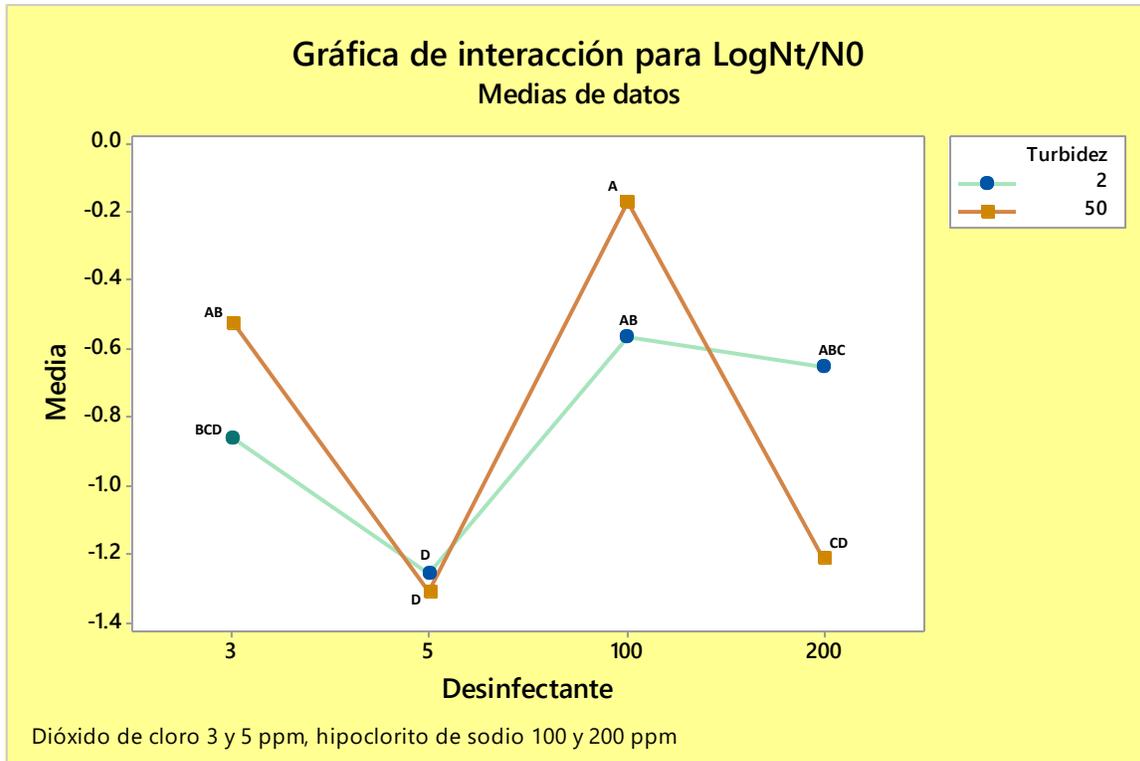


Figura 6. Efectos de interacción Turbidez*Desinfectante para *Salmonella Choleraesuis*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) por la prueba de Tukey. Valores promedio de 3 repeticiones \pm error.

Los resultados mostrados en la Figura 6 pueden ser explicados en base a que la turbidez de 50 UNT exige una mayor demanda de desinfectante que la turbidez de 2 UNT, esto debido a que la presencia de materia orgánica y otros componentes presentes en el agua reaccionan con el poder oxidante del desinfectante, además de los microorganismos; en este sentido, las concentraciones mayores de los desinfectantes en estudio (Dióxido de cloro a 5 ppm e hipoclorito de sodio a 200 ppm) cubrieron la demanda requerida por estos componentes no celulares, quedando disponibilidad para solventar la demanda de desinfectante necesaria para inactivar las bacterias presentes en la muestra. De manera contraria, las concentraciones menores de desinfectante (Dióxido de cloro a 3 ppm e hipoclorito de sodio a 100 ppm) no fueron suficientes para abastecer la necesidad oxidante de estos dos elementos presentes en el agua a 50 UNT afectando la reducción logarítmica de *Salmonella Choleraesuis*.

La turbidez en agua está compuesta de materia inorgánica (ej. limo, arcilla, óxidos de hierro) y orgánica, así como de células microbianas (Silverman et al. 1983; LeChevallier et al. 1988). Factores tales como la cantidad de materia orgánica en torno a los organismos blanco es probable que influyan en las características de adhesión de las células y reducen el efecto letal de los desinfectantes.

Efectos de interacción Tiempo*Desinfectante para *Salmonella Choleraesuis*

La Figura 7 muestra que el dióxido de cloro a 5 ppm fue el mejor desinfectante, durante el tiempo de contacto, alcanzando reducciones de 1.128, 1.867, 2.12 Log₁₀ a los 1, 5 y 10 minutos; respectivamente. El hipoclorito de sodio a 100 ppm resultó el tratamiento con menor efecto, registrando valores de 0.104, 0.559, 0.805 Log₁₀ para los tiempos de 1, 5 y 10 minutos; respectivamente. Por otro lado, analizando los desinfectantes para cada tiempo de contacto, a los tiempos 1 y 5 min sólo resultó estadísticamente diferente el dióxido de cloro a 5 ppm, es decir, la concentración de este desinfectante fue la que alcanzó mayores reducciones en estos tiempos de contacto; mientras que a los 10 min sólo el hipoclorito de sodio a 100 ppm resultó diferente, es decir, fue el tratamiento con menores reducciones alcanzadas a los 10 min de tiempo de contacto, mientras que los otros tres no presentaron significancia estadística. Estas diferencias fueron obtenidas mediante la prueba de Tukey.

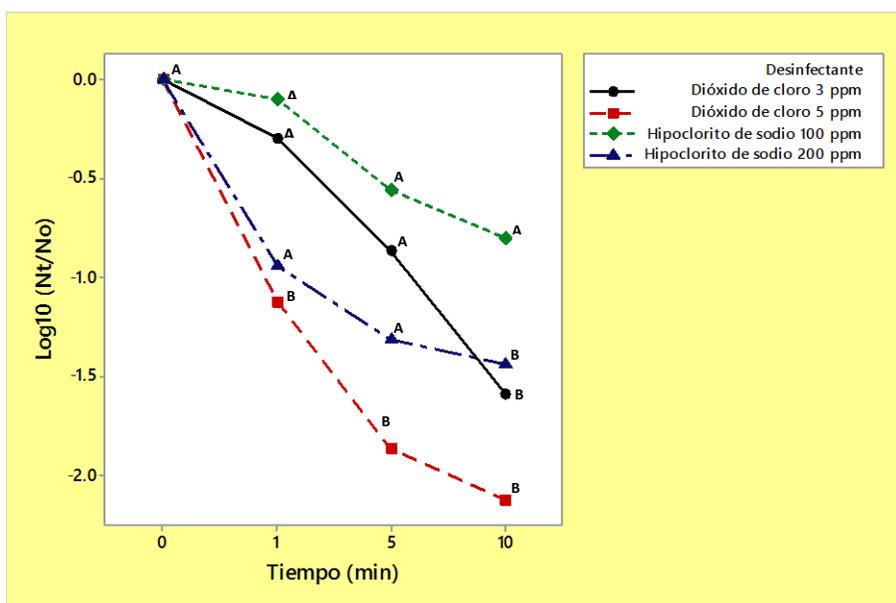


Figura 7. Efectos de interacción Tiempo*Desinfectante para *Salmonella Choleraesuis*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0.05$) por la prueba de Tukey. La comparación de medias se hace para cada tiempo (columnas). Valores promedio de 3 repeticiones \pm error estándar.

El dióxido de cloro presentó una mayor reducción logarítmica de *Salmonella Choleraesuis*, debido a que el dióxido de cloro tiene 2.5 veces más poder oxidante que el ácido hipocloroso, lo cual lo hace más efectivo en la desinfección.

De acuerdo a la EPA (1997) un agente antimicrobiano es aquel que reduce 2 Log UFC g⁻¹ o mL⁻¹ de un patógeno, por lo tanto, el dióxido de cloro a 5 ppm representa una alternativa de desinfección, debido a que logra una reducción de *Salmonella Choleraesuis* de 2.24 Log₁₀.

Los resultados muestran que los desinfectantes objetos de estudio fueron eficaces frente a las cepas de microorganismos ensayadas. Esto se debe a que en su composición presentan compuestos de cloro, el cual tiene como mecanismo de acción inhibir enzimas esenciales, al oxidar los grupos tiol (S-H). También puede producir cambios en la permeabilidad de la membrana celular (Henao S, 2003).

Análisis de resultados para *Listeria monocytogenes*

La concentración de *Listeria monocytogenes* adherida a la superficie del mango fue baja y eliminada en pocos segundos por todos los desinfectantes probados, lo que no permitió obtener datos, en los tiempos de contacto definidos para realizar un análisis estadístico del experimento. Esto puede atribuirse a la baja capacidad de adherencia y a la baja tasa de transferencia del patógeno del agua al fruto (Objetivo 2). Por lo anterior, se puede plantear que *Listeria monocytogenes* no es un patógeno relevante en el hidrofriado de mango.

V.2 Objetivo 2. Transferencia de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* del fruto al agua y del agua al fruto

Durante este ensayo se procedió a inocular los frutos de mango con una concentración conocida de la bacteria en estudio para simular la llegada de fruto contaminado al empaque y evaluar el efecto de remoción y transferencia de la bacteria a la tina, propiciando con esto que este insumo se pueda convertir en un vector de contaminación puntual y constante.

Durante este ensayo se procedió a inocular el agua contenida en la tina con una concentración conocida de la bacteria en estudio para simular la llegada de fruto libre de contaminación a empaque y ser expuestos a agua contaminada, evaluando con esto el efecto de transferencia de la bacteria al fruto.

De acuerdo con el Cuadro 7, para los tratamientos control, es decir sin el uso de desinfectantes, las tasas de transferencia de *Salmonella* y *Listeria* del fruto al agua son de 37.45 y de 0.00%, respectivamente. Mientras que de manera inversa la transferencia fue mayor, presentándose valores de 49.17 y de 11.20% para *Salmonella* y *Listeria*, respectivamente. Estos resultados demuestran que los episodios de transferencia bacteriana con *Salmonella enterica* ser. Choleraesuis son mayormente probables en ambos sentidos durante los procesos de lavado que aquellos que puedan suceder con *Listeria monocytogenes*, los cuales se reducen hasta cero del fruto al agua.

Las tasas de transferencia bacteriana son directamente impactadas por la capacidad de adherencia de estas a la superficie del fruto. En este sentido, *Salmonella Choleraesuis* demostró tener una mayor capacidad de adherencia sobre la superficie del mango que *Listeria monocytogenes*. Esto fue corroborado en cada ensayo de transferencia bacteriana, en donde como primer paso se procedía a inocular la superficie del fruto con cada bacteria en estudio, permitiendo un secado posterior por 1 hora. En ensayos adicionales de *Listeria* se procedió a permitir el secado hasta por 4 horas; a pesar de ello las adherencias fueron menores en *Listeria* ($0.79 \log_{10}$), lo cual es un indicativo de la baja capacidad de esta bacteria para adherirse a la superficie del mango.

En el caso de las tasas de transferencia bacteriana con la utilización del desinfectante hipoclorito de sodio, los resultados muestran que la transferencia bacteriana no se dio en ninguno de los dos sentidos. *Listeria* por su parte, debido a su baja capacidad de adherencia a la superficie del mango aunado a la acción del desinfectante presentó cero tasas de transferencia del fruto al agua. Cabe mencionar, que al realizar el tratamiento de la transferencia de *Salmonella* del fruto al agua con la presencia de hipoclorito de cloro en el agua de la tina, se cuantificó la población bacteriana restante después del tratamiento quedando un 29.37%, lo cual equivale a una reducción de $0.47 \log_{10}$, esto muestra que aunque no se transfirió la bacteria al agua, si permaneció cierta población en la superficie del mango, demostrando con esto que la adherencia bacteriana a superficies les ofrece mayor resistencia a diversos factores, incluidos los desinfectantes, ya que la interacción de estos puede ofrecer protección debido al

posicionamiento bacteriano en estructuras o cavidades del fruto que contrarresten la acción oxidante del desinfectante.

El comportamiento observado de las transferencias bacterianas nulas del fruto al agua y del agua al fruto, puede ser explicado en base a que la contaminación bacteriana en el agua, la cual tenía 2 UNT, tras la aplicación de desinfectante aseguró su inactivación, lo cual previno la transferencia en ambas direcciones. Cabe mencionar que la baja turbidez (2 UNT) favorece la acción de cualquier desinfectante, no representando una barrera para la máxima acción de los mismos, por lo que se recomienda ser cautelosos y vigilantes de este parámetro (Turbidez) en las tinas de lavado en condiciones reales, ya que su aumento tiene un efecto directo y negativo sobre el poder microbicida de cualquier desinfectante.

Cuadro 7. Tasas de transferencia del Agua al Fruto y del Fruto al Agua para <i>Salmonella Choleraesuis</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>				
Bacteria	Del fruto al agua (100 ppm)	Del agua al fruto (100 ppm)	Del fruto al agua	Del agua al fruto
<i>Salmonella Choleraesuis</i>	0.00	0.00	37.45	49.17
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.00	0.00	0.00	11.20

*Las tasas de transferencia están expresadas en %

Salmonella, una bacteria Gram negativa, presenta dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, además de contener lipopolisacáridos que son polímeros complejos con restos de ácidos grasos como parte lipófila y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos y forman parte de la membrana externa de estas bacterias (Maier et al., 2009). Estas características de su pared celular le confieren habilidad de adhesión la cual está controlada por proteínas, lipopolisacáridos y ácidos lipoteicoicos.

Listeria, una bacteria Gram positiva, presenta sólo una membrana lipídica y pared de peptidoglicano gruesa, a la que se unen los ácidos teicoicos cargados negativamente, contribuyendo a la carga negativa de la pared celular de la bacteria (Maier et al., 2009). Los microorganismos deficientes en lipopolisacáridos exhiben una reducción en la hidrofobicidad de la superficie y se reduce la capacidad de adherirse a superficies hidrofílicas (Daved y O'Toole, 2000) como lo es la superficie de mango. Dada la baja tasa de transferencia mostrada por *Listeria monocytogenes* se puede considerar que este patógeno no representa un problema importante de contaminación microbiológica durante el proceso de hidrogenfriado de mango.

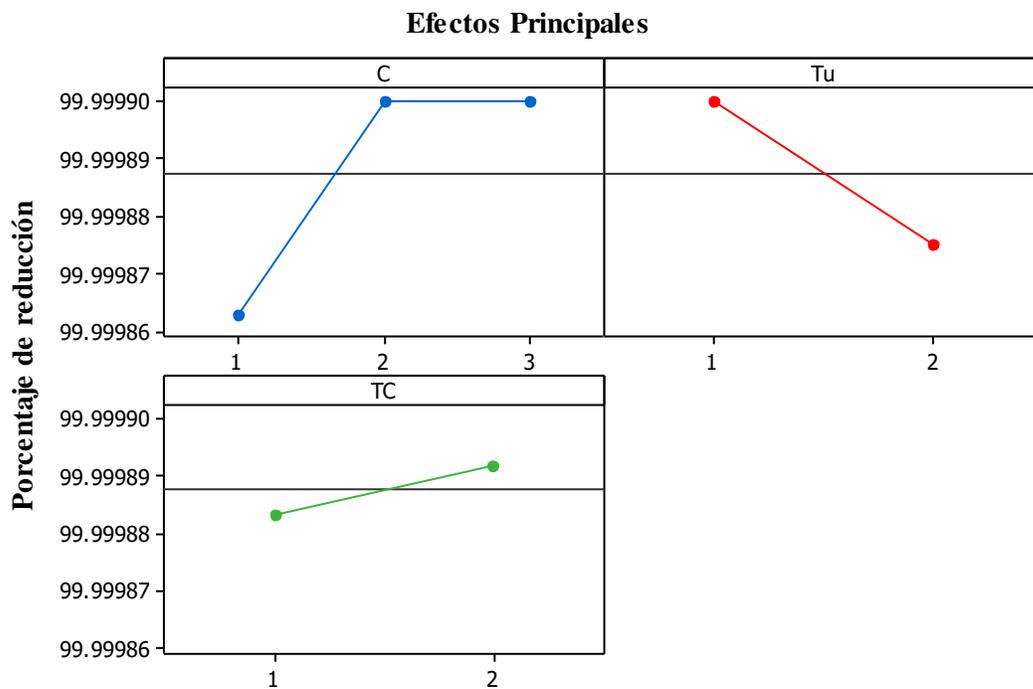
En este estudio la tasa de transferencia del agua al fruto fue mayor que la tasa de transferencia del fruto al agua, lo cual coincide con lo reportado por otros autores como Holvoet et al. (2014); Allende et al. (2008) y Rana et al. (2010) donde describen que la transferencia de microorganismos sucede en mayor proporción del agua hacia el producto, argumentando que aunque el agua es una útil herramienta para reducir la contaminación, el uso de este recurso con una inadecuada calidad microbiológica tiene el potencial de ser una fuente directa de contaminación y un vehículo para la transferencia bacteriana.

Estos resultados enfatizan la vulnerabilidad de los procesos de hidrocenfrido por contaminación microbiana cuando no es usado un desinfectante, o bien que no se realice un adecuado monitoreo de este a lo largo de la jornada laboral. El principal efecto de un desinfectante es reducir y controlar la carga microbiana del agua y prevenir la transferencia de microorganismos.

V.3 Objetivo 3. Resultados del ensayo de la evaluación del desinfectante cobre en simulador de hidrotérmico, a distintas calidades de agua.

De acuerdo al estudio del desinfectante a base de cobre el análisis del ANOVA arroja que no existen diferencias significativas en los factores turbidez, concentración y tiempo de contacto. Sin embargo, se discuten los resultados de los efectos principales para efecto diferencias prácticas.

Efectos principales: Concentración, Turbidez y tiempo de contacto, sobre la eficiencia de reducción microbiológica de *E. coli*, simulando condiciones de tratamiento hidrotérmico (Figura 8).



Tu1 = 2 UNT
Tu2 = 50 UNT

TC1= Tiempo de contacto 45 min.
TC2= Tiempo de contacto 90 min.

C1 = 8.5 ppm
C2 = 12.5 ppm
C3 = 17.0 ppm

Figura 8. Gráfica de efectos principales durante el tratamiento hidrotérmico.

De manera adicional, se registró que las concentraciones 8.5 ppm, 12.5 ppm y 17 ppm del desinfectante cobre fueron eficientes, y no fue afectado por la turbidez y tiempo de contacto. Sin embargo, las dos concentraciones más altas resultaron con un efecto no diferenciado. Si bien la turbidez muestra una ligera diferencia, esta no logró ser estadísticamente significativa, mientras que, en lo concerniente a los tiempos de contacto, *E. coli* logró alcanzar una reducción de 5 log₁₀ desde los 45 min. Lo que nos indica que el cobre resulta ser un desinfectante eficiente en la reducción microbiana de *E. coli*.

De manera adicional, se procedió a registrar la residualidad del cobre en el agua para efectos de tener un panorama global del potencial de control del cobre en estos escenarios. Como se puede apreciar en el Cuadro 8, cuando el cobre es expuesto a una mayor turbidez su residualidad se ve disminuida, esto por el efecto que el desinfectante ejerce sobre la materia orgánica reaccionando con la misma.

Cuadro 8. Residualidad de cobre en agua a los 90 minutos		
Concentración Cobre¹	Residualidad	
	2 UNT	50 UNT
8.5	6.83	5.66
12.5	9.31	6.52
17.0	13.77	11.35

¹ppm

Al evaluar residualidad del cobre en agua al término de los 90 minutos, que se establecen en el tratamiento hidrotérmico, se observó que perdió un 30 % de su concentración inicial al aumentar la turbidez.

Resultados descriptivos de valores de (K) y tiempo de remoción de *E. coli*.

Los valores promedio de la constante de muerte microbiana (K) al ser comparados se observa que a pesar que se aumenta concentración de desinfectante en una mayor turbidez, los valores promedio de K disminuyen, lo que indica que la presencia de materia orgánica disminuye la muerte microbiana ya que se reduce la actividad bactericida del cobre.

Cuadro 9. Tiempo requerido para la remoción de <i>E. coli</i> utilizando cobre				
%	Remoción de <i>E. coli</i>		Tiempo requerido (minutos)	
	Unidades en Ln	Unidades en Log₁₀	k^a= 0.4334	k^b= 0.3994

90	2,30258509	1	5.31	6.17
99	4,60517019	2	11.03	11.53
99.9	6,90775528	3	16.34	17.30
99.99	9,21034037	4	21.25	23.06
99.999	11,5129255	5	26.56	29.23
99.9999	13,5129255	6	32.28	34.59
99.99999	16,1180957	7	37.19	40.36
99.999999	18,4206807	8	42.50	46.12

K^a : Constante de muerte de *E. coli* a 2 UNT y 8.5 ppm.de cobre

K^b : Constante de muerte de *E. coli* a 50 UNT y 12.5 ppm.de cobre

El Cuadro 9 nos indica el tiempo para remover X número de unidades logarítmicas de *E. coli*; donde 1 unidad representa un 90% de remoción, 2 unidades 99%, 3 unidades 99.9%, y de esa manera sucesivamente. Por lo que si la concentración inicial de *E. coli* en el agua de hidrotérmico es de 7 logaritmos y se desea una concentración final de 1 logaritmo, se necesitará remover 6 logaritmos, lo cual representa un 99.9999%. Lo que nos indica que se necesitarán de 32.28 minutos para que el cobre a concentración de 8.5 ppm y 2 UNT logre esa remoción y 2.31 minutos más, cuando la concentración sea 12.5 ppm a 50 UNT. Sin embargo, la eficiencia del desinfectante cobre se logra antes de los 90 minutos que se establecen en el tratamiento hidrotérmico.

En el presente estudio se demuestra que la presencia del desinfectante cobre a 2 UNT, tiene un efecto significativo en la sobrevivencia de *E. coli* logrando un 90%, de reducción a los 5.31 min a 2 UNT. Sin embargo, al disminuir el tiempo de contacto del desinfectante y aumentar la turbidez en el agua del hidrotérmico, el cobre reduce su acción, aunque no significativamente. Una de las ventajas más relevantes del uso de cobre durante el proceso de hidrotérmico de mango, es su estabilidad ante temperaturas altas, especialmente cuando en estos escenarios pudiese existir la presencia de bacterias termotolerantes como *Escherichia coli*.

V.4 Objetivo 4. Resultados de la determinación del desinfectante más efectivo para el control de *Salmonella enterica* ser. Choleraesuis y *Listeria monocytogenes* durante los pasos de lavado en el empacado de mango.

El desinfectante más efectivo en controlar y asegurar la calidad microbiana en los pasos de lavado durante el empacado de mango, depende del método con el que este es aplicado. Si bien, entre el método de inmersión (2 UNT) y el método de aspersion no presentaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de reducción bacteriana, la cuantificación de las poblaciones bacterianas después del tratamiento muestra una ligera diferencia que puede ser crucial en la eliminación de un patógeno. En este sentido, el dióxido de cloro a 5 ppm mostró la máxima reducción bacteriana que el resto de los tratamientos en ambos métodos de lavado, con un porcentaje de reducción bacteriana de 50.08 y 42.46% en inmersión en tina y aspersion, respectivamente.

Las cinéticas de inactivación de *Salmonella enterica* ser. Choleraesuis mediada por dióxido de cloro e hipoclorito de sodio mostraron alcanzar la reducción de 1 Log₁₀ bacteriano, es decir del 90% de la población bacteriana, en 0.39 y 13.42 minutos, respectivamente.

A manera de resumen el cloro ha sido ampliamente utilizado en la industria alimentaria para la eliminación de bacterias patógenas. Algunos ejemplos de esto incluyen el lavado de frutas y vegetales, así como la desinfección de superficies de contacto. Sin embargo, debido a algunas de las preocupaciones acerca de los riesgos ambientales y de salud pública asociados con la formación de subproductos peligrosos de la desinfección (principalmente trihalometanos), ha incrementado la presión sobre la industria en la búsqueda de alternativas a este desinfectante. De hecho, el uso del cloro para la desinfección de productos frescos está actualmente prohibido en algunos países europeos incluyendo Alemania, Holanda, Suiza y Bélgica, siendo esta la tendencia para este desinfectante en la industria alimentaria.

VI. Conclusiones

En esta investigación se demostró que *Salmonella enterica* ser. Choleraesuis posee una mayor capacidad de adherencia a la superficie del mango que *Listeria monocytogenes*. Por tanto, de existir la presencia de este patógeno en la superficie del mango aunado a una deficiente calidad de agua, la transferencia puede llevarse a cabo. Por otro lado, *Listeria monocytogenes*, dada su capacidad limitada de adherencia a la superficie del mango, la asociación de este patógeno a la superficie de este producto es limitada, así como también su transferencia en los procesos de lavado durante el empaqueo de mango.

En el presente estudio se demuestra que el uso de cobre en el tratamiento hidrotérmico del mango tiene un efecto significativo en la cinética de inactivación de *E. coli*. Una de las ventajas más relevantes del uso de cobre durante el proceso de hidrotérmico de mango, es su estabilidad ante temperaturas altas, especialmente cuando en estos escenarios pudiese existir la presencia de bacterias termotolerantes como *Escherichia coli*.

Este estudio es el primer reporte del uso del dióxido de cloro acuoso como método de desinfección de *Salmonella enterica* ser. Choleraesuis y *Listeria monocytogenes* en distintas etapas de lavado de mango bajo diversas condiciones. El estudio de la cinética de inactivación bacteriana mostró que el dióxido de cloro es más efectivo en tiempos de contacto más reducidos que el hipoclorito de sodio, postulándolo como una alternativa viable durante el lavado en el empaqueo de mango.

VII. Bibliografía

Adams MR, Hartley AD, Cox LJ. 1989. Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. *Food Microbiol* 6:69-77.

Allende A, Selma MV, López-Gálvez F, Villaescusa R y Gil MI. 2008. Impact of wash water quality on sensory and microbial quality, including *Escherichia coli* cross-contamination of fresh-cut escarole. *Journal of Food Protection*. 71: 2514-2518.

Beatty ME, LaPorte TN, Phan Q, Van Duyn SV y Braden C. 2004. A Multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Saintpaul infectious linked to mango consumption: A Recurrent Theme. *Clinical Infectious Diseases*. 38:1335-1337

Castellanos JZ, Uvalle-Bueno JX, Aguilar- Santelises A, 2000. Manual de interpretación de análisis de suelo, aguas agrícolas, plantas y ecp. Instituto de Capacitación de Productividad Agrícola. México. 2da. Edición, 201.

CDC (Centers for disease Control and Prevention). 2012.

www.cdc.gov/salmonella/braenderup.../index.html? s.... Consultado 20 de mayo de 2014.

Davey, M.E. y O'Toole, G.O. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 847-867.

Holvoet K, De Keuckelaere A, Sampers I, Van Haute S, Stals A y Uyttendaele M. 2014. Quantitative study of cross-contamination with *Escherichia coli*, *E. coli* O157, MS2 phage and murine norovirus in a simulated fresh-cut lettuce wash process. *Food Control*. 37:218-227.

Maier RM, Pepper IL y Gerba CP. 2009. *Environmental Microbiology*. 2nd ed. Academic Press. San Diego, California. USA. Chapter 20:367-370 y 491-503.

Maillard JY. 2002. Bacterial target sites for biocides action. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 92:16s-27s.

Molina E y Meléndez G. 2002. Tabla de interpretación de análisis de suelos. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. p. 6

Rana S, Parisi B, Reineke K, Stewart D, Schlessor J, Tortorello M, Fu TJ. 2010. Factors affecting *Salmonella* Cross-contamination During Postharvest Washing of Tomatoes. https://www.iit.edu/.../2010poster_iafp_rana_salmon. Consultado el 17 de abril de 2015.

Russell AD, Furr JR, Maillard JY. 1997. Microbial susceptibility and resistance to biocides: an understanding. *ASM News*. 63:481-487.

Sivapalasingam S, Barret E, Kimura A, Van Duyne S, De UIT W, Ying M, Frish A, Phan Q, Gould E, Shillam P, Reddy V, Copper T, Hoekstra M, Higgins C, Sanders JP, Tauxe RV y Sluske L. 2003. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Newport infection linked to mango consumption: impact in water dip disinfection technology. *Clinical Infectious Diseases*. 37:1585-1590.

Zhang S, Farber JM. 1996. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiol* 13:311-21.

Parte de las actividades programadas en el proyecto contemplaron la visita a huertos de mango, de los cuales provendrían los frutos para realizar los ensayos a nivel laboratorio. Los huertos a visitar se encuentran ubicados en el municipio de Escuinapa, Sinaloa. En nuestra visita los encargados de huerto externaron su preocupación por haberse presentado en esta temporada un ciclo atípico, en donde la producción se vio afectada por la escasez del fruto viéndose obligados a culminar la temporada dos meses antes de lo usual.

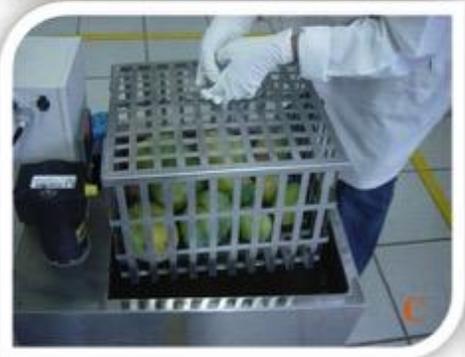


Una actividad previa al inicio de los ensayos a nivel laboratorio fue la visita a una empacadora de mango para actualizar la información correspondiente al proceso de empacado de mango. En este recorrido se apreció el proceso completo de empacado de mango, incluyendo los respectivos hidrotratamientos que serán evaluados en el presente proyecto de investigación. Hasta hoy en día el método desinfectante por selección en estos empaques es el cloro.



Anexo II. Actividades de laboratorio

Las actividades de laboratorio consistieron en llevar a cabo todos los preparativos para realizar los ensayos correspondientes a cada uno de los objetivos planteados en el proyecto de investigación. Para ello, la preparación de caldos y agares de cultivo, reactivación y propagación y purificación bacteriana, entre otros fueron pasos indispensables previos al ensayo. Una vez que se contaron con todos los elementos necesarios, se procedió a la aplicación de los tratamientos contemplando cada uno de los factores y niveles.



Anexo III. Caracterización fisicoquímica del suelo de huerto de mango

Análisis fisicoquímicos realizados a suelo de huertos de mango de Escuinapa, Sinaloa, utilizado en la simulación de turbidez en agua de hidrogenfriado.

Parámetro	Resultado	Nivel de referencia
pH a 25 °C	6.11	6.6-7.3
Conductividad eléctrica (ds m ⁻¹)	0.13	1-2
Materia orgánica	1.09	1.5
Fósforo P-PO ₄ (ppm) Bray	18.8	10-20
Sodio (ppm)	119.41	250
Potasio (ppm)	442.5	180
Calcio (ppm)	1092.3	1000-2000
Magnesio (ppm)	278.97	60-180
Fierro (ppm)	22.23	9-12
Manganeso (ppm)	17.7	2-12
Zinc (ppm)	1.55	1.3-2.5
Cobre (ppm)	0.645	0.9-1.2
CIC (meq 100 g ⁻¹)	9.389	25
Textura:	Franco Arenosa	-
Arcilla %	13.04	-
Limo %	23.26	-
Arena %	63.68	-

Fuente: Castellanos, 2000 y Molina y Meléndez, 2002