

Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo A. C.

**Biocontrol de Salmonella typhimurium en
superficie de frutos de tomate mediante el
bacteriófago P22**

Por:

Ariel Ramírez Valencia

Unidad Culiacán, Sinaloa

UNIDAD CULIACÁN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
PARA PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE ZONAS
TROPICALES Y SUBTROPICALES

COMO REQUISITO PARCIAL, PARA OBTENER EL
GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

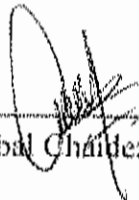
La publicación de comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director o directora de tesis.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

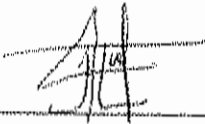
APROBACIÓN

Los miembros del comité asignado para revisar la tesis de Ariel Ramírez Valencia, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dr. Cristóbal Cháidez Quiroz

Director de tesis



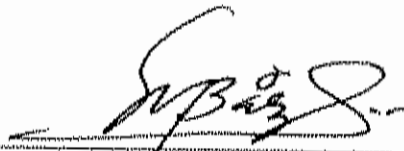
Dra. Josefina León Félix

Asesor



Dr. José Benigno Valdez Torres

Asesor



MC. Manuel Báez Sañudo

Asesor

DEDICATORIA

A Mis padres Agustín Ramírez Castillo y María Elena Valencia Gamez, quienes me guiaron por el camino del estudio para verme convertido en un profesional exitoso.

A los seres que me brindaron su apoyo incondicional, mis hermanos: Agustín Ramírez Valencia y Eduardo Ramírez Valencia.

A mi esposa Ana Karina Angulo Gaxiola por ofrecerme su amor y apoyo durante esta etapa de mi formación.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico que me otorgó durante mi permanencia en el programa de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Unidad Culiacán por haberme aceptado en su programa de maestría.

Al Dr. Cristóbal Cháidez Quiroz, director de tesis, por apoyarme en todo momento en la realización de este trabajo y por compartirme sus conocimientos y experiencia.

A mis asesores Dra. Josefina León Félix, M.C. Manuel Báez Sañudo y Dr. José Benigno Valdez Torrez., por brindarme su atención sin importar la gran cantidad de ocupaciones que tenían.

A mis maestros del CIAD: Dra. Ma. Dolores Muy Rangel, Dr. Raymundo García Estrada, Dr. Tomas Osuna Enciso, Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante M.C. Armando Carrillo Fasio, y M.C. Verónica Pérez Rubio, quienes me transmitieron conocimientos invaluableles.

A los técnicos de laboratorios de microbiología ambiental y de alimentos: QFB, Célida Isabel Martínez Rodríguez, MC, Johana Marcela Soto Beltrán y QFB, José Andrés Medrano Félix, por el apoyo y atención durante la realización del proyecto.

A los técnicos MC. Rosabel Vélez, MC Laura Contreras, Rosalva Contreras, MC. Eduardo Sánchez, IQ. Werner Rubio, IA. Isidro Márquez, por el soporte técnico brindado.

A mis compañeros de maestría Ana Cecilia Lerma, Aida Martínez, Joane Hernández, Jesús Paredes, Saúl Canizales y Domingo Félix.

En general a todo el personal de CIAD Unidad Culiacán por su apoyo durante mi paso por esta institución.

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE ANEXOS	VII
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	4
OBJETIVOS.....	10
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
HIPÓTESIS	11
REVISIÓN DE LA LITERATURA	12
CONSUMO DE FRUTAS Y HORTALIZAS.....	12
IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL TOMATE.....	14
CONTAMINACIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS.....	17
ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.....	19
SALMONELOSIS.....	20
Generalidades del género <i>Salmonella</i>	22
Nomenclatura de <i>Salmonella</i>	24
BROTES DE SALMONELLA ASOCIADOS A FRUTAS Y HORTALIZAS	27
MÉTODOS PARA REDUCIR O ELIMINAR PATÓGENOS DE FRUTAS Y HORTALIZAS	28
Tratamiento hidrotérmico.....	29
Remoción física.....	30
Tratamientos químicos	31
Cloro.....	31
Dióxido de cloro.....	34
Ozono	35
Tratamientos biológicos	37
Manejo poscosecha	37
Alimentos de origen vegetal.....	38
Alimentos de origen animal	40
Manejo precosecha.....	41
Alimentos de origen vegetal.....	41
Alimentos de origen animal	42
Consideraciones en el uso de bacteriófagos para biocontrol.....	42
Bacteriófagos.....	44
Bacteriófago P22.....	46
Replicación del bacteriófago P22.....	46
Ultrafiltración.....	50
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	53
DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	54
JUSTIFICACIÓN.....	55
META.....	56

METODOLOGÍA	57
SELECCIÓN DE FRUTOS DE TOMATE	57
PREPARACIÓN DE LA CEPA HOSPEDERO	58
PROPAGACIÓN DEL BACTERIÓFAGO P22 POR EL MÉTODO DE DOBLE AGAR	60
PROPAGACIÓN DEL BACTERIÓFAGO P22 EN BUFFER DE FOSFATOS	61
INOCULACIÓN DE FRUTOS DE TOMATE CON <i>SALMONELLA</i>	62
ASPERSIÓN DE FRUTOS DE TOMATE CON EL BACTERIÓFAGO P22	63
RECUPERACIÓN Y RECUENTO DE <i>SALMONELLA</i> Y BACTERIÓFAGO P22.....	64
ANÁLISIS EXPERIMENTAL.....	65
RESULTADOS	67
SOBREVIVENCIA DE <i>SALMONELLA</i> EN LA SUPERFICIE DE FRUTOS DE TOMATE	67
Análisis de varianza de la sobrevivencia de <i>Salmonella</i> en la superficie de frutos de tomate a temperatura de 10 y 20°C.....	68
Efectos principales de la sobrevivencia de <i>Salmonella</i> en la superficie de frutos de tomate a temperatura de 10 y 20°C.....	69
Interacciones de la sobrevivencia de <i>Salmonella</i> en la superficie de frutos de tomate a temperatura de 10 y 20°C.....	70
SOBREVIVENCIA DEL BACTERIÓFAGO P22 EN LA SUPERFICIE DE FRUTOS DE TOMATE	71
Análisis de varianza de la sobrevivencia del bacteriófago P22 en la superficie de frutos de tomate a temperatura de 10 y 20°C.....	74
Efectos principales de la sobrevivencia del bacteriófago P22 en la superficie de frutos de tomate a temperatura de 10 y 20°C.....	76
Interacciones de la sobrevivencia del bacteriófago P22 en la superficie de frutos de tomate a temperatura de 10 y 20°C.....	77
CONTROL DE <i>SALMONELLA</i> MEDIANTE BACTERIÓFAGO P22 EN LA SUPERFICIE DE FRUTOS DE TOMATE	78
Análisis de varianza de la reducción de <i>Salmonella typhimurium</i> en la superficie de frutos de tomate a 10 y 20°C.....	80
Efectos principales de la reducción de <i>Salmonella typhimurium</i> en la superficie de frutos de tomate a 10 y 20°C.....	81
Interacciones de la reducción de <i>Salmonella typhimurium</i> en la superficie de frutos de tomate a 10 y 20°C	82
DISCUSIÓN	83
SOBREVIVENCIA DE <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> EN LA SUPERFICIE DE FRUTOS DE TOMATE	83
SOBREVIVENCIA DE BACTERIÓFAGO P22 EN LA SUPERFICIE DE FRUTOS DE TOMATE.....	87
CONTROL DE <i>SALMONELLA</i> MEDIANTE BACTERIÓFAGO P22 EN LA SUPERFICIE DE FRUTOS DE TOMATE	89
CONCLUSIONES	94
SUGERENCIAS.....	95
ANEXOS	96
REFERENCIAS	104

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA, SEGÚN ESQUEMA DE KAUFMAN-WHITE, DE LOS SEROTIPOS DE <i>SALMONELLA</i> MÁS IMPORTANTES.....	24
CUADRO 2. ESPECIES, SUBESPECIES Y SEROTIPOS DE <i>SALMONELLA</i>	25
CUADRO 3. BROTES DE <i>SALMONELLA</i> ASOCIADOS AL CONSUMO DE FRUTAS Y HORTALIZAS.....	27
CUADRO 4. PRODUCTOS RETIRADOS DEL MERCADO DEBIDO A LA PRESENCIA DE <i>SALMONELLA</i>	28
CUADRO 5. BACTERIÓFAGOS UTILIZADOS EN EL CONTROL DE BACTERIAS PATÓGENAS EN POSCOSECHA.....	38
CUADRO 6. BACTERIÓFAGOS UTILIZADOS EN EL CONTROL DE BACTERIAS PATÓGENAS EN PRECOSECHA.....	41
CUADRO 7. VENTAJAS DE BIOCONTROL MEDIANTE BACTERIÓFAGOS.....	42
CUADRO 8. DESVENTAJAS DE BIOCONTROL MEDIANTE BACTERIÓFAGOS.....	43
CUADRO 9. GRUPOS Y GÉNEROS DE BACTERIÓFAGOS.....	45
CUADRO 10. ANOVA DE SOBREVIVENCIA DE <i>SALMONELLA</i> EN FRUTOS DE TOMATE A 10 Y 20°C.....	69
CUADRO 11. ANOVA DE LA SOBREVIVENCIA DEL BACTERIÓFAGO P22 EN FRUTOS DE TOMATE A 10 Y 20°C.....	75
CUADRO 12. ANOVA DE LA REDUCCIÓN DE <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> EN FRUTOS DE TOMATE A 10 Y 20°C.....	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CONSUMO PERCAPITA DE FRUTAS Y HORTALIZAS FRESCAS EN EUA DE 1970 A 2005.....	12
FIGURA 2. CONSUMO PERCAPITA DE TOMATE EN EUA DE 1970 A 2005.....	13
FIGURA 3. PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE TOMATE	14
FIGURA 4. PRINCIPALES PAÍSES EXPORTADORES DE TOMATE DE CALIDAD	15
FIGURA 5. PRINCIPALES ESTADOS PRODUCTORES DE TOMATE EN MÉXICO.....	16
FIGURA 6. PELIGROS PARA LA INOCUIDAD DE LAS FRUTAS Y HORTALIZAS FRESCAS DURANTE LA CADENA ALIMENTICIA	17
FIGURA 7. MECANISMO POR EL CUAL LAS FRUTAS Y HORTALIZAS SE CONTAMINAN	18
FIGURA 8. INCIDENCIA DE FIEBRE TIFOIDEA Y SALMONELOSIS NO TIFOIDEA EN ESTADOS UNIDOS DEL PERIODO DE 1920 A 1995	21
FIGURA 9. ESTIMADO ANUAL DE LOS COSTOS DE SALMONELOSIS EN ESTADOS UNIDOS	22
FIGURA 10. EFECTO DE pH Y TEMPERATURA SOBRE LA CANTIDAD DE CLORO LIBRE	32
FIGURA 11. ESTRUCTURA BACTERIÓFAGO P22	46
FIGURA 12. SITIO DE RECONOCIMIENTO P22- <i>SALMONELLA</i>	47
FIGURA 13. CICLO DE VIDA DEL BACTERIÓFAGO P22	48
FIGURA 14. MEMBRANA DE ULTRAFILTRACIÓN	50
FIGURA 15. SISTEMA DE ULTRAFILTRACIÓN.....	58
FIGURA 16. INOCULACIÓN DE FRUTOS DE TOMATE.....	63
FIGURA 17. POBLACIÓN DE <i>SALMONELLA</i> EN FRUTOS DE TOMATE A 10°C	67
FIGURA 18. POBLACIÓN DE <i>SALMONELLA</i> EN FRUTOS DE TOMATE A 20°C	68
FIGURA 19. EFECTOS PRINCIPALES DE LA SOBREVIVENCIA DE <i>SALMONELLA</i>	69
FIGURA 20. INTERACCIONES DE LA SOBREVIVENCIA DE <i>SALMONELLA</i>	71
FIGURA 21. POBLACIÓN DEL BACTERIÓFAGO P22 EN FRUTOS DE TOMATE A 10°C.....	72
FIGURA 22. POBLACIÓN DE BACTERIÓFAGO P22 EN FRUTOS DE TOMATE A 20°C.....	74
FIGURA 23. EFECTOS PRINCIPALES DE LA SOBREVIVENCIA DEL BACTERIÓFAGO P22	76
FIGURA 24. INTERACCIONES DE LA SOBREVIVENCIA DEL BACTERIÓFAGO P22	78

FIGURA 25. REDUCCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> EN FRUTOS DE TOMATE A 10°C	79
FIGURA 26. REDUCCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> EN FRUTOS DE TOMATE A 20°C	80
FIGURA 27. EFECTOS PRINCIPALES DE LA SOBREVIVENCIA DE <i>SALMONELLA</i> <i>TYPHIMURIUM</i> EN FRUTOS DE TOMATE A 10 Y 20°C	81
FIGURA 28. INTERACCIONES DE LA REDUCCIÓN DE <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> EN FRUTOS DE TOMATE A 10 Y 20°C	82

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. PREPARACIÓN DE MEDIOS	96
ANEXO 2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	98
ANEXO 3. ABREVIATURAS	99
ANEXO 4. DATOS GENERALES DE LOS EXPERIMENTOS	102

RESUMEN

La frecuencia de brotes asociados a frutas y hortalizas, es un indicador de las limitaciones que presentan los sistemas de desinfección actuales, por ello la necesidad de métodos alternativos de desinfección, que permitan aumentar la calidad microbiológica de frutas y hortalizas.

En años recientes el uso de agentes biológicos se ha perfilado como un método efectivo, que permite una protección permanente. A la fecha existen trabajos que demuestran la efectividad de bacteriófagos en manzana y melón precortados, sin embargo no existe información que demuestre la efectividad de bacteriófagos contra patógenos en superficie de frutos completos.

Por tal motivo se realizó una investigación experimental a nivel laboratorio para determinar la efectividad del bacteriófago P22 en la supresión de *Salmonella typhimurium*, así como la sobrevivencia del mismo y de la bacteria hospedero, inoculados en frutos de tomate. Para alcanzar el objetivo los frutos fueron clasificados en tres grupos. El grupo 1, estuvo integrado por 24 frutos los cuales se inocularon con *Salmonella* a una concentración de 4×10^9 UFC/mL y posteriormente fueron asperjados con el bacteriófago P22 a una concentración de 1×10^{11} U FP/mL; el grupo 2, integrado por 24 frutos, inoculados con *Salmonella* a una concentración de 4×10^9 UFC/mL y asperjados con buffer estéril (fosfato de potasio monobásico 0.01 M, pH 7.2); y el grupo 3, integrado por 24 frutos asperjados con 1×10^{11} UFP/mL del bacteriófago P22. Los grupos de frutos se evaluaron a dos temperaturas, almacenamiento (10°C) y mercadeo (20°C), para cada temperatura se realizaron dos experimentos. Los frutos se analizaron cada 24 h durante 7 días, para cada tiempo de contacto, se tomaron de manera aleatoria 3 frutos de cada grupo y se colocaron de manera independiente en una bolsa de plástico estéril conteniendo 100 mL de buffer de fosfatos (0.01 M, pH 7.2), se enjuagó frotando manualmente durante 1 minuto. Del enjuagado se realizaron diluciones decimales (1:100, 1:1000, 1:10000) para cuantificar el bacteriófago P22 y *Salmonella typhimurium*, empleando las técnicas de doble agar y extensión en placa respectivamente.

hacrioflogo P22. Los grupos de frutos se dividieron a dos temperaturas, 11°C y 20°C, para cada temperatura se elaboraron dos repeticiones. Los frutos se analizaron cada 24 h durante 7 días, por cada tiempo de contacto, se tomaron de manera aleatoria 3 frutos de cada grupo y se colocaron de manera independiente en una bolsa de plástico estéril conteniendo 100 mL de buffer de fosfatos (0.01 M, pH 7.2), se enjuagó repetidamente durante 1 minuto. Después de enjuagado se realizaron diluciones decimales (1:100, 1:1000, 1:10000) para cuantificar el bacteriófago P22 y *Salmonella typhimurium*, empleando las técnicas de doble agar y extensión en placa selectivamente,

Los resultados mostraron que *Salmonella typhimurium* sobrevivió hasta 7 días en la superficie del fruto de tomate a temperatura de refrigeración (10°C), y aumentó su población en 2.22 Log₁₀ a temperatura de refrigeración (20°C).

Al analizar la sobrevivencia de bacteriófago P22 en superficie de frutos de tomate (muestras que sobrevive con títulos elevados (1×10^1 UFC/tomate) durante 7 días a ambas temperaturas de refrigeración (10°C) y refrigeración (20°C). La mayor concentración de bacteriófago se presentó en el grupo de frutos inoculados con (*Salmonella* + bacteriófago) con respecto a los frutos que sólo fueron asperjados con el bacteriófago. Al analizar la reducción de *Salmonella typhimurium* por efecto directo del bacteriófago P22 en frutos de tomate, encontramos una interacción positiva en ambas temperaturas (almacenamiento y refrigeración); en consecuencia se observó una reducción mixina de 2.22 Log₁₀ UFC/tomate en las 168 horas con respecto a la concentración inicial del control. A la hora de

introducción de (20°C) en condiciones de reducción de \log_{10} de 10^7 UFC/gramo en la. 168 horas con respecto a la concentración inicial del control. Por lo que se concluye que el bacteriófago tiene la capacidad de sobrevivir y actuar contra *Salmoneella typhimurium* inoculada en superficie de frutos de tomate.

INTRODUCCIÓN

En años recientes, la frecuencia de brotes asociados al consumo de frutas y hortalizas se ha elevado, particularmente como resultado del incremento en la demanda por productos mínimamente procesados (Beuchat, 1996), cambios en los hábitos alimenticios de la población, mejores programas de vigilancia epidemiológica (Beuchat, 2002) e importación de productos con bajos estándares de calidad e inocuidad microbiológica que ponen en riesgo la salud de los consumidores (Hedberg *et al.*, 1993).

Los microorganismos comúnmente asociados a infecciones por el consumo de productos frescos son: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Shigella* spp., así como *Cyclospora cayentanensis*, norovirus, virus de hepatitis A, *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*, DeWaal *et al.*, (2001). Estos microorganismos, generan en Estados Unidos de Norte América (EUA) 76 millones de enfermos por año, de los cuales 325,000 son hospitalizados y 5,000 mueren. El costo económico generado es igualmente grave alcanzando la suma de 50,000 millones de dólares por año (Mead *et al.*, 1999).

Se estima que el género *Salmonella* por sí sólo causa, en EUA 2 millones de casos infecciosos; 15,000 hospitalizaciones y 500 muertes (Altekruse *et al.*, 1997). La salmonelosis se asocia principalmente al consumo de productos de origen animal.

Sin embargo, se ha demostrado que existe un aumento de brotes relacionados con frutas y hortalizas como mango, fresa, sandía, melón y tomate.

En estos frutos, la contaminación con *Salmonella*, puede ocurrir durante el cultivo, cosecha, procesamiento y distribución (Beuchat, 1996). Entre los factores que contribuyen a la contaminación de frutas y hortalizas se encuentran procesos inadecuados en las labores de cultivo, condiciones inapropiadas durante empaque, higiene deficiente de los trabajadores, prácticas deficientes de sanitización y uso de agua de riego contaminada (Chaidez, 2002).

Espinoza-Medina *et al.*, (2006), realizaron un estudio en agua de uso agrícola en el estado de Sonora, reportaron la presencia de *Salmonella* en el 23.5 % de las muestras analizadas. Por su parte, Chaidez *et al.*, (2004), reportan una incidencia de 14.7 % en 70 muestras de agua de uso agrícola del valle de Culiacán.

Si bien las bacterias aisladas en Culiacán, no han sido causa de brotes infecciosos, su presencia ocasiona un riesgo potencial para un área agrícola que produce y procesa productos de alta calidad. El riesgo potencial se justifica al conocer que los productos mexicanos como melón, cilantro y tomate se han visto implicados en brotes de Salmonelosis. Mohle-Boetani *et al.*, (1999) reportaron a *Salmonella saphra* como la causante de un brote diarreico por el consumo de melón Cantaloupe procedente de Altamirano, Guerrero, donde 24 personas del estado de California resultaron infectadas requiriendo hospitalización 6 de ellas. El Centro de Control y Prevención de Enfermedades en EUA (CDC, siglas en inglés) (CDC, 2002) reportó brotes

atribuidos a *Salmonella poona* en varios estados del país y Canadá, asociados al consumo de melón Cantaloupe de origen mexicano. Campbell *et al.*, (2001), reportaron un brote de *Salmonella thompson* que afectó a 35 personas, el brote fue asociado al consumo de cilantro fresco proveniente de México. EL CDC (2005b) reportó brotes de *Salmonella*, que afectó a 561 personas en la unión americana y Canadá, el brote fue asociado al consumo de tomate Roma. Una constante alrededor de estos brotes es la ineficiencia de los sistemas de desinfección que provocan la persistencia de *Salmonella* en frutas y hortalizas.

Los sistemas de desinfección mayormente empleados para reducir o eliminar patógenos incluyen métodos: físicos, químicos y biológicos. Cada método posee ventajas y desventajas, sobre su eficacia, sin embargo, todos coinciden en que la eliminación de los microorganismos es incompleta (Parish *et al.*, 2003).

En relación a los métodos físicos se encuentra, el uso de agua caliente que se emplea como tratamiento de mitigación en algunas frutas y hortalizas para el control de patógenos. Sin embargo, existen efectos adversos sobre el color, textura y sabor limitan la utilidad de este tratamiento, el agua caliente puede ser empleada como un sanitizante de productos frescos, especialmente para productos frescos cortados o jugos sin pasteurizar donde la piel externa no comestible es retirada durante el procesamiento. Otra desventaja es que el tratamiento hidrotérmico también genera un diferencial de temperatura permitiendo la internalización de patógenos a los frutos.

Otro método físico es el cepillado, que involucra movimientos oscilatorios que restriegan las superficies para la remoción física de residuos del suelo y microorganismos. Esta operación se realiza comúnmente en conjunto con un detergente seguido de un enjuague con agua potable Parish *et al.*, (2003). Este método es útil en frutos como chile pimiento y melón, debido a que restos de agua en los frutos facilitan el desarrollo de hongos.

En relación a los métodos químicos el representante más importante por su amplio uso es el cloro en sus formas líquidas (hipoclorito de sodio) y sólidas (hipoclorito de calcio), es un método químico de sanitización comúnmente empleado en empaques agrícolas, ya que es de bajo costo; y reduce el 99% de las poblaciones microbianas presentes en las superficies de los frutos (Beuchat *et al.*, 2001; Sapers *et al.*, 2001). El cloro tiene la desventaja de perder actividad al entrar en contacto con materia orgánica, incrementarse la temperatura, exposición a la luz y contacto con metales. En este sentido, en los últimos años se ha incrementado la investigación en la búsqueda de alternativas para reducir o eliminar patógenos que puedan ayudar a comercializar productos inocuos (Xu, 1999).

Existen diversos reportes publicados sobre el uso de agentes biológicos para prevenir el crecimiento de patógenos humanos en productos frescos. Como estrategia de manejo poscosecha se ha utilizado la aplicación de microorganismos para prevenir la proliferación de patógenos, este método se basa en la lisis del patógeno, competencia por espacio físico y nutrientes o bien, producción de compuestos que dañan al patógeno. Entre los agentes biológicos utilizados en el manejo poscosecha para el

control de bacterias patógenas se encuentran los bacteriófagos, los cuales son parásitos obligados de las bacterias (Greer, 2002). Existen diversos reportes que señalan la efectividad de bacteriófagos para la supresión de *Salmonella* en los sectores productivos: avícolas, agrícolas y de procesamiento de alimentos.

En el sector avícola, Sklar y Joerger (2001), utilizaron bacteriófagos para combatir la infección por *Salmonella* en gallinas, reportando reducciones de 0.3 a 1.3 Log₁₀. Goode *et al.*, (2003), contaminaron experimentalmente la piel de gallinas con *Salmonella* y reportaron una reducción de 2 Log₁₀, mediante la aplicación de bacteriófagos.

En el sector agrícola, Pao *et al.*, (2004), contaminaron de manera experimental germinados con *Salmonella* y utilizaron bacteriófagos para su control, reportaron una reducción de 1.5 Log₁₀ al utilizar mezclas de bacteriófagos.

En el sector de procesamiento de alimentos, Modi *et al.*, (2001) estudiaron el efecto de bacteriófagos en la supresión de *Salmonella* inoculada en queso Cheddar, encontrando reducciones de 1 a 2 Log₁₀. Leverentz *et al.*, (2001), trabajaron con melón y manzana precortados, utilizaron una mezcla de 4 fagos (SCPLX-1) líticos específicos para *Salmonella enteritidis*, logrando reducciones de 3.5 Log₁₀ a temperaturas de 5 y 10°C.

Diversos estudios claramente sustentan la efectividad de bacteriófagos en la supresión de patógenos en carne, frutos precortados y quesos, inclusive instituciones

reguladoras como FDA, que aprobó en el 2006 el uso de bacteriófagos en alimentos listos para su consumo; sin embargo, su efectividad en frutos completos no ha sido demostrada. Razón por la cual, el propósito de esta investigación fue determinar la efectividad del bacteriófago P22 en la reducción de *Salmonella typhimurium* inoculada en frutos de tomate; así como la sobrevivencia de cada uno de los microorganismos implicados.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la efectividad y persistencia del bacteriófago P22 en la reducción de *Salmonella typhimurium* inoculada en frutos de tomate.

Objetivos específicos

- Determinar la efectividad del bacteriófago P22 como biocontrol de *Salmonella typhimurium*.
- Evaluar la sobrevivencia de *Salmonella typhimurium* y bacteriófago P22 en superficie de frutos de tomate a temperaturas de almacenamiento (10°C) y mercadeo (20°C).
- Establecer la temperatura (10 y 20°C) donde se obtiene una mayor reducción de *Salmonella typhimurium* por efecto lítico del bacteriófago P22 en superficie de frutos de tomate.
- Determinar el tiempo de contacto en el que se obtiene la mayor reducción de *Salmonella typhimurium* por efecto lítico del bacteriófago P22 en superficie de frutos de tomate.

HIPÓTESIS

- El bacteriófago P22 es un agente efectivo para el biocontrol de *Salmonella typhimurium* en superficie de frutos de tomate

- *Salmonella typhimurium* y bacteriófago P22 tiene la capacidad de sobrevivir durante tiempo prolongado en superficie de frutos de tomate a temperaturas de almacenamiento (10°C) y mercadeo (20°C)

- A menor temperatura se obtendrá una mayor reducción de *Salmonella typhimurium* por efecto lítico del bacteriófago P22 en superficie de frutos de tomate

- La reducción de *Salmonella* por efecto del bacteriófago P22 aumenta en función del tiempo de contacto

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Consumo de frutas y hortalizas

Las frutas y hortalizas son parte esencial en la dieta del ser humano, su importancia e influencia en una dieta saludable es indiscutible. Países como México, Estados Unidos y Canadá; así como diversas entidades internacionales como la Administración de Drogas y Fármacos de Estados Unidos (FDA, siglas en inglés) y OMS (Organización Mundial de Salud), realizan recomendaciones dietéticas que involucren una menor ingesta de grasas (específicamente las saturadas) y el colesterol, así como mayor consumo de frutas y hortalizas frescas (cinco o más porciones diarias) (FDA, 1997). El reconocimiento de la importancia del consumo habitual de frutas y hortalizas, debido a su valor nutrimental y el notable incremento en la disponibilidad, en cualquier época del año, lo cual ha contribuido en un consumo considerablemente mayor de estos productos. En los Estados Unidos se estima que el consumo de frutas y hortalizas frescas se incrementó en un 19.7 y un 22.3 % respectivamente de 1970 a 2005, (Figura 1).

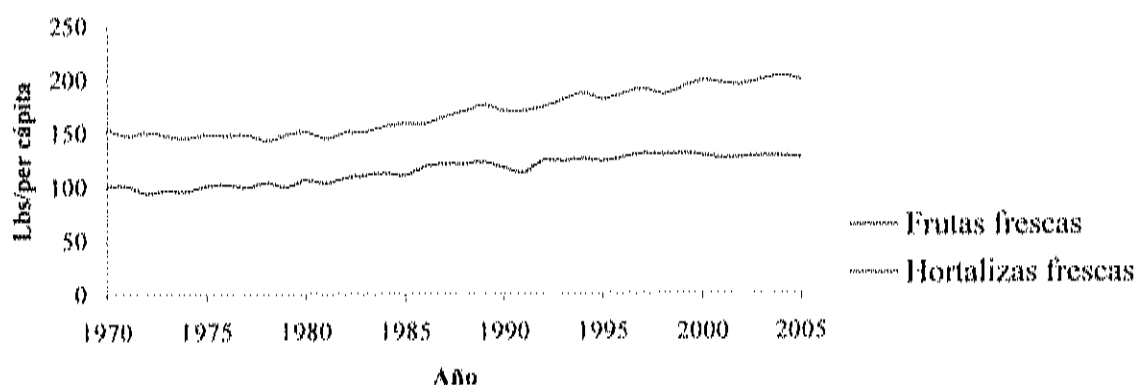


Figura 1. Consumo percapita de frutas y hortalizas frescas en EUA de 1970 a 2005 (ERS, 2006)

Si bien, el beneficio para la salud que resulta del consumo habitual de frutas y hortalizas frescas esta demostrado, existe una creciente proporción de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos que han sido relacionadas con el consumo de frutas y hortalizas frescas. De 1973 a 1979 sólo se incremento en un 2% el número de brotes ocasionados por el consumo de frutas y hortalizas; sin embargo, de 1992 al 2005 el número de brotes ocasionados por el consumo de frutas y hortalizas aumentó de 25 a 54 brotes, lo que representa un incremento del 116%; lo que ha puesto en entredicho la inocuidad de frutas y hortalizas (CDC, 1992; DeWaal *et al.*, 2001; CDC, 2005a).

Una de las hortalizas de mayor consumo en todo el mundo y la de mayor valor económico es el tomate, su consumo per cápita en los Estados Unidos se ha incrementado en un 76 % de 1970 al 2005 (Figura 2).

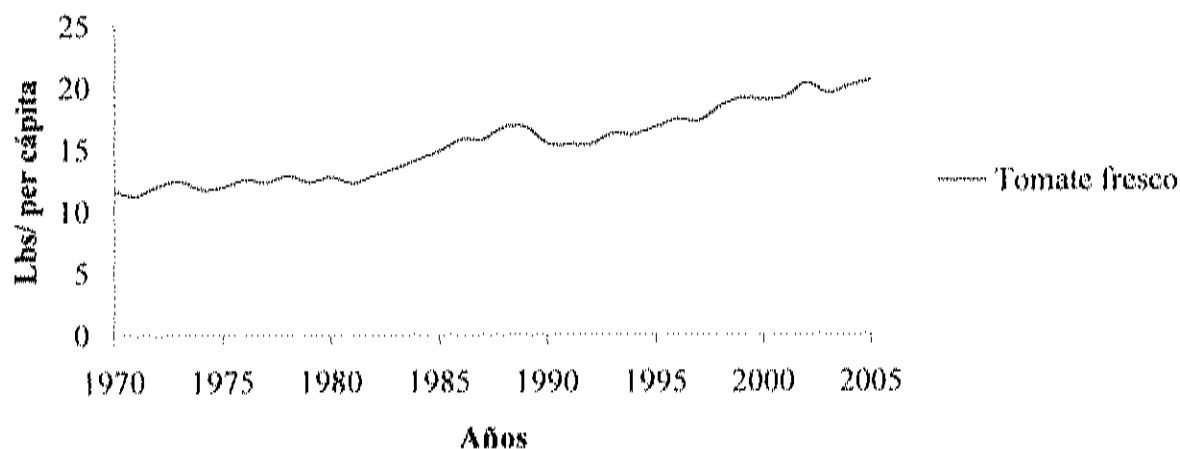


Figura 2. Consumo percapita de tomate en EUA de 1970 a 2005 (ERS, 2006)

Importancia económica del tomate

El tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*) pertenece a la familia de las solanáceas. Es una planta herbácea y perenne, sin embargo debido a las condiciones climatológicas, se cultiva casi universalmente como planta anual. El origen del género *Lycopersicon* se localiza en la región andina que se extiende desde el sur de Colombia hasta el norte de Chile.

A nivel mundial la producción de tomate se sitúa en 125 millones de toneladas métricas, teniendo como principales productores a China, Union Europea, Estados Unidos, Turquía, Egipto e India (Figura 3).

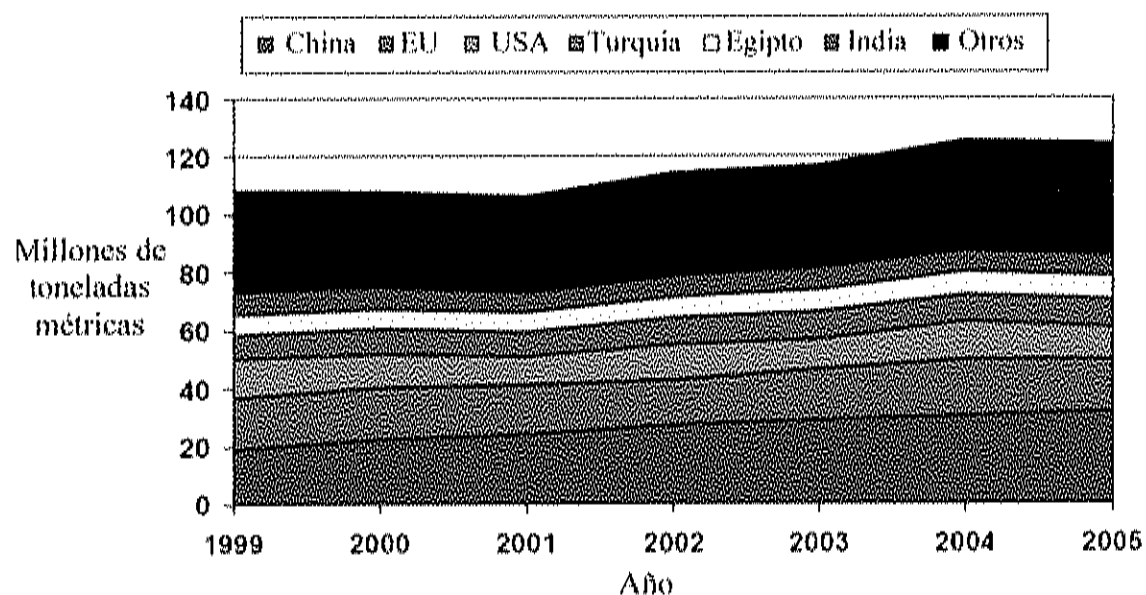


Figura 3. Principales países productores de tomate (USDA, 2007)

México se sitúa en el décimo lugar en producción de tomate; sin embargo, en relación a la calidad de tomate exportado, se sitúa en primer lugar seguido por Turquía, Estados Unidos, Europa, Canadá y China (Figura 4).

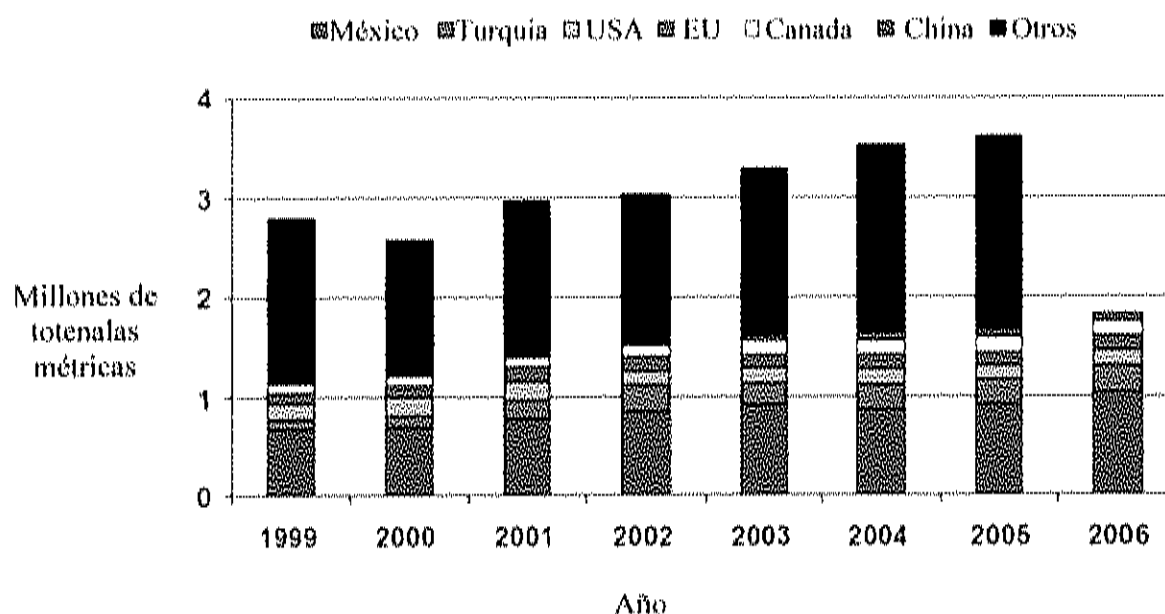


Figura 4. Principales países exportadores de tomate de calidad (USDA, 2007)

Dichas exportaciones generan ganancias para México del orden de los 304 millones de dólares anuales, siendo una fuente importante de divisas y constituyendo una actividad de gran importancia económica ya que representa una importante fuente de trabajo por todas las actividades que involucren su producción, desde labores de cultivo y cosecha, hasta la selección, empaque y venta del producto (CAADES-CIDH, 2007).

Los principales productores del país son los estados de Sinaloa, Baja California, San Luis Potosí, Michoacán, Baja California Sur, Jalisco y Tamaulipas (Figura 5).

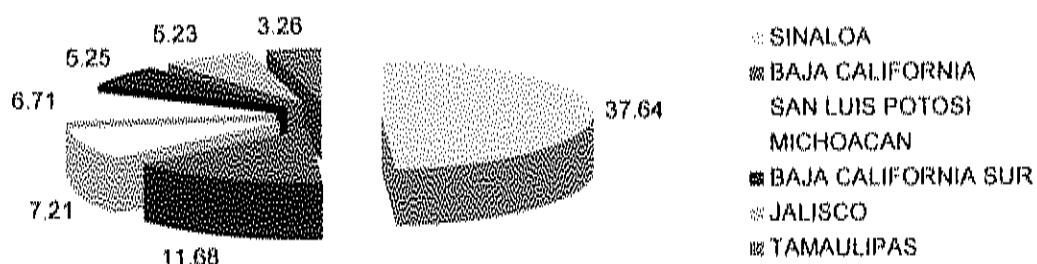


Figura 5. Principales estados productores de tomate en México (SIAP, 2005)

La creciente tendencia hacia la globalización del comercio mundial ha estimulado un interés destacable en el desarrollo de sistemas de calidad e inocuidad convincentes y más eficientes que permitan reducir la contaminación de frutas y hortalizas en cualquiera de las etapas de la cadena productiva, y así comercializar productos inocuos, que garanticen la salud del consumidor.

Contaminación de frutas y hortalizas

El *Codex Alimentarius* define un peligro como todo agente biológico, químico o físico presente en el alimento, o una propiedad de éste, que pueda provocar un efecto nocivo para la salud. Los peligros para la inocuidad de las frutas y hortalizas frescas pueden estar presentes en diferentes puntos de la cadena alimenticia, desde la producción hasta el consumo (Figura 6).

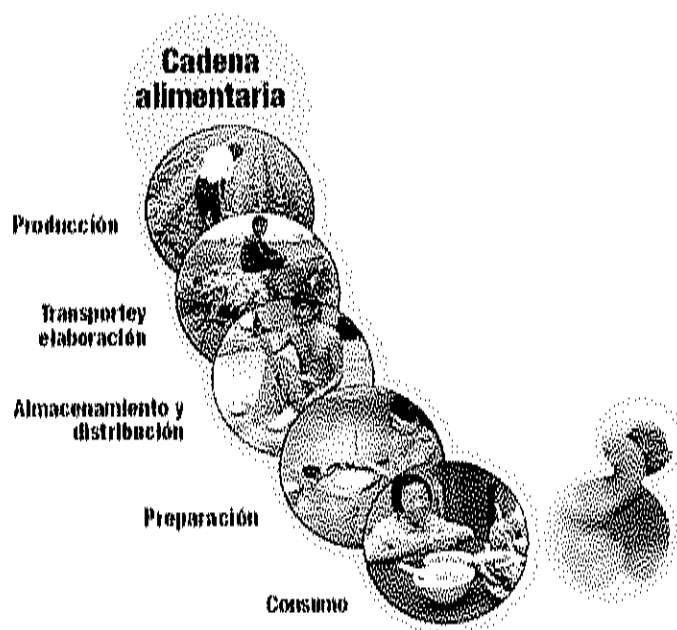


Figura 6. Peligros para la inocuidad de las frutas y hortalizas frescas durante la cadena alimenticia (FAO, 2006)

Diferentes factores contribuyen a la presencia de microorganismos patógenos asociados a frutas y hortalizas, incluyendo la contaminación de las aguas de riego con heces fécales de humanos y animales; baja eficiencia en los sistemas de desinfección utilizados para el control de microorganismos; procesos inadecuados en

los campos de cultivo; condiciones inapropiadas durante empaque; higiene deficiente de los trabajadores; y el mal manejo durante almacenamiento y transporte (Figura 7).

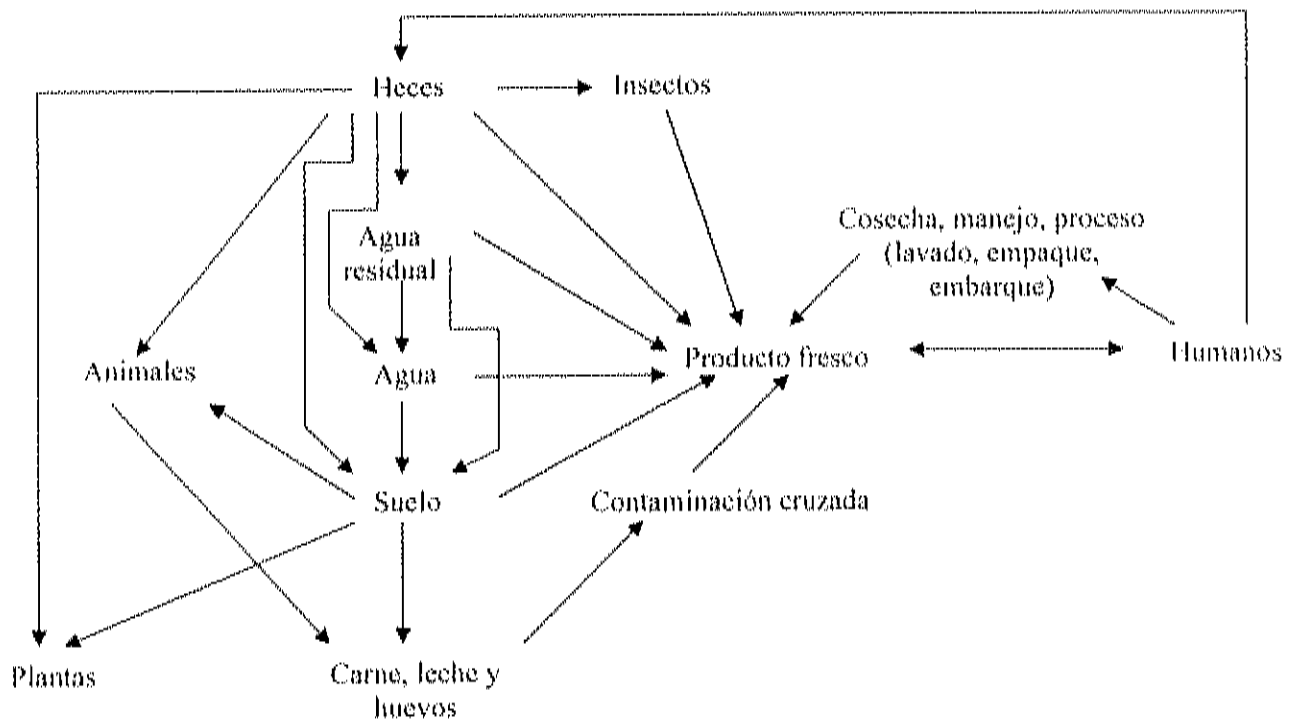


Figura 7. Mecanismo por el cual las frutas y hortalizas se contaminan (Beuchat, 1996)

Dentro de los microorganismos que pueden contaminar los productos frescos y causar enfermedades en los seres humanos se pueden mencionar algunos protozoarios, virus y bacterias (Beuchat, 1996). Cuando estos microorganismos contaminan frutos y son consumidos, se originan las enfermedades de transmisión alimentaria.

Enfermedades transmitidas por alimentos

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) son aquellas que se originan por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva. Sus síntomas más comunes son diarreas y vómitos, pero también se pueden presentar otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, entre otros (González, 2005).

Las ETAs constituyen hoy, un problema de salud a nivel mundial, no sólo en los países en vías de desarrollo, sino también, en aquellos desarrollados. Han surgido como una causa importante de morbi-mortalidad a nivel mundial. Se han descrito alrededor de 250 agentes causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (Vásquez y Cabral, 2001; González, 2005). En Estados Unidos de América se estima en 76 millones los casos anuales de ETAs, que significan 325,000 hospitalizaciones y 5,000 muertes, lo cual representa costos elevados dentro de los gastos en salud (Mead *et al.*, 1999).

Diversos factores ambientales, humanos, comerciales y culturales han influido para que cambien los escenarios en que estas enfermedades se manifestaban, así como, los alimentos involucrados en ellas, constituyéndose en nuevos desafíos para la salud pública. Cada vez son más frecuentes los brotes de enfermedades gastrointestinales relacionados con la ingesta de frutas y hortalizas como sandía, lechuga, alfalfa, melón y tomate (Harris *et al.*, 2003). A pesar de la existencia de recomendaciones

para la producción de alimentos con la mayor calidad microbiológica posible, la contaminación microbiológica sigue siendo elevada, prueba de ello, es el incremento en el número de brotes asociados a frutas y hortalizas (CDC, 2005).

Entre los patógenos ligados a frutas y hortalizas que se consumen crudos, se encuentran tanto bacterias, parásitos y virus. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETAs se encuentran especies de los géneros *Campylobacter*, *Escherichia* y *Salmonella* (González, 2005). Esta última, causante de salmonelosis.

Salmonelosis

La salmonelosis, es una enfermedad infectocontagiosa producida por el género *Salmonella*. Es considerada una enfermedad de importancia en salud pública, debido al impacto socioeconómico que ocasiona tanto en los países en desarrollo, como en los desarrollados. Es transmitida por alimentos frescos y procesados. Afecta a centenares de personas y, aunque la salmonelosis puede ser causada por cualquiera de los más de 2,500 serotipos reportados hasta hoy (Weill *et al.*, 2006), los que con mayor frecuencia se aíslan en México son *Enteritidis* y *Typhimurium* (Gutiérrez *et al.*, 2000), afectando a todos los grupos de edad, con mayor incidencia en los extremos de la vida: en menores de cinco años y mayores de 60 años de edad, que son los grupos más vulnerables (SSA, 1999; SSA-DGE, 1994). Tiene una incidencia

estacional, por lo que el canal endémico registra aumento de casos a partir del mes de mayo, con pico máximo en Julio (Blaser *et al.*, 1992).

Desde la década de los ochenta, la incidencia de salmonelosis de origen alimentario ha aumentado considerablemente en los Estados Unidos (Figura 8). Este incremento es el resultado de una combinación de factores relacionados con el desarrollo en la industrialización en todas las fases de producción de alimentos, cambios en la práctica del manejo de los alimentos, así como el almacenamiento, distribución y preparación de los mismos. Estos cambios han tenido como consecuencia nuevos problemas en la higiene de los alimentos al originar una fácil diseminación de *Salmonella*, así como de otros gérmenes patógenos en los alimentos (Tauxe, 1997).

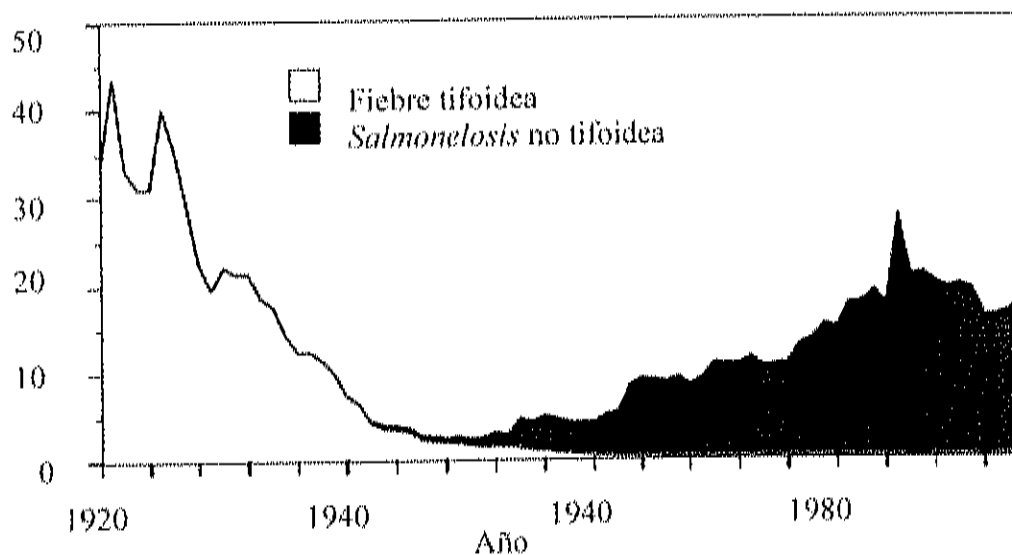


Figura 8. Incidencia de fiebre tifoidea y Salmonelosis no tifoidea en Estados Unidos del periodo de 1920 a 1995 (Tauxe, 1997)

En México, en el periodo que comprende de 1994 a 1998, las notificaciones de casos por salmonelosis registran un incremento de 100,342 casos, en 1994, a 215.155, en

1998 (tasa de 111.21 y 223.53 por 100,000 habitantes, respectivamente). En cuanto a frecuencia con relación a los meses del año, ésta se intensifica a partir de los meses de abril y mayo alcanzando un pico en julio, con una disminución en septiembre y octubre. Los estados más afectados han sido Tabasco, Coahuila, Chiapas y Quintana Roo (SSA-DGE, 1998).

Esta enfermedad afecta a todos los grupos de edad, con mayor incidencia en menores de cinco años y mayores de 60 años de edad, que son los grupos más vulnerables. La morbilidad y los costos concomitantes de la infección por *Salmonella* suelen ser altos. El servicio de investigación económica de los Estados Unidos (ERS, 2006), estimó el costo anual originado por *Salmonella* en \$2,467,322,866 dólares, contemplando gastos médicos, pérdidas por productividad y muerte (Figura 9).

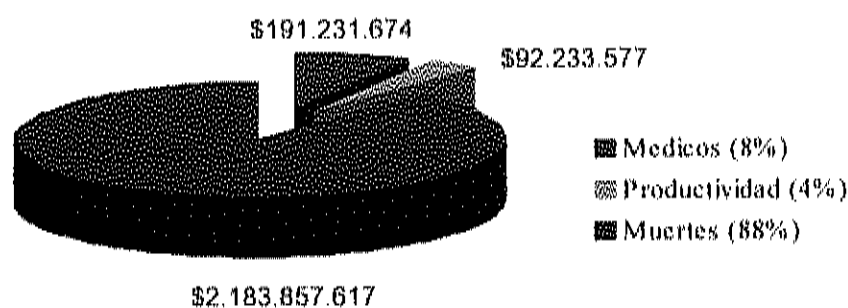


Figura 9. Estimado anual de los costos de salmonelosis en Estados Unidos

Generalidades del género *Salmonella*

El género *Salmonella* está constituido por bacilos cortos Gram negativos no formadores de esporas, anaerobios facultativos, relacionados morfológicamente y fisiológicamente con otros géneros de la familia Enterobacteriaceae a la cual

pertenece. Con la excepción de la serovariedad *Gallinarum* y *Pollorum*, son móviles gracias a sus flagelos peritricos. Estos microorganismos crecen en un amplio rango de temperatura (7°C-48°C) a un pH entre 4 y 8 y con actividades de agua (aw) por debajo de 0.933 (Tortora *et al.*, 2001; Uribe *et al.*, 2006). Son microorganismos que utilizan los azúcares por fermentación con producción de gas; usualmente son citrato de Simmons positivo (*Salmonella typhi* es una excepción importante que no produce gas y es citrato de Simmons negativo); KCN (cianuro de potasio) negativo (excepto subgénero IV); lisina decarboxilasa usualmente positiva (con excepción de *Salmonella paratyphi* A), catalasa positivo, oxidasa negativo, reducen los nitratos a nitritos y son ureasa negativos (Holt *et al.*, 1994; Espigares y Álvarez, 2002).

Salmonella se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente, debido a la diversidad de hospederos, los cuales incluyen animales domésticos y silvestres de diversos tipos: (porcinos, bovinos, aves silvestres y de corral, roedores, iguanas, tortugas, perros y gatos). Respecto a reservorios secundarios se incluyen agua de pozos, y suelo, lugares donde los microorganismos sobreviven durante periodos muy largos, pero no se multiplican normalmente como en los sistemas digestivos de sus hospederos. Estas bacterias pueden resistir la deshidratación durante un tiempo muy prolongado, tanto en las heces como en los alimentos para consumo humano o animal (Weng *et al.*, 2003; Uribe *et al.*, 2006). Otra característica de *Salmonella* es su capacidad para generar biofilmes; Annous *et al.*, (2005), inocularon artificialmente melón Cantaloupe con *Salmonella* y lo almacenaron a temperaturas de 10 y 20°C. Monitorearon la formación de biofilmes mediante microscopia electrónica de barrido, analizando cortes de melón a las 2, 24, 48, 72 y 144 h

postinoculación. Encontraron la presencia de materia fibrilar a las dos horas a 20°C y después de 24 h a 10 y 20°C las células se encontraban embebidas de un polímero extracelular característico de un biofilme.

Nomenclatura de *Salmonella*

La clasificación y nomenclatura del género *Salmonella* es aún, hoy en día, muy controvertida, utilizándose distintos sistemas para referirse a los miembros de este género. La terminología introducida por White en 1929 y modificada por Kauffman en 1966, establecía un tipo específico para cada cepa de *Salmonella* basado en la identificación serológica de antígenos somáticos (O) y flagelares (H), incluyendo otras propuestas taxonómicas fundamentales en características bioquímicas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición antigénica, según esquema de Kaufman-White, de los serotipos de *Salmonella* más importantes (Espigares y Álvarez, 2002)

	Scrogrupo	Antígenos Somáticos (O)	Antígenos Flagelares Fase 1	Antígenos Flagelares Fase 2
<i>S. paratyphi</i>	A	<u>1</u> ,2,12	a	[1,5]
<i>S. paratyphi</i>	B	<u>1</u> ^a ,4,[5] ^b ,12	b	1,2
<i>S. typhimurium</i>	B	<u>1</u> ,4,[5],12	i	1,2
<i>S. heidelberg</i>	B	<u>1</u> ,4,[5],12	r	1,2
<i>S. paratyphi</i>	C1	6,7,[VI]	c	1,5
<i>S. virchow</i>	C1	6,7	r	1,2
<i>S. hadar</i>	C2	6,8	z ₁₀	e, n, x
<i>S. newport</i>	C2	6,8	e, h	1,2
<i>S. typhi</i>	D1	9,12,[VI]	d	-
<i>S. enteritidis</i>	D1	<u>1</u> ,9,12	g, m	[1,7]

^a Los factores somáticos subrayados indican que su presencia está ligada a conversión lisogénica

^b Puede estar ausente

Atribuyendo en un inicio a cada tipo el nombre del lugar donde se aisló por primera vez. La propuesta de Kaufman implicaba que cada tipo era en realidad una nueva especie. La primera lista publicada contenía unos 20 nombres, hoy el número de serotipos sobre pasa los 2500.

Un estudio definitivo en la taxonomía de *Salmonella* fue informado por Crosa *et al.*, 1973 quienes demostraron mediante estudios de hibridación ADN-ADN que todos los serotipos de *Salmonella* se relacionaban altamente y se debían considerar como una única especie. Posteriormente Reeves *et al.*, (1989), con nuevos análisis de hibridación ADN-ADN describieron una segunda especie, *Salmonella bongori*, antes conocida como subespecie. Frecuentemente se utiliza la nomenclatura recomendada por Brenner *et al.*, (2000), la cual acorde con los hallazgos genéticos describe dos especies distintas: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica* dividida esta última en 6 subespecies que se diferencian por sus características bioquímicas y genéticas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Especies, subespecies y serotipos de *Salmonella* (Brenner *et al.*, 2000)

Especies y subespecies de <i>Salmonella</i>	No. de serotipos
<i>Salmonella enterica</i> , con seis subespecies:	
Subespecie I: <i>enterica</i>	1.454
Subespecie II: <i>salamae</i>	489
Subespecie IIIa: <i>arizonae</i>	94
Subespecie IIIb: <i>diarizonae</i>	324
Subespecie IV: <i>houtenae</i>	70
Subespecie V: <i>indica</i>	12
<i>Salmonella bongori</i> :	20

Después de determinar la especie y subespecie, se procede a realizar reacciones antígeno-anticuerpo para determinar el serotipo de la bacteria, el cual se escribe con letra "no itálica" empezando con mayúscula (Brenner *et al.*, 2000). Esta nomenclatura de *Salmonella* ha logrado uniformizar las comunicaciones entre científicos, personal médico y el público.

Brotos de *Salmonella* asociados a frutas y hortalizas

Salmonella es un patógeno transmitido por alimentos y ha causado grandes brotes de gastroenteritis descritas en todo el mundo. En el 2004 se reportaron en EUA 6,464 casos de infección atribuidos al género *Salmonella*, de los cuales, 1,189 casos fueron ligados con el serotipo *typhimurium* (CDC, 2005). La salmonelosis se asocia al consumo de productos de origen animal. Sin embargo algunas frutas y hortalizas como mango, sandía, melón y tomate han sido implicadas en brotes epidemiológicos por esta bacteria (Cuadro 3).

Cuadro 3. Brotos de *Salmonella* asociados al consumo de frutas y hortalizas

Serotipo	Año	Localización	Procedencia	Sitio de infección	Fruto	Casos	Muertes	Referencia
Saphra	1997	California	México	Restaurante supermercado	Melón Cantaloupe	24	0	Molde-Binetani <i>et al.</i> , 1999
Oranienburg	1998	Ontario Canada	USA México	Restaurante	Melón Cantaloupe	22	0	CCDR, 1998
Thompson	1999	California	México	Restaurante	Chilitro	35	0	Campbell <i>et al.</i> , 2001
Boildon	1999	California Virginia	Florida	Restaurante	Tomate	86	0	Cummings <i>et al.</i> , 2001
Juviana	2000	Florida	USA	Restaurantes	Tomate Roma		0	CDC, 2002a
Newport	2000	Virginia	Brazil	Supermercado	Mango	78	2	Sivapalasingam <i>et al.</i> , 2003
Poona	2000 2002	USA Canada	México	Múltiples	Melón Cantaloupe	47	0	CDC, 2002b
Múltiples	2004	USA Canada	Florida	Restaurante	Tomate	561	0	CDC, 2005b
Typhimurium	2006	USA	California	Restaurante	Tomate	183	0	CDC, 2006

Frutas y hortalizas frescas juegan un papel importante en la transmisión de *Salmonella*. En una investigación en Estados Unidos de América, después de un brote de *Salmonella poona* se encontró que el 1% de la cáscara de melones importados de México estaban contaminados con la bacteria (Pirovani *et al.*, 2000), lo que ha generado mayor control y monitoreo permanentes de los distribuidores de frutas y hortalizas, generando retiro de productos (Cuadro 4), debido a la presencia de *Salmonella* (FDA, 2007).

Cuadro 4. Productos retirados del mercado debido a la presencia de *Salmonella*

Producto	Año	Empresa	Ciudad	Retiro
Precortados de melón	2007	Simply Fresh Fruit Inc	Los angeles	2,250 charolas
Cantaloupe	2007	Castle Produce	San diego	2,560 cartones
Germinados de alfalfa	2007	Dixon company	Washington, Nevada	3,000 charolas
Cantaloupe	2006	Timeo Worldwide Inc	Phoenix, Dallas, Florida	504 cartones
Cantaloupe	2006	Río Vista	Río rico, Arizona	62,640 cartones

Esta presencia de patógenos en superficie de frutos, así como la gran diversidad de brotes ocurridos, apoya la necesidad de mejorar los métodos de desinfección, para reducir riesgos asociados con estos productos (Parish *et al.*, 2003).

Métodos para reducir o eliminar patógenos de frutas y hortalizas

Está bien establecido que los microorganismos patógenos asociados a los productos frescos pueden provocar brotes de enfermedades, lo cual apoya la necesidad de mejorar los métodos para reducir los riesgos asociados con esos productos.

Existe una variedad de métodos empleados para reducir poblaciones de microorganismos en frutos enteros o mínimamente procesados. Cada método tiene distintas ventajas y limitaciones dependiendo del tipo de fruta u hortaliza, protocolo empleado y otras variables (Beuchat, 1998). El mejor método para reducir y/o eliminar patógenos de la superficie de frutas y hortalizas, es en primer lugar, prevenir la contaminación; sin embargo, esto no siempre es posible y es necesario lavar y desinfectar diversos productos frescos para prevenir brotes (Parish *et al.*, 2003).

La eficacia del método usado para reducir la carga microbiana depende del tipo de tratamiento, tipo y fisiología del microorganismo evaluado, características de la superficie del producto fresco (textura, rajaduras e hidrofobicidad), tiempo de contacto, concentración del desinfectante, pH y temperatura (Parish *et al.*, 2003).

Los métodos para reducir poblaciones de microorganismos patógenos en frutas y hortalizas involucren tratamiento hidrotérmico, remoción física, química y biológica

Tratamiento hidrotérmico

El agua caliente se emplea como tratamiento de mitigación en algunas frutas y hortalizas para el control de patógenos. Los frutos estudiados para su tratamiento con agua caliente incluyen manzana, cereza, toronja, limón, mango, melón, papaya, pera y tomate (Breidt *et al.*, 2000). A pesar de que los efectos adversos sobre el color, textura y sabor limitan la utilidad de este tratamiento, el agua caliente puede ser

empleado como un sanitizante de productos frescos, especialmente para productos frescos cortados o jugos sin pasteurizar donde la piel externa no comestible es retirada durante el procesamiento. Pao y Davis (1999) determinaron que la inmersión de naranjas en agua caliente (a 70°C por 2 minutos u 80°C por 1 minuto) redujo 5 Log₁₀ UFC/cm² de *Escherichia coli* de la superficie de las frutas. Sin embargo el tratamiento hidrotérmico en frutas frescas es considerado por la FDA como un proceso donde se pierde o reduce la frescura de los frutos (CFR, 2000a).

El tratamiento hidrotérmico también genera un diferencial de temperatura permitiendo la internalización de patógenos a los frutos. Zhuang *et al.*, (1995) demostraron que *Salmonella montevideo* se infiltra en tomate al ser sumergidos en agua con un diferencial de temperatura de 15°C respecto a la temperatura del fruto.

Remoción física

Algunos productos frescos se cepillan con movimientos oscilatorios que restriegan las superficies para la remoción física de residuos del suelo y microorganismos. Esta operación se realiza comúnmente en conjunto con un detergente seguido de un enjuague con agua potable (Parish *et al.*, 2003). El cepillado también remueve una porción de la cutícula cerosa natural que recubre la superficie de los productos frescos y que actúa como barrera para los microorganismos. En un estudio realizado por Parnell *et al.*, (2005), evaluaron la reducción de *Salmonella* en superficie de melón, utilizando el método de inmersión en agua y cepillado. Este método redujo

0.7 Log₁₀ UFC/melón en el caso de lavado con agua por inmersión y de 0.9 Log₁₀ UFC/melón en el caso de cepillado. El método de cepillado, no es tan efectivo en la reducción de poblaciones microbianas; sin embargo, es necesario en los frutos como chile pimiento y melón, debido a que restos de agua en los frutos facilitan el desarrollo de hongos (Parish *et al.*, 2003).

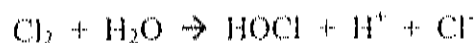
Tratamientos químicos

Existe una gran diversidad de agentes químicos utilizados para eliminar microorganismos patógenos de la superficie de frutas y hortalizas. Entre los agentes químicos más importantes se encuentran: cloro, dióxido de cloro y ozono.

Cloro

El cloro ha sido usado para propósitos de sanitización en el procesamiento de alimento por décadas y es tal vez el sanitizante más ampliamente usado en esta industria. El cloro gas y los hipocloritos de sodio y calcio son usados generalmente en el rango de concentraciones de 50 a 200 mg.L⁻¹ de cloro libre, con un tiempo de contacto de 1 a 2 minutos para sanitizar superficies de productos frescos (Parish *et al.*, 2003). Su actividad microbicida depende de la cantidad de cloro libre disponible en forma de ácido hipocloroso (HCOI). Al entrar en contacto el cloro gas con el agua, el cloro libre se hidroliza y produce en dos etapas HOCl (ácido hipocloroso) y OCl⁻ (ion hipoclorito). Estas etapas son:

a) Hidrólisis, que se efectúa en fracciones de segundo:



b) Disociación o ionización, el HOCl, inestable parcialmente (ya que es un ácido relativamente débil), se ioniza así:



Una parte del cloro residual queda en el agua como HOCl y otra parte como OCl⁻, que resulta de la ionización del HOCl. La proporción de cada especie depende directamente del pH y tiene mucha importancia porque el HOCl es un germicida más eficaz que el OCl⁻. Entre menor sea el pH, mayor concentración de HOCl habrá, por lo tanto se puede notar que el pH influye fuertemente en el grado de desinfección que se puede alcanzar con un cierto nivel de cloro (Figura 10).

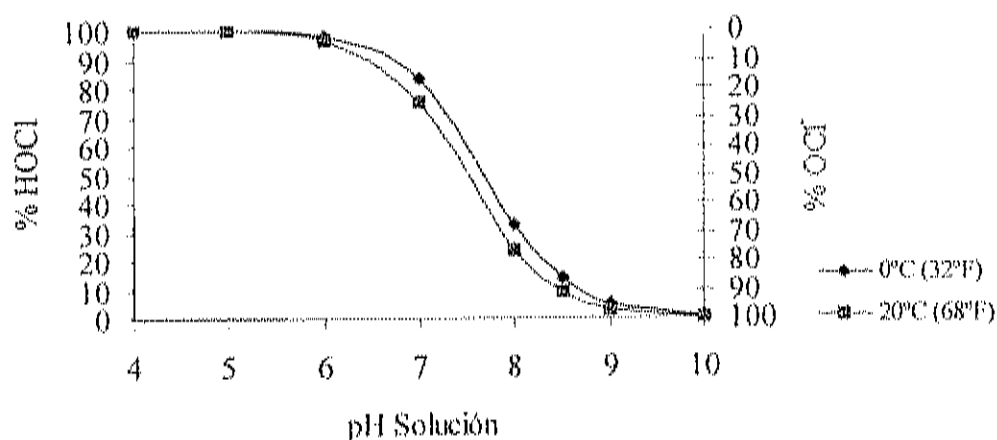


Figura 10. Efecto de pH y temperatura sobre la cantidad de cloro libre (Beuchat, 2000)

El pH de las soluciones sanitizantes a base de compuestos clorados, normalmente se ubica entre 6.0-7.5 para minimizar la corrosión de las superficies metálicas, a la vez que proporciona una actividad microbicida del HOCl aceptable.

Otros factores que afectan la concentración de ácido hipocloroso son temperatura, presencia de materia orgánica, luz, aire y metales (Parish *et al.*, 2003). En el caso de la temperatura, se sugiere que el agua de proceso sea mantenida por lo menos 10°C más alta que los productos frescos con la finalidad de reducir la posibilidad de infiltración microbiana causada por un diferencial de presión generado por temperatura (Zhuang *et al.*, 1995; Beuchat, 2000).

Los efectos del cloro sobre bacterias patógenas inoculadas en superficies de frutos han sido investigados y los resultados son controversiales. Weissinger *et al.*, (2000) observaron que cubos de tomate y tiras de lechuga inoculados con *Salmonella bailldon* y tratados durante 40 segundos con 120 o 200 mg.L⁻¹ de cloro reducían la población en 1 Log₁₀ UFCg⁻¹. Trabajos que coinciden con lo reportado por Beuchat *et al.*, (1998) donde observaron una reducción menor a 1 Log₁₀ UFC cm⁻² de *Salmonella* en lechuga congelada, tratada con 200 mg.L⁻¹ de cloro durante 1 minuto. Ukuku (2006) reportó una reducción de 2.6 Log₁₀ de *Salmonella* en superficie de melón tras aplicar 200 mg.L⁻¹ de cloro. Chaidez *et al.*, (2003), evaluaron la actividad microbicida de hipoclorito de sodio, tricloro-s-triazinetrióna y tricloromelane para reducir *Salmonella*, *Escherichia coli* y bacteriófago MS2, simulando condiciones de tina de lavado de tomate. Reportaron que el tricloro-s-triazinetrióna e hipoclorito de sodio mostraron mayor efectividad al reducir a *Salmonella* y *Escherichia coli* 8 Log₁₀, en el caso del bacteriófago MS2 redujeron 7 Log₁₀. Cabe señalar que la mayor reducción la observaron a turbidez baja y una concentración de desinfectante de 300 mg.L⁻¹. Chaidez *et al.*, (2007) lograron reducir 3.6 Log₁₀ de *Salmonella typhimurium* al sumergir frutos de tomate durante 120 s en agua clorada a 200 mg.L⁻¹

con 2 unidades nefelométricas de turbidez. En consecuencia, la reducción de los microorganismos patógenos en la superficie de frutos, depende del tipo de producto y del tipo de patógeno presente. Cuando el cloro reacciona con la materia orgánica, algunos componentes que se lixivian del tejido de superficie de los frutos pueden neutralizar al cloro antes que realice su efecto sobre los microorganismos patógenos, reduciendo su efectividad. Adicionalmente, grietas y pequeñas fisuras en la superficie de los frutos interactúan con la naturaleza hidrofóbica de la cutícula cerosa en la superficie y pueden prevenir que el cloro alcance a los microorganismos (Parish *et al.*, 2003).

Dióxido de cloro

Las mayores ventajas del dióxido de cloro (ClO_2) sobre el ácido hipocloroso (HOCl) incluyen la baja reactividad con la materia orgánica y una mayor actividad a pH neutro; sin embargo, la estabilidad del dióxido de cloro puede ser un problema. A su vez forma menos trihalometanos que el ácido hipocloroso, a pesar de tener un poder oxidante 2.5 veces más que el cloro. Se permite un máximo de 200 mg.L^{-1} de ClO_2 para sanitización de los equipos de proceso y 3 mg.L^{-1} máximo para contacto con un producto fresco entero. Sólo 1 mg.L^{-1} se permite en papas peladas. El tratamiento superficial con agentes antimicrobianos (mediante lavado, inmersión o aspersión) debe ir seguido de un enjuague con agua limpia para eliminar residuos del agente antimicrobiano (CFR, 2000b; FDA, 1998).

Existe menos información sobre la efectividad del ClO_2 respecto al ácido hipocloroso (HOCl) como sanitizante para productos frescos. Como en el caso del HOCl , la susceptibilidad microbiana al ClO_2 difiere con las cepas y las condiciones ambientales de la aplicación. Una población de *Listeria monocytogenes* inoculada sobre lechuga rallada y hojas de col se redujo 1.1 y 0.8 Log_{10} respectivamente después de un tratamiento con 5 mgL^{-1} de ClO_2 por 10 minutos (Zhang and Farber, 1996). Huang *et al.*, (2006) inocularon la superficie de manzana y lechuga con *Salmonella*, lograron reducciones que van de los 3.1 a 4.2 Log_{10} con tiempos de contacto de 3, 6 y 10 min y concentraciones de dióxido de cloro de 20 y 40 mgL^{-1} Beuchat *et al.*, (2005) reportaron reducciones de 5.4 Log_{10} de *Bacillus thuringiensis*, utilizando concentraciones de 200 mgL^{-1} durante 5 minutos.

Ozono

El ozono ha sido usado casi una década como desinfectante en el tratamiento de agua potable en suministros municipales, agua embotellada, piscinas e industrias (Kim *et al.*, 1999). Se caracteriza por su alto poder oxidante. Tiene un olor desagradable característico, detectable a bajas concentraciones (0.02 mgL^{-1}), muy por debajo de los niveles de toxicidad aguda. Es relativamente inestable en solución acuosa y la vida media del ozono en agua destilada a 20°C es generalmente considerada de 20 a 30 minutos (Khadre *et al.*, 2001). En aguas de procesos con sólidos suspendidos y materia orgánica, la vida del ozono puede tener una actividad menor a 1 minuto (Suslow, 2004).

En el 2001 el ozono fue reconocido como Sustancia Generalmente Reconocida como Segura (GRAS, siglas en inglés), la FDA aprobó el uso de ozono como agente antimicrobiano en productos frescos y mínimamente procesados (Khadre *et al.*, 2001; Suslow, 2004).

Rodgers *et al.*, (2004) observaron que 3 mgL^{-1} de ozono inactivó la población de *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* en aproximadamente 5.6 Log_{10} en rodajas de manzana, hojas de lechuga, fresas y melón, después de un tiempo de contacto de 5 minutos. Singh *et al.*, (2002) encontraron que el tratamiento de lechuga y zanahoria con agua ozonizada con 9.6 y 16.5 mgL^{-1} redujo la población de *Escherichia coli* O157:H7 en (1.41 y $1.42 \text{ Log}_{10} \text{ UFCg}^{-1}$ en lechuga) y (1.68 y $1.8 \text{ Log}_{10} \text{ UFCg}^{-1}$ en zanahoria), después de 10 minutos de contacto. Chaidez *et al.*, (2007) lograron reducir 2.53 Log_{10} de *Salmonella typhimurium* al sumergir frutos de tomate durante 120 s en una solución de ozono a 200 mgL^{-1} con 2 unidades nefelométricas de turbidez.

Tratamientos biológicos

Manejo poscosecha

Existen diversos reportes publicados sobre el uso de agentes biológicos para prevenir el crecimiento de patógenos humanos en productos frescos. Como estrategia de manejo poscosecha se ha utilizado la aplicación de microorganismos para prevenir la proliferación de patógenos, este método se basa en la competencia por espacio físico y nutrientes o bien por la producción de compuestos que dañan al patógeno. Janisiewicz *et al.*, (1999) reportaron que *Pseudomonas syringiae* prevenía el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 en manzana, ya que en el tratamiento control (agua), la población de *Escherichia coli* se incrementaba en 2 Log₁₀, con respecto al tratamiento donde se utilizó *Pseudomonas syringiae*. Vescovo *et al.*, (1996) reportaron cepas de bacterias ácido lácticas que tiene la capacidad de inhibir *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* en hortalizas.

Otros agentes biológicos utilizados en el manejo poscosecha para el control de bacterias patógenas son los bacteriófagos, los cuales son parásitos obligados de las bacterias. En el Cuadro 5 se enlistan una serie de investigaciones que involucran el control de bacterias mediante el uso de bacteriófagos, en alimentos de origen vegetal y animal.

Cuadro 5. Bacteriófagos utilizados en el control de bacterias patógenas en poscosecha

Alimento	Cepa Hospedera del Fago	Referencia
Precortados de melón y manzana	<i>Listeria monocytogenes</i>	Leverentz <i>et al.</i> , 2003; Leverentz <i>et al.</i> , 2004
	<i>Salmonella enteritidis</i>	Leverentz <i>et al.</i> , 2001
Leche	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gill <i>et al.</i> , 2002
	<i>Pseudomonas fragi</i>	Ellis <i>et al.</i> , 1973
Queso	<i>Salmonella enteritidis</i>	Modj <i>et al.</i> , 2001
Piel Pollo	<i>Campylobacter jejuni</i>	Atterbury <i>et al.</i> , 2003; Goode <i>et al.</i> , 2003
	<i>Salmonella enteritidis</i>	Goode <i>et al.</i> , 2003
Retiil chicken	<i>Salmonella typhimurium DT104</i>	Kostrzynska <i>et al.</i> , 2002
Embutidos de pollo	<i>Salmonella typhimurium DT104</i>	Whitchard <i>et al.</i> , 2003
Cortes de Carne	<i>Pseudomonas spp.</i>	Greer, 1986
	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	O'Flynn <i>et al.</i> , 2004
Carne empacada al alto vacío	<i>Listeria monocytogenes</i>	Dykes y Moorhead, 2002
Grasa de cerdo	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Greer y Dills, 2002

Alimentos de origen vegetal

Entre las investigaciones realizadas en alimentos de origen vegetal que involucran el uso de bacteriófagos se encuentran las realizadas por Leverentz *et al.*, (2001), donde examinaron la interacción bacteriófago-cepa hospedero en frutos precortados de melón y manzana. Utilizaron una mezcla de 4 bacteriófagos (SCPLX-1), específicos para *Salmonella enteritidis*, obtenidas de la empresa Intralytix (Baltimore, Md). Obtuvieron resultados prometedores en precortados de melón, al registrar reducciones de 3.5 Log₁₀ a temperaturas de 5 y 10°C; sin embargo, en precortados de manzana no se obtuvieron reducciones de *Salmonella enteritidis*. Estos resultados en precortados de manzana los atribuyen a la sensibilidad de la mezcla de bacteriófagos (SCPLX-1) a ambientes más ácidos como es el caso de los precortados de manzana que presentan un pH de 4.37, lo que originó que la mezcla de bacteriófagos no pudiera persistir en precortados de manzana, declinando los títulos a niveles no detectables en 24 h.

Leverentz *et al.*, (2003) de igual manera examinaron la interacción bacteriófago-cepa hospedero y bacteriocin en frutos precortados de melón y manzana. Utilizaron productos comerciales de la compañía Intralytix (Baltimore, Md) que contenían mezclas de bacteriófagos (LM-103 y LMP-102), los cuales contenían 14 y 6 bacteriófagos específicos para *Listeria monocytogenes*, ambos incluyen los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b, asociados con listeriosis humana. Los resultados encontrados señalan que la mezcla de bacteriófagos reduce la población de *Listeria monocytogenes* de 2.0 a 4.6 Log₁₀ en precortados de melón; mientras que en precortados de manzana las reducciones fueron de 0.4 Log₁₀. Al combinar nisin (péptido policíclico antibacterial con 34 residuos de aminoácidos) y la mezcla de bacteriófagos (LM-103 y LMP-102) lograron reducciones de las poblaciones de *Listeria monocytogenes* superiores a los 5.7 Log₁₀ en precortados de melón; mientras que en precortados de manzana lograron reducciones de 2.3 Log₁₀. Al utilizar solamente nisin lograron reducciones superiores a los 3.2 Log₁₀ en precortados de melón y en precortados de manzana lograron reducciones superiores a los 2 Log₁₀.

La empresa Intralytix en el 2002 realizó una petición formal ante la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de América (FDA, siglas en inglés), en relación al uso de bacteriófagos como aditivos para ser usados en alimentos listos para su consumo. Dicha petición fue evaluada cuatro años, para garantizar la seguridad y efectividad del uso de bacteriófagos para reducir poblaciones de patógenos y finalmente fue aprobada (FDA, 2006).

Alimentos de origen animal

Existen algunos reportes que señalan el uso de bacteriófagos para reducir patógenos en alimentos de origen animal. Entre las investigaciones que destacan están las realizadas por Modi *et al.*, (2001) en la que estudiaron el efecto de bacteriófagos en la supresión de *Salmonella enteritidis* durante la manufactura y almacenamiento de queso cheddar. El estudio concluyó que la adición de bacteriófagos a la leche utilizada para la producción de queso cheddar, redujo de 1 a 2 Log₁₀ poblaciones de *Salmonella enteritidis*.

Atterbury *et al.*, (2003), realizaron experimentos que involucraban la contaminación artificial de piel de pollo con *Campylobacter jejuni*. Los resultados mostraron reducciones de 1 Log₁₀; sin embargo, Goode *et al.*, (2003), obtuvieron reducciones de 2 Log₁₀ sobre poblaciones de *Campylobacter jejuni* en piel de pollo.

Otro producto en el que se aplicaron bacteriófagos son los embutidos de pollo, donde Whicard *et al.*, (2003). Utilizaron al bacteriófago Felix O1 para suprimir a *Salmonella typhimurium* DT104, logrando reducciones de 2 Log₁₀ en embutidos de pollo.

Alimentos de origen animal

Existen algunos reportes que señalan el uso de bacteriófagos para reducir patógenos en alimentos de origen animal. Entre las investigaciones que destacan están las realizadas por Modi *et al.*, (2001) en la que estudiaron el efecto de bacteriófagos en la supresión de *Salmonella enteritidis* durante la manufactura y almacenamiento de queso cheddar. El estudio concluyó que la adición de bacteriófagos a la leche utilizada para la producción de queso cheddar, redujo de 1 a 2 Log₁₀ poblaciones de *Salmonella enteritidis*.

Atterbury *et al.*, (2003), realizaron experimentos que involucraban la contaminación artificial de piel de pollo con *Campylobacter jejuni*. Los resultados mostraron reducciones de 1 Log₁₀; sin embargo, Goode *et al.*, (2003), obtuvieron reducciones de 2 Log₁₀ sobre poblaciones de *Campylobacter jejuni* en piel de pollo.

Otro producto en el que se aplicaron bacteriófagos son los embutidos de pollo, donde Whicard *et al.*, (2003). Utilizaron al bacteriófago Felix O1 para suprimir a *Salmonella typhimurium* DT104, logrando reducciones de 2 Log₁₀ en embutidos de pollo.

Manejo precosecha

Durante las fases de precosecha de alimentos de origen animal y vegetal, se han utilizado bacteriófagos en el control de las poblaciones de bacterias patógenas. Algunos de los sistemas de producción implicados se enlistan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Bacteriófagos utilizados en el control de bacterias patógenas en precosecha

Sistema de producción	Enfermedad/Síntoma	Copa Hospedera del fago	Referencia
Zetas cultivables	Mancha bacteriana	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	Munsch <i>et al.</i> , 1991
Tomate	Mancha bacteriana	<i>Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria</i>	Bilongh <i>et al.</i> , 2003
Manzana	Tizon de fuego	<i>Erwinia amylovora</i>	Schmiedel <i>et al.</i> , 1999
Frutas con Semilla	Mancha bacteriana	<i>Xanthomonas campestris pv. pruni</i>	Randhava y Civerolo, 1986
Germinados	Contaminación de semillas	<i>Salmonella enteritidis</i>	Pao <i>et al.</i> , 2004

Alimentos de origen vegetal

Algunas de las investigaciones relacionadas con alimentos de origen vegetal, son las realizadas por Pao *et al.*, (2004), quienes contaminaron de manera experimental germinados con *Salmonella* y utilizaron bacteriófagos para su control, reportando reducciones de 1.5 Log₁₀ al utilizar mezclas de bacteriófagos.

Munsch *et al.*, (1991), mediante el uso de bacteriófagos lograron reducir en un 70 % la pérdida de la producción ocasionada por la mancha bacteriana, enfermedad generada por *Pseudomonas tolaasii* en zetas del género *Agaricus*.

Alimentos de origen animal

El uso de bacteriófagos para el control de poblaciones de microorganismos patógenos, ha sido evaluado en productos como: pescado, pollo, cerdo y cabras (Cuadro 5). Berchieri *et al.*, (1997), reportaron una reducción en la mortalidad de pollos ocasionada por *Salmonella*, mediante el uso de bacteriófagos. El grupo de investigación de Skalar *et al.*, (2001), aplicaron mezclas de bacteriófagos a pollo para reducir la incidencia de *Salmonella enteritidis*; sin embargo, encontraron inconsistencias en las reducciones relacionadas principalmente a factores genéticos, ambientales y físicos.

Consideraciones en el uso de bacteriófagos para biocontrol

Existen diversos aspectos a considerar previo al desarrollo de formulaciones a base de bacteriófagos como estrategia para el control de patógenos. En los cuadros 7 y 8 se enlistan las ventajas y desventajas de los bacteriófagos.

Cuadro 7. Ventajas de biocontrol mediante bacteriófagos (Greer, 2005)

Ventajas
Especificidad
Estable en alimentos y capaz de sobrevivir procesamientos
Natural
Ubicuos en la naturaleza y facil de aislar
Economicamente redituable
Fácil de preparar y aplicar
Actúa sobre biofilmes
No tóxico para células eucariotas
No tiene efectos en la calidad de los alimentos

La especificidad de los bacteriófagos sobre cepas hospederas particulares es una característica que permite mantener intacta la flora indígena de los productos. Otra característica que destaca es su capacidad de sobrevivencia. Se ha documentado la capacidad de sobrevivencia de bacteriófagos específicos para *Campylobacter*, en pollo sometido a procesamientos industriales. Greer (2005) señala que algunos bacteriófagos son resistentes a condiciones de estrés ambiental como calor, pH bajo, shock osmótico y congelamiento. Una característica que sobresale es la reportada por Hanlon *et al.*, (2001), demostraron la capacidad de controlar biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* mediante bacteriófagos. Dicha característica la atribuyeron a la producción de una enzima depolimeraza producida por el bacteriófago, la cual reduce la viscosidad del exopolisacárido producido por la bacteria.

Algunos autores han desarrollado argumentos que cuestionan la eficacia del uso de bacteriófagos para reducir patógenos. En el cuadro 8 se enlistan algunas desventajas.

Cuadro 8. Desventajas de biocontrol mediante bacteriófagos

Desventajas
Limitado rango de cepas hospederas
Bacterias mutantes resistentes a bacteriófagos
Requiere gran número de bacterias blanco
Conversión lisogénica
Transferencia de características indeseables
Antigenicidad (respuesta inmune, alergias)
Percepción de los consumidores

Se presume la posibilidad de transferencia de características indeseables de un microorganismo a otro, tales como genes de virulencia e inclusive resistencia de la

cepa hospedera al ataque de los bacteriófagos Greer (2005). Otra desventaja importante es el reducido rango de bacterias hospedero sobre las cuales actúa; sin embargo, Barrow y Soothill (1997), señalan que esta desventaja se puede resolver mediante el uso de mezclas de bacteriófagos.

Bacteriófagos

Edward Twort (1915) y Félix D'Herelle (1917) informaron independientemente el aislamiento de entidades ultrafiltrables capaces de destruir cultivos de bacterias o producir pequeñas áreas de color más claro cuando las bacterias crecían a confluencia en placas de medio sólido. Fue el canadiense Félix d'Herelle, en el instituto Pasteur de Paris, quien dio el nombre de "Bacteriófagos" a estas entidades.



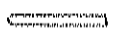



Los bacteriófagos, son parásitos intracelulares obligados que se multiplican al interior de las bacterias, haciendo uso de algunas o todas sus máquinas biosintéticas (Gene, 2006). Están constituidos por una cubierta proteica o cápside en cuyo interior está contenido su material genético, que puede ser ADN o ARN, de simple o doble cadena, circular o lineal (en el 95% de los fagos conocidos es ADN de doble cadena), de 5,000 a 500,000 pares de bases. El tamaño de los fagos oscila entre 20 y 200 nm aproximadamente.

Los fagos son ubicuos y pueden ser encontrados en diversas poblaciones de bacterias, tanto en el suelo como en la flora de intestinal de los animales. Uno de los

ambientes más poblados por fagos y otros virus es el agua de mar, donde se estima que pueden estar presentes en alrededor de 10^{10} partículas virales por cada litro de agua, lo que representa un excelente mecanismo de control de las bacterias marinas, ya que se produce un equilibrio entre las bacterias que se multiplican y los fagos que destruyen una parte de esa población bacteriana (Ronda, 2003).

Se han descrito 12 familias de bacteriófagos con diferentes características estructurales y genéticas (Cuadro 9). En todos los grupos, con excepción de los pertenecientes al género inovirus, el ácido nucleico está contenido en una cápsula poliédrica unida en algunos casos a una estructura que permite la adsorción al hospedero (Vispo *et al.*, 2001).

Cuadro 9. Grupos y géneros de bacteriófagos

Familias	Género	Ejemplo	Morfología		Envoltura	Genoma
Corticoviridae	Corticovirus	PM2	Isométrica		No	DNA bicatenario
Cystoviridae	Cystovirus	Ø6	Isométrica	Corticoviridae	Si	3 segmentos ds RNA
Tectiviridae	Tectivirus	Fago PRD1	Icosahédrica		No	ds DNA lineal
Leviviridae	Levivirus	Colifago MS2	Icosahédrica		No	ss RNA (+)
Microviridae	Spirovirus	Fago spiroplasma	Icosahédrica	Tectiviridae	No	ss DNA circular
Inoviridae	Inovirus	Colifago fd	Varilla		No	ss DNA circular
Lipothetriviridae	Lipothetrivirus	Fago termoproteus	Varilla	Inoviridae	Si	ds DNA lineal
Myoviridae		Colifago T4	Fago con cola		No	ds DNA lineal
Siphoviridae	Grupo lambda	Colifago lambda	Fago con cola	Myoviridae	No	ds DNA lineal
Podoviridae		P22	Fago con cola		No	ds DNA lineal
Plasmaviridae	Plasmavirus	Fago acholeplasma	Pleomórfica		Si	ds DNA circular
Sulphobolus shibatae	Fusefloviridae	SSV-1	Limón		No	ds DNA circular

Bacteriófago P22

Pertenece a la familia *Podoviridae*, es considerado un virus tipo λ , esta formado por cabeza y tallo, su cabeza esta formada por 72 capsomeros, su cola es pequeña (17 nm largo x 6 nm ancho), recta y no contractil, es un virus sin envoltura y su simetría es icosaédrica (Figura 11), tiene un diametro de 60 nm, (Asm, 2000). Es un virus con genoma DNA lineal bicatenario, consta de 41,724 bp.

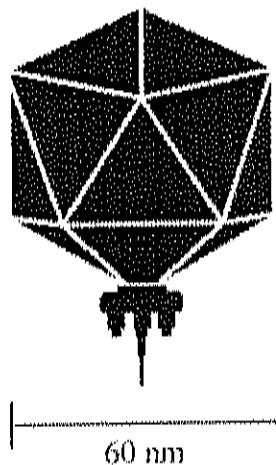


Figura 11. Estructura bacteriófago P22 (ICTV, 2006)

Replicación del bacteriófago P22

1.- Adsorción. La primera etapa en la adsorción del bacteriófago depende de la probabilidad de que el bacteriófago y la célula hospedera se encuentren, por lo que la concentración de bacteriófagos y bacterias es fundamental. Para que se infecten las células hospedero, debe adherirse el bacteriófago P22 a los receptores localizados en

la superficie de la célula. La zona de adsorción del virus es complementaria al receptor celular, por lo tanto un determinado virus sólo puede infectar un número limitado de cepas celulares que contengan a un determinado receptor. Los receptores pueden ser polisacáridos, proteínas o lipoproteínas. En el caso de *Salmonella typhimurium*, los receptores de superficie específicos para P22 son los antígenos O, que presentan una cadena principal de trisacáridos con unidades repetidas de α -D-manosa (1 \rightarrow 4), α -L-ramnosa (1 \rightarrow 3), α -D-galactosa (1 \rightarrow 4) (Figura 12).

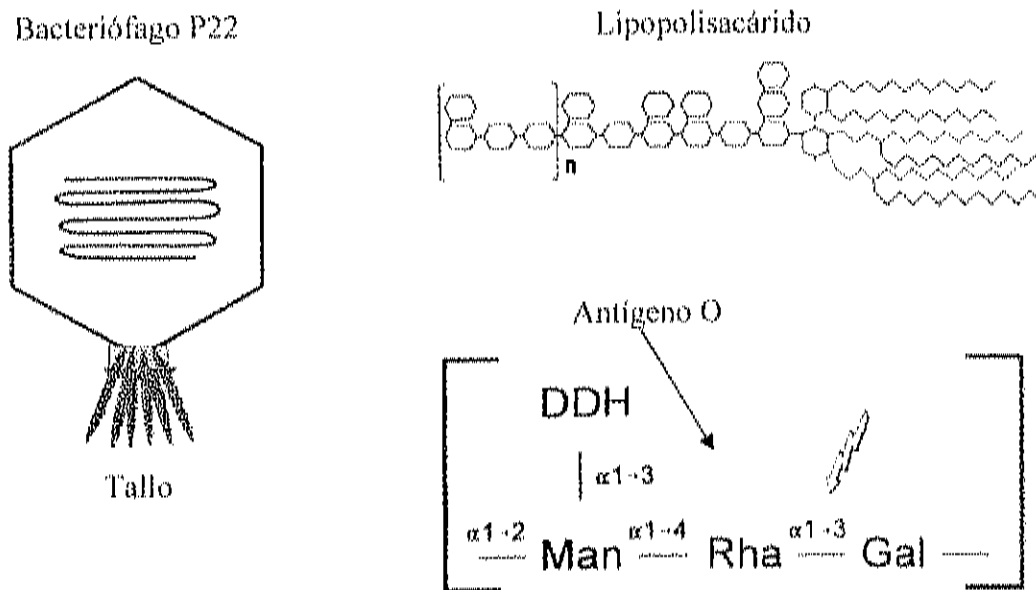


Figura 12. Sitio de reconocimiento P22-*Salmonella* (Baxa *et al.*, 1996).

2.- Entrada. La entrada del genoma del bacteriófago P22 al citoplasma de *Salmonella* se realiza mediante proteínas con actividad hidrolítica (gp4, gp19), que degradan la capa de peptidoglicano, para posteriormente permitir la penetración del genoma del bacteriófago P22 (Moka and Molineux, 2004).

3.- Eclipse. Se conoce con el nombre de eclipse al período de tiempo en el cual no se detectan partículas vírales infectivas dentro de la célula. Esta fase ocurre después del inicio de la infección y demora algunas horas. La fase de eclipse comprende: desnudamiento del genoma viral, síntesis de ácido nucleico y proteínas virales, finalizando en el ensamblaje cuando aparecen virus infectivos. La duración de la fase de eclipse varía para los distintos virus, siendo relativamente constante para un mismo sistema virus-célula huésped (Hogg, 2005).

4.- Multiplicación. Este paso se da posterior a la inyección del ácido nucleico e incluye la replicación del ácido nucleico viral, así como su transcripción y traducción para generar todas la partes estructurales del virión (Figura 13).

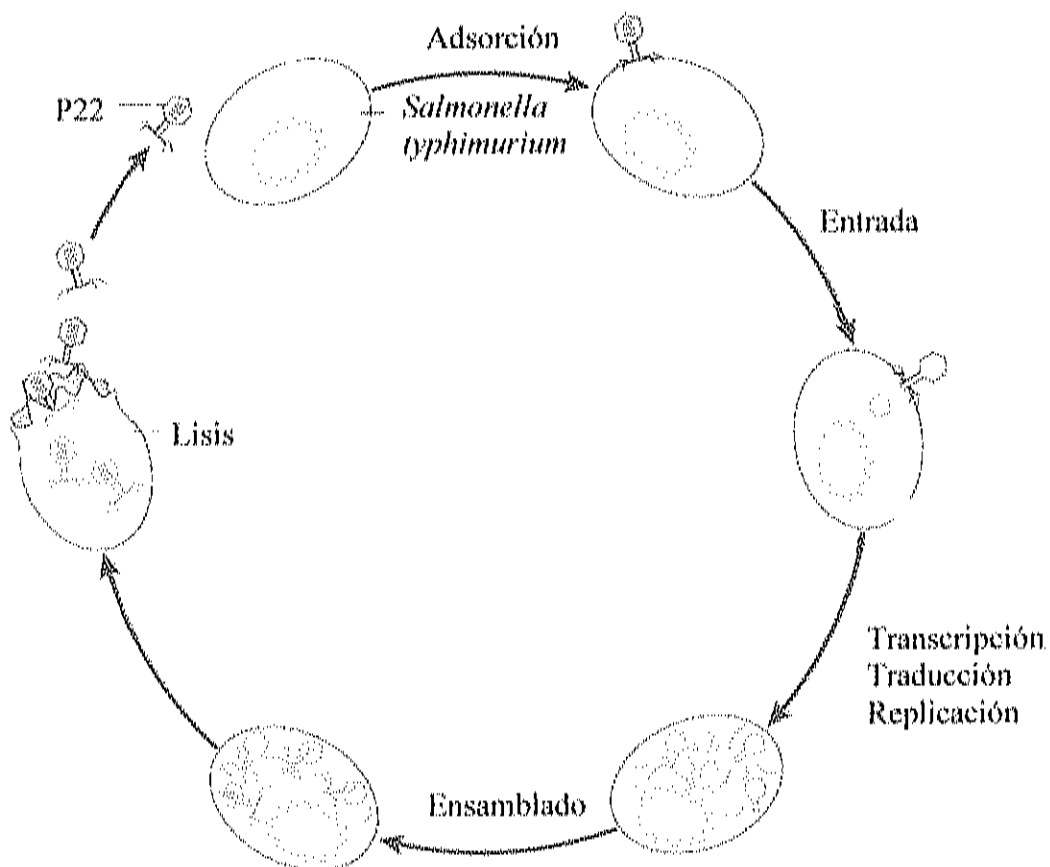


Figura 13. Ciclo de vida del Bacteriófago P22 (Campbell, 2003)

5.- Maduración. Esta etapa consiste en la formación de la cápsula proteica y su asociación con el genoma del bacteriófago

6.- Liberación. Los virus se liberan generalmente como resultado de la ruptura de la membrana de la célula hospedera (Hogg, 2005). El ciclo completo de replicación tiene una duración de 40 minutos y libera alrededor de 100 fagos por cada célula infectada (Campbell, 2003).

La replicación de bacteriófagos con fines de investigación, se realiza mediante la técnica de doble agar; sin embargo, los estudios preeliminares del presente trabajo mostraron desventajas para los objetivos de esta investigación. La desventaja más importante es la obtención de volúmenes bajos del bacteriófago a títulos adecuados para nuestro experimento (1×10^{11} UFP/mL). Otra desventaja en la propagación de bacteriófagos mediante la técnica de doble agar es la residualidad de nutrientes procedentes del medio TSA, lo que afectó la sobrevivencia de *Salmonella typhimurium* y ocasionó una disminución del efecto del bacteriófago P22. Por tal motivo, la propagación del bacteriófago se realizó mezclando en condiciones estériles a *Salmonella typhimurium* y al bacteriófago P22 en un volumen de 2 L de buffer estéril (fosfato de potasio monobásico 0.01 M, pH 7.2). Esta mezcla se incubó a 37°C durante 24 horas Posteriormente la mezcla se concentró mediante un sistema de ultrafiltración a un volumen de 500 mL. y se colocó en tubos de centrifuga estériles para ser centrifugada a 13,080 X g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y filtrado a través de una membrana de 0.22 μm (Pall

Gelman Sciences). De esta manera se obtienen un volumen de 500 mL con títulos aproximados de 1×10^{11} UFP/mL requeridos para el experimento.

Ultrafiltración

El sistema de ultrafiltración, es un sistema de membranas de flujo cruzado que involucra el manejo de presión. Puede, purificar, concentrar y fraccionar moléculas orgánicas de un flujo regulado simultáneamente. El flujo entrante presurizado se pasa a través de una membrana semipermeable, la cual separa al flujo de agua en dos efluentes (Figura 14), llamados retenido (concentrado) y permeado (filtrado). El retenido es el efluente que no pasa a través de las membranas del ultrafiltro, puesto que, el tamaño de poro de la membrana es menor, este efluente puede contener polipéptidos, polisacáridos, virus, bacterias y quistes, según la procedencia del material filtrado. El permeado es la fracción que ha sido pasada a través de la membrana semipermeable y que contiene algunas moléculas pequeñas disueltas, como iones, agua y aminoácidos Divizia *et al.*, (1988).

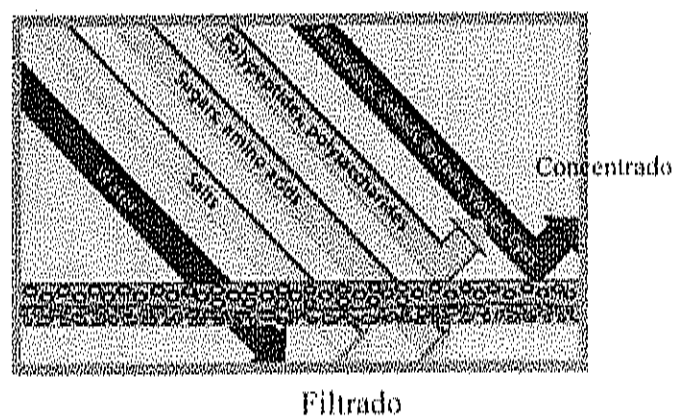


Figura 14. Membrana de ultrafiltración (Gurgle, 2007)

La naturaleza química y física de la membrana es quien controla los componentes que serán retenidos y cuáles no. La habilidad de la membrana de retener la mayoría de las moléculas de tamaño conocido es generalmente usada para especificar la porosidad de esta. El término usado es masa molecular de corte (MWCO, por sus siglas en inglés), de esta manera las partículas de una mayor masa molecular de corte al especificado por la membrana, quedarán en el retenido (concentrado), y las de menor masa molecular quedarán suspendidas en el permeado (filtrado) Caballero *et al.*, (2003).

Las membranas más usada para el sistema de ultrafiltración son hechas de polisulfona, en el presente estudio se empleo filtros a base de polisulfona para diálisis con un MWCO de 15000-20000, un área superficial de 1.8 m^2 y un diámetro de fibra interna de $200 \mu\text{m}$ (Hemoflow F80A Fresenius Medical Care USA).

Los sistemas de ultrafiltración que utilizan membranas de polisulfona pueden ser operados en un amplio rango de temperaturas (hasta 75°C), son compatibles con un amplio rango de pH (0.5-13), y su limpieza es fácil. Los tamaños de poro disponibles van de los 0.001 a los $0.02 \mu\text{m}$, además pueden sanitizarse, ya que son resistentes a cloro Caballero *et al.*, (2003); sin embargo, los sistemas de ultrafiltración que utilizan membranas de polisulfona presentan algunas desventajas atribuidas al diseño de la membrana, como el que deben ser operadas en un bajo rango de presión (170-700 kPa) y pueden contaminarse debido a que son reusables Caballero *et al.*, (2003).

Existen diversos reportes que señalan las eficiencias de recuperación. Hill *et al.*, (2005), lograron eficiencias de recuperación viral de un 70-93% para bacteriófagos inoculados en agua de grifo. Divizia *et al.*, (1988), obtuvieron eficiencias de recuperación del 100% inoculando hepatitis A en muestras de agua dulce, utilizando presiones de 10-12 psi.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Es el bacteriófago P22 un agente efectivo para el biocontrol de *Salmonella typhimurium*?

¿Cuántos logaritmos de *Salmonella typhimurium* puede reducir el bacteriófago P22?

¿*Salmonella typhimurium* y el bacteriófago P22 pueden sobrevivir en superficie de tomate a temperaturas de almacenamiento (10°C) y mercadeo (20°C), durante 7 días?

¿Se obtendrá a menor temperatura una mayor reducción de *Salmonella typhimurium* por efecto lítico del bacteriófago P22 en frutos de tomate?

¿El efecto bactericida del bacteriófago P22 aumentará en función del tiempo de contacto?

DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Los sistemas agrícolas convencionales generan una constante contaminación del medio ambiente, lo que ha ocasionado resistencia y adaptación de patógenos a desinfectantes, aumentando así la presencia de patógenos en frutos y por consiguiente un mayor riesgo a la salud de los consumidores. Adicionalmente, el uso de desinfectantes clorados genera subproductos tóxicos como los trihalometanos (THM) relacionados con un aumento en el riesgo de cáncer. Esto ha marcado la pauta hacia una agricultura orgánica, la cual está adquiriendo creciente importancia en el sector agrícola de algunos países. En Austria y en Suiza, la agricultura orgánica ha llegado a representar hasta un 10 por ciento del sistema alimentario, y en Estados Unidos, Francia, Japón y Singapur se han registrado tasas de crecimiento anual superiores al 20 por ciento (FAO, 1999).

El uso de bacteriófagos para reducir poblaciones de microorganismos patógenos representa una solución natural y segura. Podría beneficiar tanto a la agricultura convencional como a la agricultura orgánica, minimizando el riesgo ocasionado por la presencia de patógenos en superficies de frutas y hortalizas. Recientemente, se han realizado diversas investigaciones sobre el uso de bacteriófagos, como método de biocontrol, lo que ha generado resultados prometedores para reducir la presencia de microorganismos patógenos en precortados de melón y manzana; sin embargo, se carece de información científica que demuestre la efectividad de bacteriófagos en superficie de frutos completos.

JUSTIFICACIÓN

La agricultura orgánica va en aumento, en países como Estados Unidos, Francia, Japón y Singapur han registrando tasas de crecimiento anual superiores al 20 % (FAO, 1999). Sin embargo, este crecimiento se ve limitado debido a que se ha demostrado que frutas y hortalizas son contaminadas con diversos microorganismos patógenos, durante las etapas de la cadena productiva. Particularmente *Salmonella* generando un costo anual de \$2,467,322,866 dólares, originado por gastos médicos, perdidas por productividad y muerte. Costos que son debidos en parte a las limitaciones de los sistemas de desinfección actuales

Leverentz *et al.*, (2001) promueven investigaciones hacia la búsqueda de nuevas alternativas de desinfección enfocadas al uso de bacteriófagos para su implementación en la industria de precortados y así proporcionar a los consumidores productos más seguros. En este sentido, el uso de bacteriófagos para reducir poblaciones de microorganismos patógenos representa una alternativa biológica de descontaminación. Esta alternativa biológica se consolidó aun más cuando la FDA aprobó su uso directo en alimentos listos para su consumo (RTE, siglas en inglés). A partir de esta aprobación (2006), se generó una nueva alternativa biológica la cual permitirá darle certidumbre a la inocuidad de frutas y hortalizas orgánicas; sin embargo, información sobre la aplicación de bacteriófagos en frutos completos es aun limitada por lo cual, el objetivo de la presente investigación es determinar la efectividad del bacteriófago P22 en la supresión de *Salmonella typhimurium*, así como su sobrevivencia en frutos de tomate.

META

Generar información científica sobre la efectividad del bacteriófago P22 como alternativa biológica para eliminar *Salmonella typhimurium* inoculada en frutos de tomate.

METODOLOGÍA

Selección de frutos de tomate

Se utilizaron frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill tipo saladette), cosechado en estado de madurez 5 (rojo claro) y tamaño "large" con peso promedio de 120 g que coinciden con un área superficial de 106 cm². Los frutos fueron obtenidos del invernadero del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Culiacán. El corte de los tomates, se realizó de manera aséptica utilizando guantes estériles. Se realizaron cuatro experimentos, en cada uno se incluían 96 frutos libres de cortaduras, abrasiones y golpes. Los frutos de tomate fueron desinfectados por inmersión, utilizando cuatro contenedores, el primer contenedor contenía 4 L de hipoclorito de sodio (NaClO, Fermont) 300 mg/L; el segundo contenedor contenía 4 L de agua purificada estéril; el tercer contenedor contenía 4 L de tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃, Fermont) al 5% y el cuarto contenedor tenía 4 L de agua purificada estéril. Los 96 frutos fueron sumergidos durante 10 minutos, de manera secuencial en cada uno de los cuatro contenedores en el orden señalado. Para transferir los frutos a cada contenedor se utilizaron pinzas estériles. Una vez desinfectados los frutos, se colocaron en el interior de una campana de flujo laminar, sobre varillas de vidrio estériles, y se dejaron secar por 30 minutos. Finalmente, los frutos se colocaron en bolsas ziplock estériles y se almacenaron a 4°C durante 12 h previas a su uso.

Preparación de la cepa hospedero

Un control positivo de *Salmonella typhimurium* (ATCC 19585), fue obtenido del cepario del Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Alimentos (LMAA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Culiacán. Una colonia de *Salmonella typhimurium* fue inoculada en 6 L de caldo soya tripticaseína (TSB, siglas en inglés, Bioxon), se incubó por 24 horas a 37 °C, posteriormente el caldo de cultivo se concentró a 500 mL con un sistema de ultrafiltración (Figura 15), el cual incluye una bomba peristáltica (Cole-Parmer modelo 7524-40) y un filtro de fibra hueca hemoflow F80A (Fresenius Medical Care, Lexington, MA) a base de polisulfona con un corte de peso molecular (MWCO) de 15,000 a 20,000, un área de contacto de 1.8 m² y un diámetro interno de fibra de 200 µm Hill *et al.*, (2005). Dicho sistema permitió obtener un concentrado bacteriano de 500 mL.

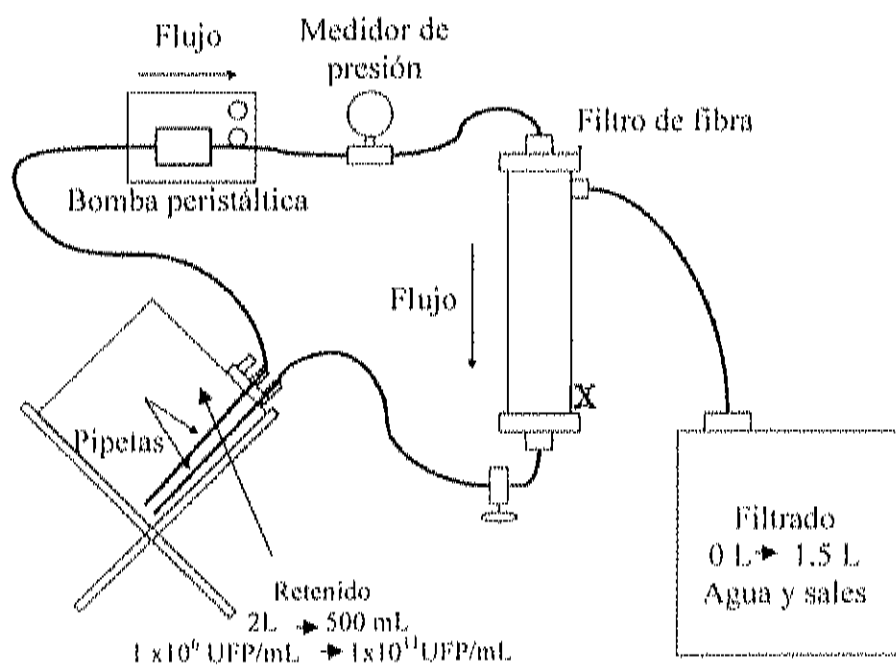


Figura 15. Sistema de ultrafiltración Hill *et al.*, (2005)

El concentrado bacteriano se colocó en tubos de centrifuga estériles y se centrifugaron a $13,080 \times g$ durante 10 minutos a 4°C (Thermo IEC Multi RF 120). El sedimento obtenido se lavó, resuspendió y centrifugó 2 veces en las condiciones descritas anteriormente, con 15 mL de solución buffer estéril (fosfato de potasio monobásico 0.01 M, pH 7.2). La concentración aproximada de la suspensión bacteriana fue determinada mediante el uso de un biofotómetro (Eppendorf modelo 22331), esta se ajustó a una densidad óptica (DO) de 1, medida a una longitud de onda (λ) de 600 nm, para obtener una concentración aproximada de 1×10^9 UFC/mL (Leverentz *et al.*, (2001). Finalmente, la concentración inicial de la suspensión bacteriana fue 4×10^9 UFC/mL y se determinó mediante la técnica de series de diluciones decimales (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8}) y siembra de 0.1 mL por duplicado, en placa que contenía agar selectivo Xilosa-Lisina-Desoxicolato (Madigan, 2000).

Propagación del bacteriófago P22 por el método de doble agar

Se utilizó el bacteriófago P22 (ATCC BAA-769-B1), obtenido del cepario del Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Alimentos (LMAA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Culiacán. Su propagación se realizó mediante la técnica de doble agar. Este método, consiste en vaciar un agar líquido que contiene la bacteria y a la dilución del bacteriófago, sobre un agar sólido (APHA, 1998).

El agar de sobre capa se preparó con caldo soya tripticaseína (TSB, siglas en inglés, Bioxon), adicionando 1% de agar bacteriológico. El agar sólido se preparó con agar soya tripticaseína (TSA 1.5 %, siglas en inglés, Bioxon). La preparación se muestra en el Anexo 2.

Para preparar la bacteria se tomó una colonia de *Salmonella* y se inoculó en 10 mL de TSB, se dejó incubar a 37°C toda la noche. Posteriormente, se tomó 1 mL de TSB conteniendo a la bacteria, y se colocó en 100 mL de TSB, el cual, se colocó en un baño de agua (Lab-Line, modelo 3580R) a 37°C con agitación 110 RPM por 3 horas, para obtener una densidad óptica (DO) de 1, medida a una longitud de onda (λ) de 600 nm. Tiempo en el cual la bacteria alcanza la fase logarítmica.

Brevemente, la técnica de doble agar consiste en vaciar un agar líquido que contiene la bacteria y la dilución del bacteriófago, sobre un agar sólido. Para esto, se colocaron tubos de ensayo con medio TSA al 1% en baño de agua (Felisa modelo

FE-373), a 45°C para derretir el agar, cuando este se encontró líquido y a una temperatura aproximada de 42°C, se colocó 1 mL de la bacteria y 0.1 mL del bacteriófago, se agitó con vortex y se vació sobre el agar sólido TSA 1.5%, se expandió por toda la caja y se eliminaron las burbujas. Después de solidificar se invirtieron las cajas y se incubaron por 24 h a 37 °C.

Después del tiempo determinado de incubación, las cajas petri se sacaron de la incubadora para realizar la recuperación del bacteriófago, la cual se realizó agregando 6 mL de solución buffer estéril (fosfato de potasio monobásico 0.01 M, pH 7.2) a la caja petri y se dejaron a temperatura ambiente por 3 horas en el interior de una campana de flujo laminar, el sobre nadante se colocó en tubos de centrifuga estériles, se centrifugó a 13,080 X g durante 10 minutos a 4 °C (Thermo IEC Multi RF 120), se filtró a través de una membrana de 0.2 µm y se recibió en 5 mL de extracto de carne estéril al 3% (APHA, 1998).

Para determinar la concentración del bacteriófago, se realizaron diluciones decimales del filtrado (10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8}), de cada dilución se tomó 0.1 mL y se realizó doble agar. La concentración final del bacteriófago fue de 1×10^{11} UFP/mL.

Propagación del bacteriófago P22 en buffer de fosfatos

La propagación de bacteriófagos mediante la técnica de doble agar genera residualidad de nutrientes procedentes del TSA, esto afecta la sobrevivencia de

Salmonella typhimurium y ocasiona disminución del efecto del bacteriófago P22 sobre la bacteria. Por tal motivo, la propagación del bacteriófago se realizó mediante la interacción de *Salmonella typhimurium* y el bacteriófago P22 en solución buffer estéril (fosfato de potasio monobásico 0.01 M, pH 7.2) Whichard *et al.*, (2003). En un recipiente estéril que contenía 2L de buffer estéril (fosfato de potasio monobásico 0.01 M, pH 7.2), se mezclaron 50 mL de *Salmonella typhimurium* (4×10^9 UFC/mL) con 5 mL de bacteriófago P22 a una concentración de 1×10^{11} UFP/mL. Esta mezcla se incubó en baño María (Lab-Line, modelo 3580R) a 37 °C con un tiempo de 24 h y 110 RPM. La mezcla, se concentró a 500 mL utilizando el sistema de ultrafiltración (Figura 13) y se colocó en tubos de centrifuga estériles para ser centrifugada a 13,080 X g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y filtrado a través de una membrana de 0.22 µm (Pall Gelman Sciences). Para determinar la concentración del bacteriófago, se realizaron diluciones decimales (10^{-1} , 10^{-6} , 10^{-8}), de cada dilución se tomó 0.1 mL y se realizó doble agar. La concentración final del bacteriófago fue 1×10^{11} UFP/mL.

Inoculación de frutos de tomate con *Salmonella*

La inoculación de los frutos se realizó por el método de inmersión descrito por Ukuku y Sapers (2001). La inoculación de los frutos se realizó como se indica en la Figura 16. Donde 64 de los 96 frutos se sumergieron durante 15 minutos en 6 L de suspensión bacteriana a una concentración de 4×10^9 UFC/mL con agitación constante. Posteriormente, los frutos fueron retirados de la suspensión bacteriana con

pinzas estériles para evitar cualquier contaminación, se colocaron sobre varillas de vidrio estériles en el interior de una cámara de enfriamiento y se dejaron secar 1 h Lang *et al.*, (2004).

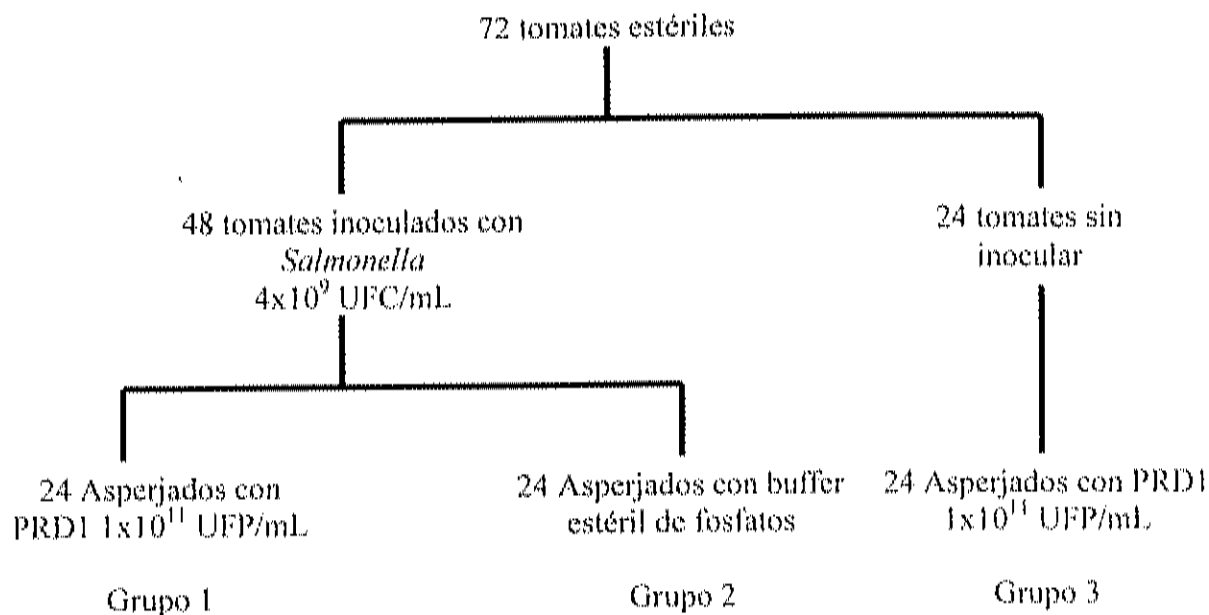


Figura 16. Inoculación de frutos de tomate

Aspersión de frutos de tomate con el bacteriófago P22

Se utilizó un aspersor manual previamente desinfectado y ambientado. Los frutos se asperjaron durante 45 segundos con el bacteriófago P22 a una concentración de 1×10^{11} UFP/mL y una distancia aproximada de 45 cm. La distancia y el tiempo de asperjado se tomaron simulando condiciones de empaque. Los frutos se dividieron en tres grupos (Figura 16).

Se realizaron en total 4 experimentos diseñados como se indica en la (Figura 16), dos experimentos para la temperatura de almacenamiento (10°C) y dos experimentos para

la temperatura de mercadeo (20°C). Posteriormente se procedió a la recuperación y recuento de los microorganismos, la cual se realizó cada 24 h durante 7 días.

Recuperación y recuento de *Salmonella* y bacteriófago P22

Para la recuperación de los microorganismos, se tomaron de manera aleatoria 3 tomates, cada fruto se colocó en una bolsa de plástico estéril conteniendo 100 mL de buffer de fosfatos (0.01 M, pH 7.2), se enjuagó frotando manualmente durante 1 minuto Hirota *et al.*, (2001), para desprender los microorganismos de la superficie de tomate.

Para el recuento de microorganismos, se realizaron diluciones decimales (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8}) y la cuantificación de *Salmonella* fue mediante extensión de 0.1 mL por duplicado, en placa que contenía agar selectivo XLD (Xilosa-Lisina-Desoxicolato) (Madigan, 2000). La concentración del bacteriófago se determinó mediante la técnica de doble agar (APHA, 1998). Los resultados se reportaron en UFP/tomate.

Análisis experimental

La sobrevivencia de *Salmonella* en frutos de tomate, se analizó con un diseño de un factor en bloque aleatorizados completos:

- Tiempo (Factor)
 - » 8 Niveles (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h)
 - » Temperatura (Bloque)
 - » 2 Niveles (10 y 20°C)
- Unidad experimental: tomate (6 réplicas por tratamiento)

La sobrevivencia del bacteriófago P22 en frutos de tomate, se analizó con un diseño de dos factores en bloque aleatorizados completos:

- Temperatura (Bloque)
 - » 2 Niveles (10 y 20°C)
- Microorganismo (Factor)
 - » Bacteriófago P22
 - » Bacteriófago P22 + *Salmonella*
- Tiempo (Factor)
 - » 8 Niveles (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h)
- Unidad experimental: tomate (6 réplicas por tratamiento)

El control de *Salmonella* mediante bacteriófago P22 en frutos de tomate, se analizó con un diseño de dos factores en bloque aleatorizados completos:

- Temperatura (Bloque)
 - » 2 Niveles (10 y 20°C)
- Microorganismo (factor)
 - » *Salmonella*
 - » *Salmonella* + Bacteriófago P22
- Tiempo (factor)
 - » 8 Niveles (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h)
- Unidad experimental: tomate (6 réplicas por tratamiento)

Se realizó un análisis de varianza y se realizaron comparaciones múltiples de las medias mediante la prueba de Tukey para detectar las diferencias significativas ($P < 0.05$). El análisis de datos se realizó con el programa estadístico MINITAB 14 (Minitab Inc., State Collage, PA).

RESULTADOS

Sobrevivencia de *Salmonella* en la superficie de frutos de tomate

Los resultados que se muestran en la Figura 17 corresponden a la población de *Salmonella typhimurium* en frutos de tomate monitoreada durante 7 días a 10 °C. Se encontró que *Salmonella* sobrevivió durante todo el experimento, manteniendo concentraciones elevadas. La concentración promedio de *Salmonella* durante todo el experimento fue de 6.29 Log₁₀ UFC/tomate, teniendo concentraciones mínimas de 5.83 Log₁₀ UFC/tomate a las 48 horas y concentraciones máximas de 6.5 Log₁₀ UFC/tomate al tiempo cero. Los resultados indican que a temperatura de almacenamiento de 10 °C *Salmonella* tiene la capacidad de sobrevivir en frutos de tomate durante 7 días.

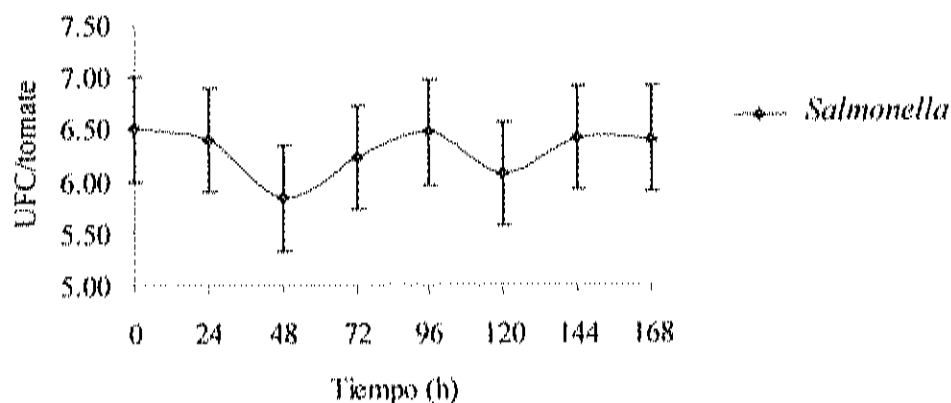


Figura 17. Población de *Salmonella* en frutos de tomate a 10°C

En frutos de tomate a temperatura de 20 °C, *Salmonella* aumento su población durante los 7 días del experimento (Figura 18). La concentración promedio de *Salmonella* durante todo el experimento fue de 7.69 Log₁₀ UFC/tomate. Los títulos iniciales al tiempo 0 corresponden a 7.1 Log₁₀ UFC/tomate, aumentando a 8.32 Log₁₀ UFC/tomate a las 168 h; lo que representa un incremento de la población de 1.22 Log₁₀ UFC/tomate. Los resultados indican que a temperatura de mercadeo de 20 °C *Salmonella* tiene la capacidad de aumentar su población en frutos de tomate durante 7 días.

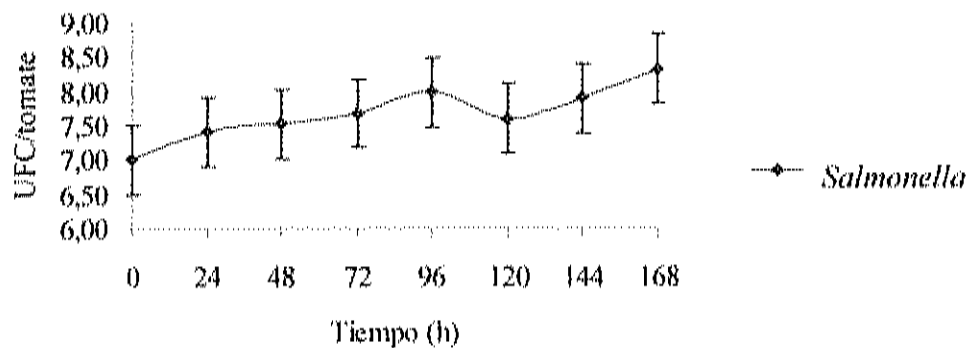


Figura 18. Población de *Salmonella* en frutos de tomate a 20°C

Análisis de varianza de la sobrevivencia de *Salmonella* en la superficie de frutos de tomate a temperatura de 10 y 20°C

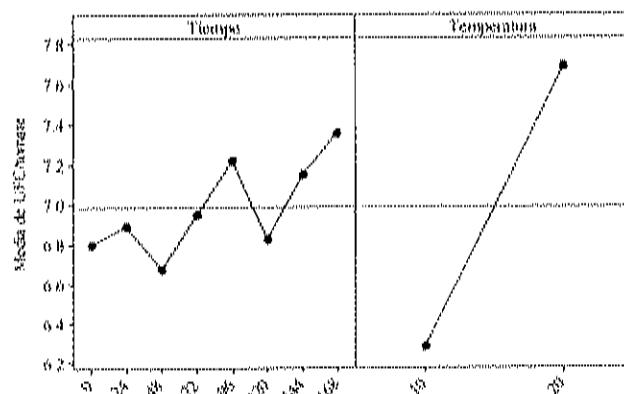
El Cuadro 10 se muestra el análisis de varianza de la sobrevivencia de *Salmonella* en frutos de tomate. Se encontró diferencias significativas ($P < 0.05$) en los factores temperatura (bloque) y tiempo.

Cuadro 10. ANOVA de sobrevivencia de *Salmonella* en frutos de tomate a 10 y 20°C

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Temperatura	1	46,162	46,1621	377,73	0,000
Tiempo	7	4,910	0,7014	5,74	0,000
Error	87	10,632	0,122		
Total	95	61,704			

Efectos principales de la sobrevivencia de *Salmonella* en la superficie de frutos de tomate a temperatura de 10 y 20°C

De acuerdo a la gráfica de efectos principales (Figura 19), a temperatura de almacenamiento de 10°C se encontraron las poblaciones de *Salmonella* más bajas, siendo esta temperatura la más desfavorable para el desarrollo de la bacteria; sin embargo, *Salmonella* logra sobrevivir a concentraciones elevadas. A temperatura de mercadeo de 20°C las poblaciones de *Salmonella* se incrementaron siendo esta temperatura la más favorable para el desarrollo de la bacteria en frutos de tomate. En relación al tiempo de contacto, se observó un comportamiento oscilante con períodos de aumento y disminución; sin embargo con mayor tendencia al aumento de las poblaciones de *Salmonella*.

Figura 19. Efectos principales de la sobrevivencia de *Salmonella*

Interacciones de la sobrevivencia de *Salmonella* en la superficie de frutos de tomate a temperatura de 10 y 20°C

En la gráfica de interacciones (Figura 20), podemos observar que a temperatura de mercadeo de 20°C, se incrementa de manera constante la población de *Salmonella* logrando la mayor población a las 168 h. Cabe señalar que en algunos experimentos se monitoreo hasta las 216 h y las poblaciones seguían en aumento (Datos no mostrados). A temperatura de almacenamiento de 10°C la población de *Salmonella* presentó un comportamiento oscilante con dos periodos de disminución y dos de aumento. En relación a los periodos de disminución, el primero fue del tiempo cero al 48 con una disminución de 0.67 Log₁₀ UFC/tomate y el segundo periodo fue del tiempo 96 al 120 con una disminución de 0.4 Log₁₀ UFC/tomate. En relación a los periodos de aumento de la población el primero fue del tiempo 48 al 96 con un incremento de 0.63 Log₁₀ UFC/tomate y el segundo periodo fue del tiempo 120 al 144 con un incremento de 0.35 Log₁₀ UFC/tomate. A temperatura de almacenamiento a tiempo 48, se registró la población de *Salmonella* más baja. Se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tukey, encontrando que sólo el tiempo de 48 h presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al resto de los tiempos.

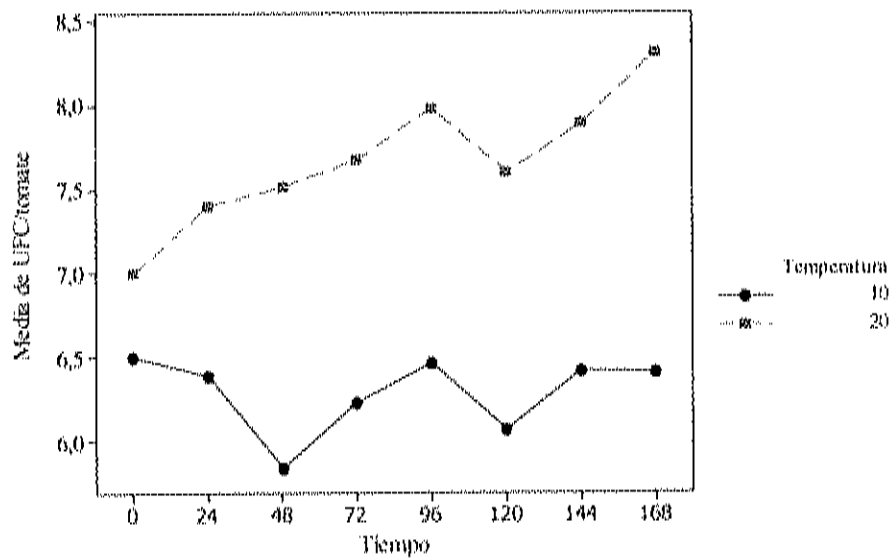


Figura 20. Interacciones de la sobrevivencia de *Salmonella*

Sobrevivencia del bacteriófago P22 en la superficie de frutos de tomate

Los resultados de la Figura 21 corresponden a la población de bacteriófago P22 en presencia y ausencia de *Salmonella typhimurium*, en frutos de tomate monitoreada durante 7 días. A temperatura de almacenamiento de 10 °C, se encontró que el bacteriófago P22 persiste durante todo el experimento, manteniendo concentraciones elevadas. El tiempo cero fue el único punto donde los títulos tanto del control (bacteriófago) como del tratamiento (*Salmonella* + bacteriófago), fueron similares. A partir de las primeras 24 horas, se encontraron títulos mayores del bacteriófago en los frutos tratamiento (*Salmonella* + bacteriófago) con respecto a los frutos control (asperjados con el bacteriófago).

Se observó una diferencia promedio de 0.24 UFP/tomate entre el control (bacteriófago) y el tratamiento (*Salmonella* + bacteriófago); sin embargo la mayor diferencia fue de 0.6 Log₁₀ UFP/tomate y se registró a las 48 h.

En los frutos tratamiento (*Salmonella* + bacteriófago), los títulos iniciales del bacteriófago fueron de 11.02 Log₁₀ UFP/tomate y disminuyeron a 7.23 Log₁₀ UFP/tomate a las 168 h, lo que representa una disminución de la concentración del bacteriófago de 3.79 Log₁₀ UFP/tomate. En los frutos asperjados sólo con bacteriófago (control), los títulos iniciales fueron de 11.08 Log₁₀ UFP/tomate y disminuyeron a 7.05 Log₁₀ UFP/tomate a las 168 h, lo que representa una decremento de la concentración del bacteriófago de 4.03 Log₁₀ UFP/tomate. Los resultados indican que a temperatura de almacenamiento de 10°C el bacteriófago P22 tiene la capacidad de persistir en frutos de tomate durante 7 días.

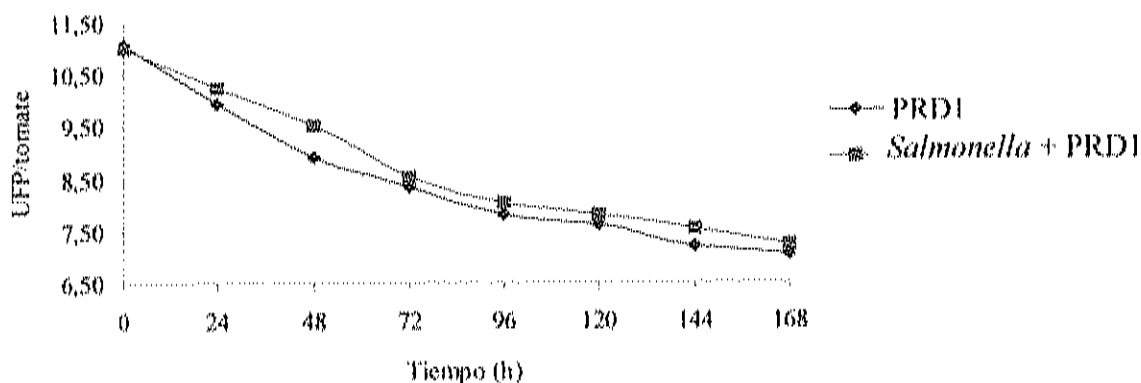


Figura 21. Población del bacteriófago P22 en frutos de tomate a 10°C

En frutos de tomate a temperatura de mercadeo de 20 °C (Figura 22), se mantiene el comportamiento registrado en la temperatura de almacenamiento de 10°C. Se

encontraron títulos mayores del bacteriófago en los frutos tratamiento (*Salmonella* + bacteriófago), con respecto a los frutos control (bacteriófago); sin embargo la diferencia promedio que registraron los títulos del bacteriófago (control) y el tratamiento (*Salmonella* + bacteriófago), fueron mayores (1.27 Log₁₀ UFP/tomate) a temperatura de mercadeo con respecto a la temperatura de almacenamiento (0.24 UFP/tomate). La mayor diferencia entre el control y tratamiento fue de 1.81 UFP/tomate a las 96 h. Esta diferencia en los títulos del bacteriófago entre control (bacteriófago) y tratamiento (*Salmonella* + bacteriófago), podría estar relacionada con una mayor capacidad de *Salmonella* para crecer a 20°C, encontrando así el bacteriófago mayor cantidad de células hospederas para replicarse aumentando sus títulos.

En los frutos tratamiento (*Salmonella* + bacteriófago), se registraron títulos iniciales del bacteriófago de 11.6 Log₁₀ UFP/tomate y disminuyó a 8.36 Log₁₀ UFP/tomate al tiempo 168 h, lo que representa una disminución de la concentración del bacteriófago de 3.24 Log₁₀ UFP/tomate. En los frutos control (bacteriófago), los títulos iniciales fueron de 11.01 Log₁₀ UFP/tomate y disminuyó a 6.9 Log₁₀ UFP/tomate a las 168 h, lo que representa una disminución de la concentración del bacteriófago de 4.11 Log₁₀ UFP/tomate. Los resultados demuestran una mayor capacidad de sobrevivencia del bacteriófago a temperaturas de mercadeo de 20°C, en frutos de tomate durante 7 días.

Este comportamiento está relacionado a la capacidad de crecimiento que presenta *Salmonella* a temperatura de mercadeo de 20°C y de esta manera el bacteriófago

encontraría mayores poblaciones de células huésped por infectar produciendo mayores títulos del bacteriófago.

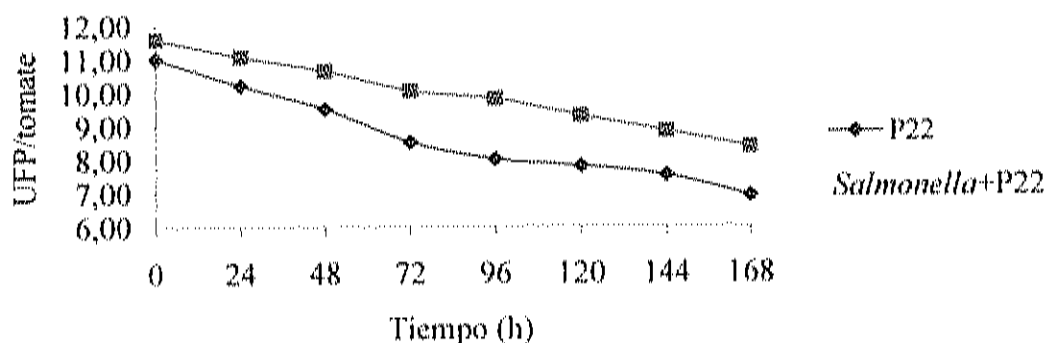


Figura 22. Población de bacteriófago P22 en frutos de tomate a 20°C

Análisis de varianza de la sobrevivencia del bacteriófago P22 en la superficie de frutos de tomate a temperatura de 10 y 20°C

El Cuadro 11 muestra el análisis de varianza de la sobrevivencia del bacteriófago P22 en frutos de tomate a temperatura de 10 y 20°C, durante los 7 días del experimento. Se encontró diferencias significativas ($P < 0.05$) en los factores microorganismo, temperatura, tiempo (bloque), en la interacción microorganismo-tiempo se encontró valores de $P = 0.067$ ligeramente superior al valor establecido; sin embargo, consideramos que es alta su probabilidad.

El nivel de significancia es el nivel máximo de cometer un error tipo I. Generalmente se escoge $p < 0,05$ que es menos del 5% la probabilidad de cometer este error o menos de 1 en 20 esta posibilidad. Cuando el nivel escogido de p es $< 0,01$ equivale a una probabilidad menor del 1% o 1 en 100. Un $p = 0,05$ significa una posibilidad de

encontraría mayores poblaciones de células huésped por infectar produciendo mayores títulos del bacteriófago.

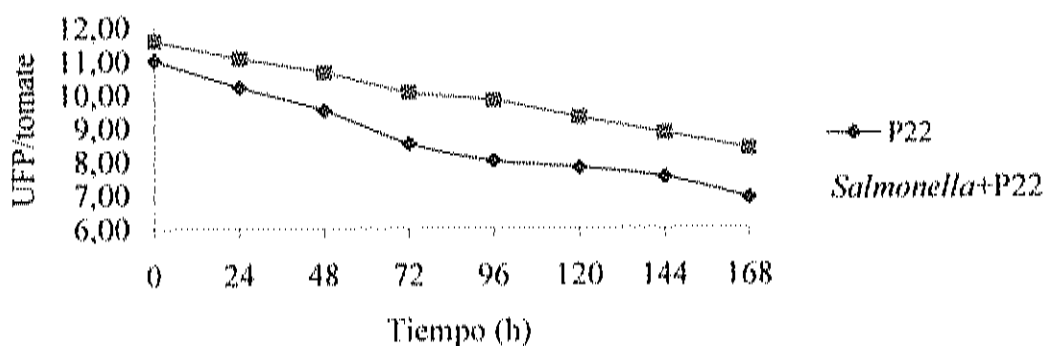


Figura 22. Población de bacteriófago P22 en frutos de tomate a 20°C

Análisis de varianza de la sobrevivencia del bacteriófago P22 en la superficie de frutos de tomate a temperatura de 10 y 20°C

El Cuadro 11 muestra el análisis de varianza de la sobrevivencia del bacteriófago P22 en frutos de tomate a temperatura de 10 y 20°C, durante los 7 días del experimento. Se encontró diferencias significativas ($P < 0,05$) en los factores microorganismo, temperatura, tiempo (bloque), en la interacción microorganismo-tiempo se encontró valores de $P = 0,067$ ligeramente superior al valor establecido; sin embargo, consideramos que es alta su probabilidad.

El nivel de significancia es el nivel máximo de cometer un error tipo I. Generalmente se escoge $p < 0,05$ que es menos del 5% la probabilidad de cometer este error o menos de 1 en 20 esta posibilidad. Cuando el nivel escogido de p es $< 0,01$ equivale a una probabilidad menor del 1% o 1 en 100. Un $p = 0,05$ significa una posibilidad de

sólo 1 en 20 que los resultados obtenidos se deban al azar lo que parecería significativo. Viéndolo de otra manera tengo 19 de 20 posibilidades que la diferencia encontrada no se deba al azar, pero un $p = 0,06$ si bien no parecería significativo sigue siendo alta su probabilidad (17 de 18) de no deberse al azar, por lo que debería concluirse con este p la necesidad de un trabajo de investigación posterior.

Cuadro 11. ANOVA de la sobrevivencia del bacteriófago P22 en frutos de tomate a 10 y 20°C

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Temperatura	1	24.218	24.218	144.470	0.000
Microorganismo	1	27.535	27.535	164.260	0.000
Tiempo	7	294.557	42.080	251.020	0.000
Microorganismo*Tiempo	7	2.265	0.324	1.930	0.067
Error	175	29.336	0.168		
Total	191	377.911			

Efectos principales de la sobrevivencia del bacteriófago P22 en la superficie de frutos de tomate a temperatura de 10 y 20°C

En la gráfica de efectos principales (Figura 23), se observa el factor microorganismo, donde encontramos durante los experimentos mayores títulos del bacteriófago P22 cuando estaba presente la bacteria huésped. Se encontró una diferencia promedio de 0.78 Log_{10} UFP/tomate entre los frutos que estaban inoculados con el bacteriófago y los que estaban inoculados con *Salmonella* + bacteriófago. Lo que significa que el bacteriófago necesita el hospedero para mantener concentraciones mayores.

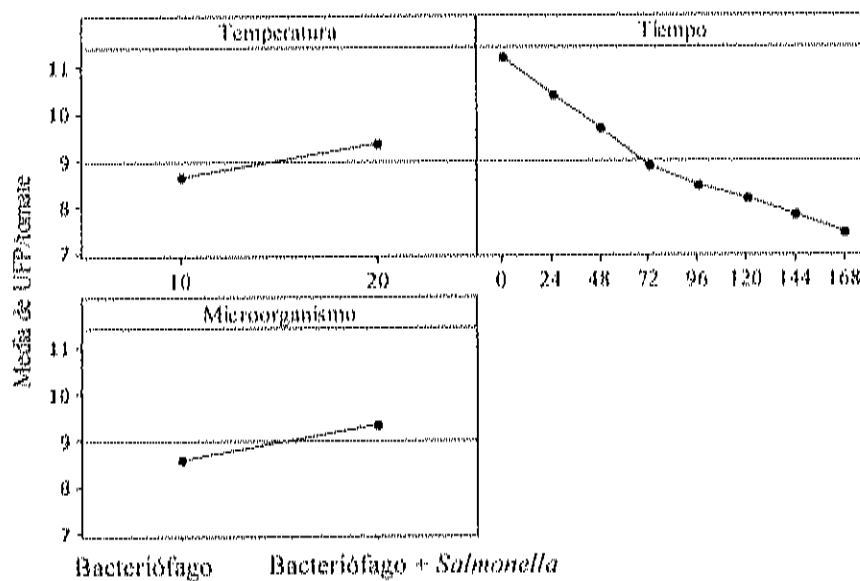


Figura 23. Efectos principales de la sobrevivencia del bacteriófago P22

En relación al factor temperatura, se observan títulos mayores del bacteriófago a temperatura de mercadeo de 20°C, se encontró una diferencia promedio de 0.7 Log_{10} UFP/tomate entre los frutos que estaban inoculados con el bacteriófago y los que estaban inoculados con *Salmonella* + bacteriófago.

En relación al factor tiempo, podemos observar una disminución gradual de los títulos del bacteriófago P22, durante los 7 días del experimento. Los títulos iniciales promedio del bacteriófago fueron de 11,17 Log₁₀ UFP/tomate y disminuyó a 7,38 Log₁₀ UFP/tomate a las 168 h, lo que representa una disminución de la concentración del bacteriófago de 3,79 Log₁₀ UFP/tomate. A pesar de la disminución en los títulos del bacteriófago al día 7, consideramos que siguen siendo títulos altos que generarían un efecto de protección en caso de que *Salmonella* contaminara los frutos en alguna etapa de la cadena productiva.

Interacciones de la sobrevivencia del bacteriófago P22 en la superficie de frutos de tomate a temperatura de 10 y 20°C

En la gráfica de interacciones (Figura 24), podemos observar que a medida que transcurre el tiempo de contacto los títulos del control (bacteriófago) y tratamiento (*Salmonella* + bacteriófago), se ven disminuidos; sin embargo, en todo el experimento los títulos del tratamiento (*Salmonella* + bacteriófago), fueron mayores. Se encontró que a mayor tiempo de contacto entre bacteriófago y bacteria hospedero podemos observar una mayor diferencia en los títulos del control (bacteriófago) y tratamiento (bacteriófago + *Salmonella*). Al tiempo cero la diferencia fue de 0,26 Log₁₀ UFC/tomate y la mayor diferencia fue de 0,89 Log₁₀ UFC/tomate a las 168 h. Lo que demuestra que el bacteriófago necesita la presencia de la bacteria hospedera para persistir con títulos mayores a las temperaturas evaluadas.

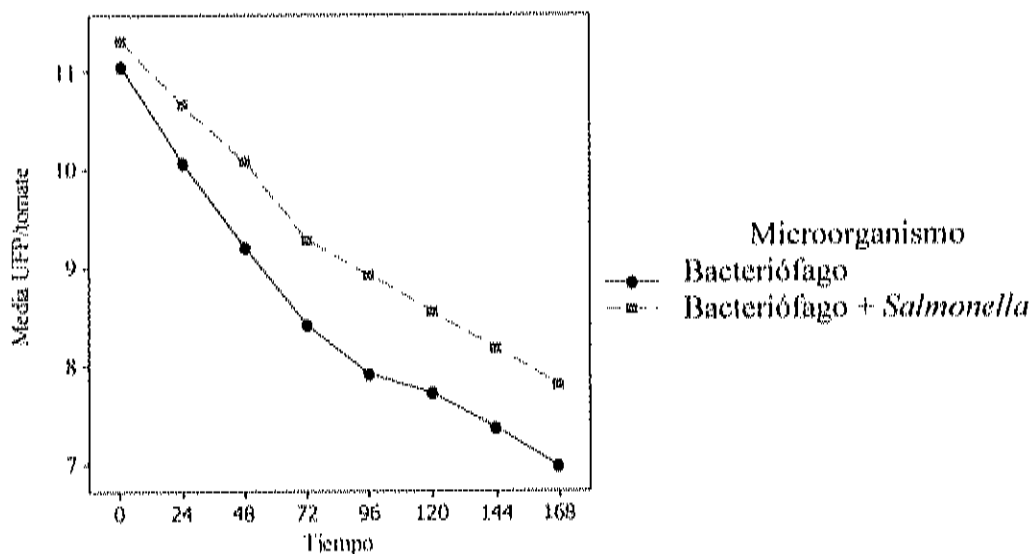


Figura 24. Interacciones de la sobrevivencia del bacteriófago P22

Control de *Salmonella* mediante bacteriófago P22 en la superficie de frutos de

tomate

Los resultados de la Figura 25 corresponden a la población de *Salmonella* en presencia y ausencia del bacteriófago (tratamiento), en frutos de tomate monitoreada durante 7 días. A temperatura de almacenamiento de 10°C, se observó que el bacteriófago P22 mostró una interacción positiva con *Salmonella typhimurium* al mostrar una reducción máxima de 3.02 Log₁₀ UFC/tomate a las 168 horas al compararla con la concentración bacteriana del control (*Salmonella*) al tiempo cero. La diferencia promedio entre el control (*Salmonella*) y el tratamiento (*Salmonella* + bacteriófago), durante todo el experimento fue de 1.38 Log₁₀ UFC/tomate. Durante todo el experimento se encontraron poblaciones de *Salmonella* mayores en el control

(*Salmonella*) con respecto a los frutos tratamiento (*Salmonella* + bacteriófago). Para determinar la reducción del bacteriófago P22 sobre *Salmonella* se tomó como base el estudio de Leverentz *et al.*, (2001) donde compararon la concentración al tiempo cero del control (*Salmonella enteritidis*) con respecto la concentración del mejor dato del tratamiento (*Salmonella enteritidis* + bacteriófago SCPLX-1).

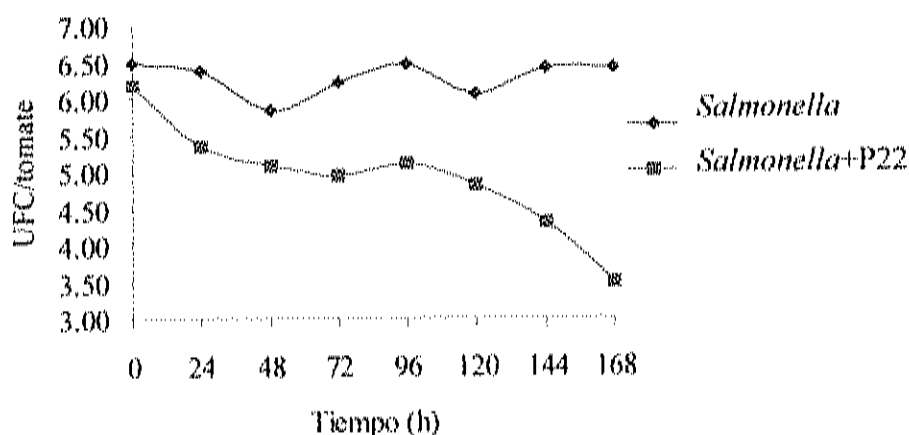


Figura 25. Reducción de *Salmonella* en frutos de tomate a 10°C

Los resultados de la Figura 26 corresponden a la reducción de *Salmonella typhimurium*, en frutos de tomate. A temperatura de mercadeo (20°C), se observó que el bacteriófago P22 mostró una interacción positiva con *Salmonella typhimurium*; sin embargo, la reducción fue de 0.7 Log₁₀ UFC/tomate a las 168 horas al compararla con la concentración bacteriana del control (*Salmonella*) al tiempo cero. Cabe señalar que al comparar la concentración bacteriana del control (*Salmonella*) y el tratamiento (*Salmonella* + bacteriófago) a las 168 h encontramos una reducción de 1.82 UFC/tomate; sin embargo, consideramos el estudio realizado por Leverentz *et al.*, (2001), donde para determinar la reducción del bacteriófago SCPLX-1 sobre

Salmonella enteritidis, compararon la concentración al tiempo cero del control con respecto la concentración del mejor dato del tratamiento (*Salmonella* + bacteriófago).

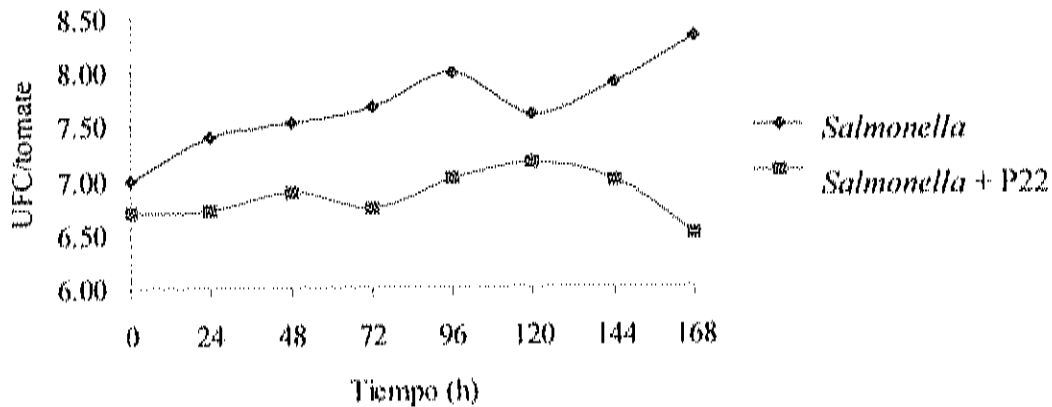


Figura 26. Reducción de *Salmonella* en frutos de tomate a 20°C

Análisis de varianza de la reducción de *Salmonella typhimurium* en la superficie de frutos de tomate a 10 y 20°C

El Cuadro 12 muestra el análisis de varianza de la reducción de *Salmonella typhimurium* en frutos de tomate a 10 y 20°C, durante los 7 días del experimento. Encontramos diferencias significativas ($P < 0.05$) en todos los factores: microorganismo, temperatura, tiempo (bloque), así como en la interacción microorganismo-tiempo. Era de esperarse la diferencia en la temperatura ya que se bloqueo en el diseño.

Cuadro 12. ANOVA de la reducción de *Salmonella typhimurium* en frutos de tomate a 10 y 20°C

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Temperatura	1	134.45	133.45	680.22	0.000
Microorganismo	1	58.245	58.245	296.89	0.000
Tiempo	7	3.358	0.48	2.45	0.020
Microorganismo*Tiempo	7	15.39	2.199	11.21	0.000
Error	175	34.333	0.196		
Total	191	244.776			

Efectos principales de la reducción de *Salmonella typhimurium* en la superficie de frutos de tomate a 10 y 20°C

En la gráfica de efectos principales (Figura 27), se observa la interacción positiva del bacteriófago P22 sobre *Salmonella typhimurium*; se observa que la mayor reducción de *Salmonella typhimurium* se logró a temperatura de almacenamiento de 10°C y que a medida que aumenta el tiempo de contacto aumenta la reducción de *Salmonella*.

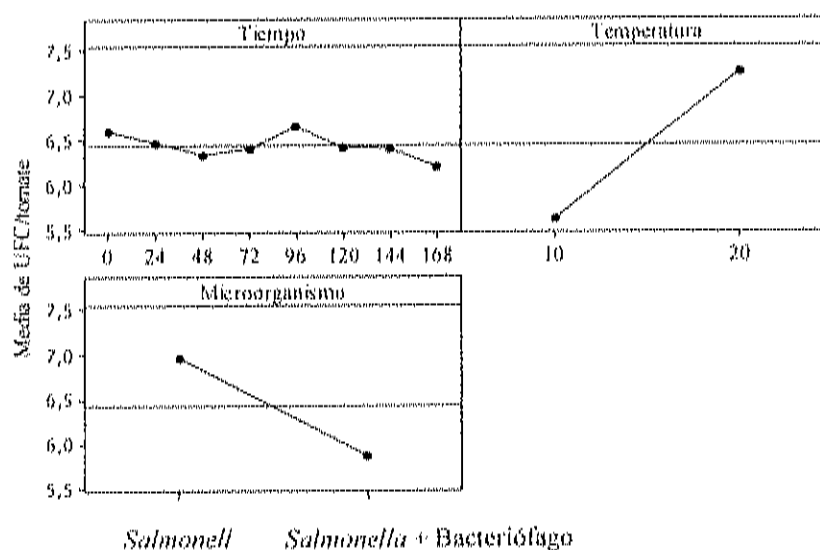


Figura 27. Efectos principales de la sobrevivencia de *Salmonella typhimurium* en frutos de tomate a 10 y 20°C

Interacciones de la reducción de *Salmonella typhimurium* en la superficie de frutos de tomate a 10 y 20°C

En la Figura 28, podemos observar en el tratamiento (*Salmonella* + bacteriófago) que a medida que disminuye la temperatura aumenta la reducción de *Salmonella typhimurium*. En el caso del control (*Salmonella*), podemos observar que a medida que aumenta la temperatura aumenta la población de *Salmonella typhimurium*. En relación al tiempo de contacto, al aumentar este combinado con temperaturas de mercadeo de 20°C, encontramos una menor reducción y a temperaturas de almacenamiento de 10°C, encontramos mayor reducción.

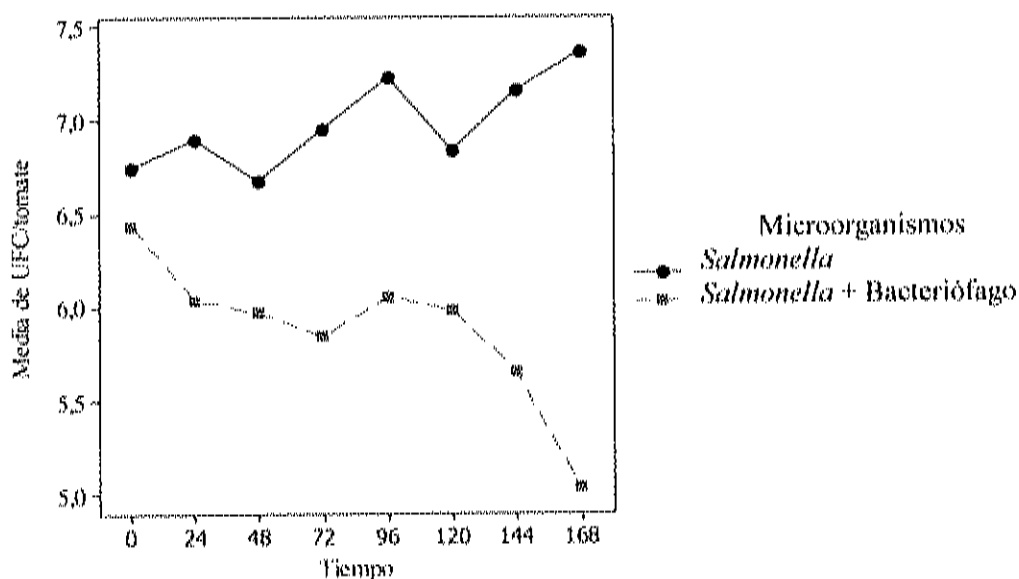


Figura 28. Interacciones de la reducción de *Salmonella typhimurium* en frutos de tomate a 10 y 20°C

DISCUSIÓN

Sobrevivencia de *Salmonella typhimurium* en la superficie de frutos de tomate

El presente estudio demuestra la capacidad de *Salmonella typhimurium* de persistir a temperaturas de almacenamiento de 10°C y aumentar su población a temperaturas de mercadeo de 20°C durante los 7 días del experimento. Estos resultados ponen en evidencia el riesgo que pueden correr los consumidores, en caso de que las frutas y hortalizas sean contaminados con *Salmonella typhimurium* en algún punto de la cadena productiva. La contaminación de los frutos no sólo puede ocurrir en campo y empaque si no también durante su transporte, almacenamiento, distribución, preparación en restaurantes y hogares (FAO, 2006). Se estima que más de un 50 % de las infecciones diarreicas ocurre en los hogares (Jansen and Gerba, 2005). Esto puede ser debido a la sobrevivencia que presentan los microorganismos patógenos en frutos de frutos. En este sentido, consideramos la importancia de los resultados de la presente investigación, debido a que el tomate de exportación de Sinaloa tarda aproximadamente 5 días para ser colocado en tiendas de autoservicio de California y 7 días al punto más lejano que es la costa este de los Estados Unidos de América. Tiempo en que la población de *Salmonella typhimurium* registró concentraciones bacterianas altas, de 6.4 Log₁₀ UFC/tomate a las 168 h a temperatura de almacenamiento (10°C) y de 8.32 Log₁₀ UFC/tomate a las 168 h a temperatura de mercadeo (20°C). Leverentz *et al.*, (2001) señalan que la temperatura de

almacenamiento de los frutos es fundamental para mantener los niveles de contaminación bajos e impedir el desarrollo de microorganismos patógenos que pudieran poner en riesgo la salud del consumidor. Reportes que concuerdan con los resultados del presente estudio ya que a temperatura de almacenamiento de 10°C se impidió el desarrollo de *Salmonella typhimurium*, en cambio a temperatura de mercadeo de 20°C la población de *Salmonella* se incremento 1 Log₁₀ UFC/tomate; sin embargo, nuestros resultados difieren de los obtenidos por Leverentz *et al.*, (2001), en relación al incremento de las poblaciones registradas en sus experimentos, donde encontraron en melón un crecimiento de 5 Log₁₀ y en manzana de 2 Log₁₀ esto a temperatura de mercadeo (20°C) y a temperatura de (10°C) encontraron reducciones de 1.5 Log₁₀ para manzana y de 3.3 para melón. Cabe señalar que el experimento fue realizado en precortados de melón y manzana, lo que proporciona mayor disponibilidad de nutrientes y humedad para el desarrollo de microorganismos. A lo cual atribuimos la diferencia con nuestros resultados.

Por su parte Castro del Campo *et al.*, (2004), determinaron la sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en cubos de 2 cm³ de tomate, pepino, mango y melón a 25 y 4°C, monitorearon la sobrevivencia durante 5 días. Se observó que *Staphylococcus aureus* sobrevive por mayor tiempo en los frutos mínimamente procesados, ya que se obtuvo una concentración mayor a la inoculada al término del estudio. El desarrollo de *Escherichia coli* no fue inhibido por las temperaturas de almacenamiento. Por lo que los autores concluyeron que deben tomarse precauciones para prevenir la contaminación de ensaladas o productos mínimamente procesados durante su preparación en hogares o restaurantes, ya que una vez contaminados los

alimentos, la temperatura de refrigeración no constituye una limitante en el desarrollo y sobrevivencia de estos organismos patógenos.

Cuando los frutos son contaminados con microorganismos patógenos en algún punto de la cadena productiva, su sobrevivencia y crecimiento en la frutos de los frutos se ve influenciada por el microorganismo, fruto y condiciones ambientales o de almacenamiento (FDA, 2001). La asociación de los microorganismos patógenos a frutos completos depende de varios factores así como el medio ambiente en el que la planta y los frutos se desarrollan, el pH de los tejidos y la presencia de factores antimicrobianos en la frutos o dentro de los frutos (Burnett *et al.*, 2000).

El crecimiento de patógenos en superficies intactas de frutos no es común debido a la incapacidad de los microorganismos patógenos para producir enzimas necesarias para romper las barreras protectoras. Esto restringe la disponibilidad de nutrientes y humedad; sin embargo estudios realizados por Van Loosdrecht *et al.*, (1987) indican que *Escherichia coli* O157:H7 crece en frutos de sandía y melón. La proliferación poscosecha de microorganismos patógenos puede comprometer la integridad de la piel y alterar el pH del producto, de esta forma aumenta el crecimiento y sobrevivencia de microorganismos patógenos (Conway *et al.*, 2000). El pH es un factor importante y favorece la inactivación de bacterias cuando sus valores son bajos. Algunas frutas como manzana y naranjas son más ácidas, lo cual limita el crecimiento de patógenos. Algunos melones y frutas suaves tienen valores de pH que son superiores a 5.0 y permiten el crecimiento de bacterias patógenas (Nguyen-the and Carlin, 1994; Del Rosario and Beuchat, 1995; Beuchat, 1996).

La temperatura juega un papel importante en la sobrevivencia de patógenos en la superficie de frutas y hortalizas (Gawande and Bhagwat, 2002). Splittstoesser (1970) señala que puede presentarse una multiplicación exponencial de bacterias cuando la temperatura se incrementa y las condiciones de humedad se mantienen. Estudios realizados por Richert *et al.*, (2000) indican que *Escherichia coli* O157:H7 puede sobrevivir en brócoli, pepino y chile pimiento cuando se mantienen a 4°C y mantiene sus poblaciones bacterianas iniciales o crece a 15°C. Mientras el crecimiento de microorganismos patógenos puede ser inhibido por bajas temperaturas, la sobrevivencia puede ser aumentada bajo ciertas condiciones. Por ejemplo: Iturriaga *et al.*, (2007) estudiaron la colonización de la frutos de tomate por *Salmonella montevideo* y su afectación por factores como temperatura y humedad relativa, encontraron que a 22°C *Salmonella* puede incrementar su población en 2 Log₁₀ UFC/fruto. Del Rosario y Beuchat (1995), estudiaron la capacidad de *E. coli* O157:H7 para crecer y sobrevivir en cubos de melones y sandía, así como en sus cortezas. La población bacteriana aumentó significativamente en ambas frutas entre 4 y 6 horas y continuaron creciendo hasta alcanzar un máximo de 6.81 Log₁₀ UFC/g en los cubos de melón y 8.51 Log₁₀ UFC/g en los cubos de sandía almacenadas a 25°C, pero el número de células viables no sufrieron cambios significativos a 5°C alrededor de 34 horas. También determinaron la sobrevivencia de este patógeno en corteza de melón y sandía almacenados a 25 y 5°C y se observó un incremento significativo de la población a 25°C en 4 días y luego se estabilizó hasta los 21 días de almacenamiento, sin embargo, en las muestras almacenadas a 5°C la muerte celular fue rápida en los primeros cuatro días y se detectaron células viables hasta los 14 días de almacenamiento.

Annous *et al.*, (2005), señalaron que bajas temperaturas de refrigeración pueden suprimir el crecimiento de microorganismos patógenos y altas temperaturas permiten que microorganismos como *Salmonella* puedan formar biofilmes; Annous *et al.*, (2005), monitorearon la formación de biofilmes o biopelículas mediante microscopía electrónica de barrido, analizando cortes de melón a las 2, 24, 48, 72 y 144 h postinoculación. Encontraron la presencia de materia fibrilar a las dos horas a 20°C y después de 24 h a 10 y 20°C las células se encontraban embebidas de un polímero extracelular característico de un biofilme. Por su parte (Brandl and Mandrell, 2002), demostraron la formación de biofilmes de *Salmonella enterica* y *Thompson* en hojas de cilantro. Concluyeron que la formación del biofilme dependía de la temperatura de almacenamiento y humedad relativa.

Sobrevivencia de bacteriófago P22 en la superficie de frutos de tomate

El bacteriófago P22 persiste durante más de 7 días en frutos de tomate a temperatura de almacenamiento de 10°C y temperatura de mercadeo de 20°C, tanto en presencia como en ausencia de *Salmonella*; sin embargo, sobrevive con títulos mayores en presencia del huésped a 20°C, lo cual es atribuido a que es una temperatura que permite el desarrollo de la bacteria huésped. Nuestros resultados demuestran la capacidad que tiene el bacteriófago P22 para sobrevivir y actuar contra *Salmonella typhimurium* en caso de contaminarse los frutos en alguna etapa de la cadena productiva. El bacteriófago P22, proporcionaría un efecto de protección extendido a

los frutos durante su almacenamiento y distribución ya sea para mercado nacional o de exportación. En el caso del tomate sinaloense de exportación, tarda aproximadamente 5 días para estar colocados en tiendas de autoservicio de California y 7 días al punto más lejano que es la costa este de los Estados Unidos de América.

A pesar de los buenos niveles de sobrevivencia que presentó el bacteriófago P22 existen diversos factores que pueden afectar su sobrevivencia. Algunos de ellos son: luz UV, temperatura, desecación, estrés osmótico, y pH. En relación al efecto de la humedad en la sobrevivencia de bacteriófagos Stine *et al.*, (2005), investigaron la sobrevivencia de diversos virus en superficie de frutos enteros, reportaron que en frutos de melón el bacteriófago P22, el virus de hepatitis A y el calci virus felino presentan una mayor sobrevivencia en condiciones de baja humedad. En el caso de lechuga el bacteriófago P22 y el virus de hepatitis A presentan mayor sobrevivencia en condiciones de baja humedad. En el caso del calci virus felino presentó inactivación al ser expuesto a condiciones de baja humedad.

Dawson *et al.*, (2005), investigaron la sobrevivencia del bacteriófago MS2 en superficie de diversos frutos. Encontraron que a temperatura de 4°C y 8°C los títulos del bacteriófago disminuyeron menos de 1 Log₁₀ durante 7 días. A temperatura de 22°C, los títulos disminuyeron 1 Log₁₀ durante 7 días. Esta capacidad de sobrevivencia la atribuyen a la alta resistencia a la inactivación ambiental. Por otra parte Leverentz *et al.*, (2001), analizaron la sobrevivencia de una mezcla de bacteriófagos en precortados de melón y manzana a temperaturas de 5, 10 y 20°C. En precortados de melón encontraron que los títulos del bacteriófago disminuyen de

manera gradual 3 Log₁₀ durante 168 h de contacto. En el caso de precortados de manzana los títulos disminuyeron a niveles no detectables a las 168 h, en las tres temperaturas analizadas. Los autores concluyeron que la temperatura no ejercía un efecto en la sobrevivencia de la mezcla de bacteriófagos. La diferencia en la sobrevivencia de la mezcla de bacteriófagos entre precortados de melón y manzana fue atribuida al pH de los frutos. En el caso de melón el pH es de 5.8 y el de manzana es de 4.2. En este sentido las proteínas de los bacteriófagos que tienen la función de la unión a los receptores de las células huésped, pudieron ser desnaturalizadas por efecto de pH y de esta manera evitar la replicación de los bacteriófagos; disminuyendo gradualmente los títulos hasta niveles no detectables.

Control de *Salmonella* mediante bacteriófago P22 en la superficie de frutos de tomate

El bacteriófago P22 a temperatura de almacenamiento de (10°C), redujo 3.02 Log₁₀ UFC/tomate a *Salmonella typhimurium*; sin embargo a temperatura de mercadeo de 20°C sólo redujo 0.7 Log₁₀ UFC/tomate. Estudios previos habían demostrado la efectividad del uso de bacteriófagos para reducir poblaciones de microorganismos patógenos en los sectores productivos avícolas, agrícolas y de procesamiento de alimentos (Modi *et al.*, 2001; Leverentz *et al.*, 2001; Goode *et al.*, 2003)

Leverentz *et al.*, (2001), examinaron la interacción bacteriófago-cepa hospedero en frutos precortados de melón y manzana. Utilizaron una mezcla de 4 bacteriófagos

(SCPLX-1), específicos para *Salmonella enteritidis*, obtenidas de la empresa Intralytix (Baltimore, Md). Obtuvieron resultados prometedores en precortados de melón, al registrar reducciones de 3.5 Log₁₀ a temperaturas de 5 y 10°C; sin embargo, en precortados de manzana no se obtuvieron reducciones de *Salmonella enteritidis*. Estos resultados en precortados de manzana los atribuyen a la sensibilidad de la mezcla de bacteriófagos (SCPLX-1) a ambientes más ácidos como es el caso de los precortados de manzana que presentan un pH de 4.37, lo que originó que la mezcla de bacteriófagos no pudiera persistir en precortados de manzana, declinando los títulos a niveles no detectables en 24 h.

Leverentz *et al.*, (2001), señalan que la reducción de las poblaciones de *Salmonella* en precortados de melón fue independiente de la temperatura de incubación. Resultados que difieren con nuestra investigación, ya que se encontró que a menor temperatura se obtenía mayor reducción de *Salmonella* por efecto del bacteriófago.

Leverentz *et al.*, (2003), examinaron la interacción bacteriófago-cepa huésped y bacteriosin en frutos precortados de melón y manzana. Utilizaron una mezcla de bacteriófagos (LM-103 y LMP-102), específicos para *Listeria monocytogenes*. Los resultados encontrados señalan que la mezcla de bacteriófagos reduce la población de *Listeria monocytogenes* de 2.0 a 4.6 Log₁₀ en precortados de melón. En precortados manzana los resultados fueron reducciones de 0.4 Log₁₀. Los mejores resultados los obtuvieron mediante la combinación de mezcla de bacteriófagos (LM-103 y LMP-102) y bacteriosin lograron reducciones de las poblaciones de *Listeria monocytogenes* superiores a los 5.7 Log₁₀ en precortados de melón. En el caso de

precortados de manzana lograron reducciones de las poblaciones de *Listeria monocytogenes* superiores a los 2.3 Log₁₀. Al utilizar solamente bacteriosín lograron reducciones superiores a los 3.2 Log₁₀ en precortados de melón y en precortados de manzana lograron reducciones superiores a los 2 Log₁₀.

A pesar de la diversidad de reportes que señalan la efectividad de bacteriófagos, para la supresión de patógenos en los sectores productivos, tanto avícolas, agrícolas y de procesamiento de alimentos; se carecía de información que demostrara la efectividad de bacteriófagos en superficie de frutos completos y de esta manera tener una alternativa a los sistemas de desinfección convencionales utilizados en los empaques agrícolas. En este sentido los resultados de la presente investigación aportan información sobre el uso de bacteriófagos para reducir poblaciones de microorganismos patógenos que se encuentran presentes en los frutos completos.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América en 1997 determinó que la eficacia estándar razonable de un agente químico en superficie de frutos completos es definida al lograr al menos una reducción de 2 Log₁₀ de la población de patógeno. Así el uso del bacteriófago P22 supera lo establecido por FDA, representando una alternativa natural y segura, la cual podría beneficiar tanto a la agricultura convencional como a la agricultura orgánica, minimizando el riesgo ocasionado por la presencia de patógenos en superficies de frutas y hortalizas.

Actualmente el cloro aplicado por aspersión es el método químico de sanitización mayormente empleado en empaques agrícolas debido a su bajo costo; sin embargo,

una solución de 200 mgL^{-1} de cloro, reduce poblaciones de patógenos por aproximadamente 1 a 2 Log_{10} (Wei *et al.*, 1995; Zhuang *et al.*, 1995). Si se considera la probable formación de subproductos carcinogénicos durante el lavado con compuestos clorados, el uso de estos tratamientos es considerado un riesgo a la salud pública (Xu, 1999).

Esto ha marcado la pauta a una agricultura ecológica, donde el uso de bacteriófagos representa una solución natural y segura que permite minimizar el riesgo ocasionado por la presencia de patógenos en superficies de frutas y hortalizas. La presente investigación aporta elementos sólidos encaminados hacia esta vía amigable con el ambiente. Un elemento que fortalece el uso de bacteriófagos para reducir poblaciones de microorganismos patógenos es la aprobación por FDA del uso de preparados a base de bacteriófagos para ser usados en alimentos listos para su consumo, generándose así una alternativa para la agricultura orgánica que permitirá mejorar la calidad microbiológica de frutas y hortalizas (FDA, 2006).

La agricultura orgánica está adquiriendo creciente importancia en el sector agrícola de algunos países como Estados Unidos, Francia, Japón y Singapur donde se han registrando tasas de crecimiento anual superiores al 20 por ciento (FAO, 1999). Sin embargo, este crecimiento se ve limitado debido a que se ha demostrado que frutas y hortalizas son contaminadas con diversos microorganismos patógenos, durante las etapas de la cadena productiva. Lo que trae como consecuencia diversos brotes que se reflejan en pérdidas económicas. En el caso particular de *Salmonella* se estima un costo anual de 2,467,322,866 dólares, donde se incluyen gastos médicos, pérdidas

por productividad y muertes (ERS, 2006). En este sentido la presente investigación proporciona información que beneficiará a los productores y consumidores de productos orgánicos debido a la capacidad del bacteriófago P22 para sobrevivir en superficie de frutos completos y así poder eliminar a *Salmonella* y proporcionar un efecto de protección extendido durante las etapas posteriores al empaque agrícola.

CONCLUSIONES

El bacteriófago P22 es un agente efectivo para el control de *Salmonella typhimurium* ya que logra reducciones de 3.02 Log₁₀ UFC/tomate.

Salmonella typhimurium sobrevive durante los 7 días del experimento, en frutos de tomate a temperaturas de almacenamiento (10°C) y crece a temperatura de mercadeo (20°C). En el caso del bacteriófago P22 sobrevive en ambas temperaturas durante los 7 días del experimento.

A menor temperatura (10°C), se obtiene una mayor reducción (3.02 Log₁₀ UFC/tomate) de *Salmonella typhimurium* por efecto lítico del bacteriófago P22 en frutos de tomate.

A mayor tiempo de contacto del bacteriófago con la bacteria hospedera, el efecto bactericida del bacteriófago P22 es mayor.

SUGERENCIAS

Estudiar la incorporación de bacteriófagos a una matriz cerosa para que se mantengan viables durante mayor tiempo.

Utilizar mezclas de bacteriófagos para ampliar el rango de acción ante microorganismos patógenos de interés como *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*.

Evaluar la acción sinérgica de bacteriófagos y agentes naturales (que no tengan efecto en los bacteriófagos), para la eliminación de microorganismos patógenos.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medios

Agar soya tripticaseína 1.5 % (TSA, Bioxon)

Componentes	Cantidad (g)
Peptona de soya	5
Peptona de caseína	15
Cloruro de sodio	5
Agar	15

Para 1 L de Agar soya tripticaseína: Se pesan 40 g del medio y disolver en 1 L de agua destilada. Ajustar pH a 7.3 ± 2 . Agitar hasta ebullición y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Vaciar en cajas petri.

Agar soya tripticaseína 1 % (TSA, Bioxon)

Componentes	Cantidad (g)
Peptona de soya	3
Peptona de caseína	17
Cloruro de sodio	5
Fosfato dipotásico	2.5
Dextrosa	2.5

Para un litro de Agar soya tripticaseína 1 %, se pesan 30 g del medio TSB y se disuelven en 1 L de agua destilada, se agregan 10 g de agar bacteriológico. El pH se ajustar a 7.3 ± 2 . Agitar hasta ebullición y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD, Bioxon)

Componentes	Cantidad (g)
Extracto de levadura	3
L-lisina	5
Xilosa	3,75
Lactosa	7,5
Sacarosa	7,5
Desoxicolato sódico	2,5
Citrato férrico	0,8
Tiosulfato sódico	6,8
Cloruro sódico	5
Rojo fenol	0,08
Agar	13,5

Para un litro de Agar xilosa lisina desoxicolato, se pesan 55 g del medio y se disuelven en 1 L de agua destilada. El pH se ajustar a $7,4 \pm 2$. Agitar hasta ebullición y vaciar en cajas petri.

Caldo soya tripticaseína (TSB, Bioxon)

Componentes	Cantidad (g)
Peptona de soya	3
Peptona de caseína	17
Cloruro de sodio	5
Fosfato dipotásico	2,5
Dextrosa	2,5

Para un litro de caldo soya tripticaseína se pesan 30 g del medio y se disuelven en 1 L de agua destilada. Ajustar pH a $7,3 \pm 2$. Agitar hasta ebullición y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Anexo 2. Preparación de soluciones

Buffer de fosfatos

Se prepara una solución stock pesando 34 g de fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 , se disuelve en 500 mL de agua destilada. El pH se ajusta a 7.2 con NaOH 1 N y se esteriliza a 121°C durante 15 min.

De la solución stock se toman 125 mL y se aforan a 1 L de agua destilada. Se esteriliza a 121 °C durante 15 min.

Hidróxido de Sodio 1 N

Para un volumen de 50 mL

$$40 \text{ g} \text{ --- } 1 \text{ N} \text{ --- } 1000 \text{ mL}$$

$$x \text{ --- } 1 \text{ N} \text{ --- } 50 \text{ mL}$$

$$x = 2 \text{ g en } 50 \text{ mL de agua destilada}$$

Extracto de carne al 3%

Para un volumen de 50 mL

$$3 \text{ g} \text{ --- } 100 \text{ mL}$$

$$x \text{ --- } 50 \text{ mL}$$

$$x = 1.5 \text{ g de extracto de carne en } 50 \text{ mL}$$

Anexo 3. Abreviaturas

ANOVA. Analysis of Variance

APHA. American Public Health Association

ATC. American Type Culture Collection

aw. Water activity

CAADES. Confederación de Asociaciones Agrícolas del Estado de Sinaloa

CDC. Center for Disease Control

CFR. Code of Federal Regulations

CIAD. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo

CIDH. Comisión para la Investigación y Defensa de las Hortalizas

CONACyT. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

cm. Centímetros

ERS. Economic Research Service

et al. Colaboradores

ETAs. Enfermedades Transmitidas por Alimentos

FAO. Food and Agriculture Organization

FDA. Food and Drug Administration

g. Gramos

g. Gravedad

GRAS. Generally Recognized as Safe

h. Horas

kPa. Kilo pascales

L. Litro

LMAA. Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Alimentos

Log₁₀. Logaritmos en base 10 (igualmente log₁₀)

M. Molar

min. Minutos

mg/L. Miligramos por Litro

mL. Mililitro

MWCO. Molecular Weight Cut Off

OMS. Organización Mundial de Salud

pH. Potencial de Hidrógeno

ppm. Partes por Millon

psi. Pounds per Square Inch

RTE. Ready To Eat

RPM. Revoluciones por minuto

s. Segundos

SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

THM. Trihalometanos

TSA. Trypticase Soy Agar

TSB. Trypticase Soy Broth

UFC. Unidades Formadores de Colonia

UFP. Unidades Formadoras de Placa

VAR. Variedad

°C. Grados Celsius

%. Por ciento

Anexo 4. Datos generales de los experimentos

Microorganismo	Temperatura	Tiempo	UFC/tomate	Microorganismo	Temperatura	Tiempo	UFC/tomate
<i>Salmonella</i>	10	0	5.90	<i>Salmonella</i> + fago	10	0	6.30
<i>Salmonella</i>	10	0	6.70	<i>Salmonella</i> + fago	10	0	6.18
<i>Salmonella</i>	10	0	6.50	<i>Salmonella</i> + fago	10	0	6.40
<i>Salmonella</i>	10	0	6.40	<i>Salmonella</i> + fago	10	0	5.70
<i>Salmonella</i>	10	0	6.70	<i>Salmonella</i> + fago	10	0	6.23
<i>Salmonella</i>	10	0	6.80	<i>Salmonella</i> + fago	10	0	6.27
<i>Salmonella</i>	10	24	7.00	<i>Salmonella</i> + fago	10	24	5.70
<i>Salmonella</i>	10	24	6.06	<i>Salmonella</i> + fago	10	24	5.48
<i>Salmonella</i>	10	24	6.27	<i>Salmonella</i> + fago	10	24	5.40
<i>Salmonella</i>	10	24	6.30	<i>Salmonella</i> + fago	10	24	5.32
<i>Salmonella</i>	10	24	6.40	<i>Salmonella</i> + fago	10	24	5.23
<i>Salmonella</i>	10	24	6.30	<i>Salmonella</i> + fago	10	24	5.00
<i>Salmonella</i>	10	48	5.60	<i>Salmonella</i> + fago	10	48	5.40
<i>Salmonella</i>	10	48	5.90	<i>Salmonella</i> + fago	10	48	4.74
<i>Salmonella</i>	10	48	5.90	<i>Salmonella</i> + fago	10	48	4.90
<i>Salmonella</i>	10	48	5.70	<i>Salmonella</i> + fago	10	48	5.06
<i>Salmonella</i>	10	48	6.10	<i>Salmonella</i> + fago	10	48	5.23
<i>Salmonella</i>	10	48	5.80	<i>Salmonella</i> + fago	10	48	5.08
<i>Salmonella</i>	10	72	5.95	<i>Salmonella</i> + fago	10	72	5.30
<i>Salmonella</i>	10	72	5.78	<i>Salmonella</i> + fago	10	72	4.50
<i>Salmonella</i>	10	72	6.23	<i>Salmonella</i> + fago	10	72	4.90
<i>Salmonella</i>	10	72	6.45	<i>Salmonella</i> + fago	10	72	4.80
<i>Salmonella</i>	10	72	6.50	<i>Salmonella</i> + fago	10	72	5.40
<i>Salmonella</i>	10	72	6.45	<i>Salmonella</i> + fago	10	72	4.85
<i>Salmonella</i>	10	96	6.31	<i>Salmonella</i> + fago	10	96	5.00
<i>Salmonella</i>	10	96	6.05	<i>Salmonella</i> + fago	10	96	4.83
<i>Salmonella</i>	10	96	6.49	<i>Salmonella</i> + fago	10	96	4.70
<i>Salmonella</i>	10	96	6.86	<i>Salmonella</i> + fago	10	96	5.50
<i>Salmonella</i>	10	96	6.36	<i>Salmonella</i> + fago	10	96	5.40
<i>Salmonella</i>	10	96	6.70	<i>Salmonella</i> + fago	10	96	5.20
<i>Salmonella</i>	10	120	5.99	<i>Salmonella</i> + fago	10	120	4.50
<i>Salmonella</i>	10	120	5.67	<i>Salmonella</i> + fago	10	120	4.70
<i>Salmonella</i>	10	120	5.61	<i>Salmonella</i> + fago	10	120	4.80
<i>Salmonella</i>	10	120	6.54	<i>Salmonella</i> + fago	10	120	4.60
<i>Salmonella</i>	10	120	6.30	<i>Salmonella</i> + fago	10	120	5.00
<i>Salmonella</i>	10	120	6.27	<i>Salmonella</i> + fago	10	120	5.20
<i>Salmonella</i>	10	144	6.03	<i>Salmonella</i> + fago	10	144	4.00
<i>Salmonella</i>	10	144	6.00	<i>Salmonella</i> + fago	10	144	4.50
<i>Salmonella</i>	10	144	6.30	<i>Salmonella</i> + fago	10	144	4.30
<i>Salmonella</i>	10	144	6.77	<i>Salmonella</i> + fago	10	144	4.40
<i>Salmonella</i>	10	144	6.61	<i>Salmonella</i> + fago	10	144	4.10
<i>Salmonella</i>	10	144	6.78	<i>Salmonella</i> + fago	10	144	4.45
<i>Salmonella</i>	10	168	6.49	<i>Salmonella</i> + fago	10	168	3.20
<i>Salmonella</i>	10	168	6.36	<i>Salmonella</i> + fago	10	168	3.50
<i>Salmonella</i>	10	168	6.45	<i>Salmonella</i> + fago	10	168	3.60
<i>Salmonella</i>	10	168	6.10	<i>Salmonella</i> + fago	10	168	3.70
<i>Salmonella</i>	10	168	6.32	<i>Salmonella</i> + fago	10	168	3.75
<i>Salmonella</i>	10	168	6.69	<i>Salmonella</i> + fago	10	168	3.10

Microorganismo	Temperatura	Tiempo	UFC/tomate	Microorganismo	Temperatura	Tiempo	UFC/tomate
<i>Salmonella</i>	20	0	6.60	<i>Salmonella</i> +fago	20	0	7.00
<i>Salmonella</i>	20	0	7.30	<i>Salmonella</i> +fago	20	0	6.90
<i>Salmonella</i>	20	0	7.00	<i>Salmonella</i> +fago	20	0	6.60
<i>Salmonella</i>	20	0	7.30	<i>Salmonella</i> +fago	20	0	6.40
<i>Salmonella</i>	20	0	7.20	<i>Salmonella</i> +fago	20	0	6.30
<i>Salmonella</i>	20	0	7.20	<i>Salmonella</i> +fago	20	0	7.00
<i>Salmonella</i>	20	24	7.70	<i>Salmonella</i> +fago	20	24	7.15
<i>Salmonella</i>	20	24	7.60	<i>Salmonella</i> +fago	20	24	6.50
<i>Salmonella</i>	20	24	7.50	<i>Salmonella</i> +fago	20	24	6.40
<i>Salmonella</i>	20	24	6.90	<i>Salmonella</i> +fago	20	24	6.50
<i>Salmonella</i>	20	24	7.40	<i>Salmonella</i> +fago	20	24	6.90
<i>Salmonella</i>	20	24	7.30	<i>Salmonella</i> +fago	20	24	6.89
<i>Salmonella</i>	20	48	7.80	<i>Salmonella</i> +fago	20	48	6.70
<i>Salmonella</i>	20	48	7.70	<i>Salmonella</i> +fago	20	48	6.60
<i>Salmonella</i>	20	48	7.50	<i>Salmonella</i> +fago	20	48	6.80
<i>Salmonella</i>	20	48	7.40	<i>Salmonella</i> +fago	20	48	7.01
<i>Salmonella</i>	20	48	7.20	<i>Salmonella</i> +fago	20	48	7.15
<i>Salmonella</i>	20	48	7.50	<i>Salmonella</i> +fago	20	48	7.00
<i>Salmonella</i>	20	72	8.00	<i>Salmonella</i> +fago	20	72	6.70
<i>Salmonella</i>	20	72	8.00	<i>Salmonella</i> +fago	20	72	6.70
<i>Salmonella</i>	20	72	7.70	<i>Salmonella</i> +fago	20	72	6.60
<i>Salmonella</i>	20	72	7.90	<i>Salmonella</i> +fago	20	72	6.50
<i>Salmonella</i>	20	72	7.20	<i>Salmonella</i> +fago	20	72	7.50
<i>Salmonella</i>	20	72	7.25	<i>Salmonella</i> +fago	20	72	6.40
<i>Salmonella</i>	20	96	8.00	<i>Salmonella</i> +fago	20	96	6.90
<i>Salmonella</i>	20	96	8.20	<i>Salmonella</i> +fago	20	96	7.00
<i>Salmonella</i>	20	96	8.10	<i>Salmonella</i> +fago	20	96	7.25
<i>Salmonella</i>	20	96	7.90	<i>Salmonella</i> +fago	20	96	7.40
<i>Salmonella</i>	20	96	7.70	<i>Salmonella</i> +fago	20	96	6.90
<i>Salmonella</i>	20	96	8.01	<i>Salmonella</i> +fago	20	96	6.60
<i>Salmonella</i>	20	120	7.20	<i>Salmonella</i> +fago	20	120	6.80
<i>Salmonella</i>	20	120	7.50	<i>Salmonella</i> +fago	20	120	7.20
<i>Salmonella</i>	20	120	7.80	<i>Salmonella</i> +fago	20	120	7.20
<i>Salmonella</i>	20	120	7.70	<i>Salmonella</i> +fago	20	120	7.30
<i>Salmonella</i>	20	120	8.00	<i>Salmonella</i> +fago	20	120	7.50
<i>Salmonella</i>	20	120	7.40	<i>Salmonella</i> +fago	20	120	7.00
<i>Salmonella</i>	20	144	8.00	<i>Salmonella</i> +fago	20	144	7.00
<i>Salmonella</i>	20	144	8.15	<i>Salmonella</i> +fago	20	144	7.20
<i>Salmonella</i>	20	144	7.90	<i>Salmonella</i> +fago	20	144	6.50
<i>Salmonella</i>	20	144	7.70	<i>Salmonella</i> +fago	20	144	7.20
<i>Salmonella</i>	20	144	8.20	<i>Salmonella</i> +fago	20	144	7.00
<i>Salmonella</i>	20	144	7.40	<i>Salmonella</i> +fago	20	144	7.15
<i>Salmonella</i>	20	168	8.55	<i>Salmonella</i> +fago	20	168	6.50
<i>Salmonella</i>	20	168	7.90	<i>Salmonella</i> +fago	20	168	6.70
<i>Salmonella</i>	20	168	8.50	<i>Salmonella</i> +fago	20	168	6.60
<i>Salmonella</i>	20	168	8.20	<i>Salmonella</i> +fago	20	168	7.10
<i>Salmonella</i>	20	168	8.60	<i>Salmonella</i> +fago	20	168	6.40
<i>Salmonella</i>	20	168	8.15	<i>Salmonella</i> +fago	20	168	6.30

REFERENCIAS

Altekruse, S. L., Cohen, M. L., Swerdlow, D. L. 1997. Emerging Foodborne Disease. *Emerging Infectious Disease*. **3**(3):285-293.

Annous, B., Solomon, E. B., Cooke, P. H., Burke, A. 2005. Biofilm Formation by *Salmonella* spp. on Cantaloupe Melons. *Journal of Food Safety*. **25**(4):276-287.

APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th edition. American Public Health Association, Washington, DCAPHA.

Atterburry, R. J., Connerton, P. L., Dodd, C. E., Rees, C., Connerton, I. F. 2003. Application of Host-Specific Bacteriophages to the Surface of Chicken Skin Leads to a Reduction in Recovery of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**(10):6302-6306.

Asm, 2000. Bacteriophage P22. American Society for Microbiology. Acceso 24/11/07. Disponible en:

<http://www.asm.org/division/m/fax/P22Fax.html>

Balogh, B., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Obradovic, A., King, P. and Jackson, L. E. 2003. Improved Efficacy of Newly Formulated Bacteriophages for Management of Bacterial Spot on Tomato. *Plant Disease*. **87**:949-954.

Barrow, P. A., and Soothill, S. 1997. Bacteriophage Therapy and Prophylaxis: Rediscovery and Renewed Assessment of Potential. *Trends in Genetics*. 5:268–271.

Berchieri, A., Lovell, Jr., M. A. and Barrow, P. A. 1991. The Activity in the Chicken Alimentary Tract of Bacteriophages Lytic for *Salmonella typhimurium*. *Research in Microbiology*. 142:541–549.

Beuchat, L. R. 1996. Pathogenic Microorganisms Associated with Fresh Produce. *Journal of Food Protection*. 59(2):204-216.

Beuchat, L. R. 1998. Surface Decontamination of Fruit and Vegetables eaten: A Review, Food Safety Unit, World Health Organization. Acceso: 15/06/06.

Disponibile en:

http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/surface_decon.pdf

Beuchat, L. R., Nail, B. V., Adler, B. B., Clavero, M. R. 1998. Efficacy of Spray Application of Chlorinated Water in Killing Pathogenic Bacteria on Raw Apples, Tomatoes, and Letuce. *Journal of Food Protection*. 61(10):1305-1311.

Beuchat, L. R. 2000. Use of Sanitizers in Raw Fruit and Vegetable Processing. In: Minimally Processed Fruits and Vegetables: Fundamental Aspects and Applications (S. M. Alzamora, M. S. Tapia, and A. Lopez-Malo, eds.). Aspen Publ., Inc., Gaithersburg, MD. Chapter 4, pp. 63-78.

Beuchat, L. R., Farber, J. M., Garret, E. H., Harris, L. J., Parish, M. E., Suslow, T. V., Busta, F. F. 2001. Standardization of a Method to Determine the Efficacy of Sanitizer in Inactivating Human Pathogenic Microorganisms on Raw Fruit and Vegetables. *Journal of Food Protection*. **64**(7):1079-1084.

Beuchat, L. 2002. Ecological Factors Influencing Survival and Growth of Human Pathogens on Raw Fruits and Vegetables. *Microbes and Infection*. **4**:413-423.

Beuchat, L. R. Pettigrew, C. A. Tremblay, M. E., Roselle, B. J., Scouten, A. J. 2005. Lethality of Chlorine, Chlorine Dioxide, and a Commercial Fruit and Vegetable Sanitizer to Vegetative Cells and Spores of *Bacillus cereus* and Spores of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **32**:301-308.

Blaser, M.J., Newman, L.S., 1992. A Review of Human Salmonellosis, I. Infective Dose. *Reviews Infectious Disease*. **4**:1096-1106.

Brandl, M. T., and Mandrell, R. E., 2002. Fitness of *Salmonella enterica* Serovar Thompson in the Cilantro Phyllosphere. *Applied Environmental Microbiology*. **68**(7):3614-3621.

Breidt, R., Hayes, J. S., Fleming, H. P. 2000. Reduction of Microflora on Whole Pickling Cucumbers by Blanching. *Journal of Food Science*. **65**(8):1354-1358.

Butcher, S. J., Bamford, D. H. and Fuller, S.D., 1995. DNA Packaging Orders the Membrane of Bacteriophage PRD1. *The EMBO Journal*. **14**(24):6078-6086.

Burnett, S.L., Chen, J., Beuchat, L.R. 2000. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the Surface and Internal Structure of Apples as Detected by Confocal Scanning Laser Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**(11):4679-4687.

Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., Swaminathan, B. 2000. Salmonella Nomenclatura. *Journal of Clinical Microbiology*. **38**(7)2465-2467

CAADES-CIDH, 2007. Exportación Total de Hortalizas 2006-2007 Confederación de Asociaciones Agrícolas del Estado de Sinaloa. Comisión para la Investigación y Defensa de las Hortalizas. Acceso: 28/09/2007.

Disponible en: <http://www.cidh.org.mx/accidh.php>

Caballero, B., Trugo, L. C., and Finglas, M. P. 2003. Membrane Techniques. Principles of Ultrafiltration. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 6:3837-3848.

Campbell, J. V., Mohle-Boetani, J., Reportes, R., Abbott, S., Farrar, J., Brandl, M., Mandrell, R., Werner, S. B., 2001. An Outbreak of *Salmonella* Serotype Thompson Associated with Fresh Cilantro. *The Journal of Infectious Diseases*. 183:984–987.

Campbell, A., 2003. The Future of Bacteriophage Biology. *Nature Reviews.Genetics* 4 471-477.

Castro del Campo, N., Chaidez, Q. C., Rubio. C. W., Valdez, T. J. V. 2004. Sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en Frutos Mínimamente Procesados. *Revista Cubana de Salud Pública*, 30(1) Acceso: 02/11/07 Disponible en:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662004000100009&lng=es&nrm=iso

CCDR, 1998. Canada Communicable Disease Report. *Salmonella oranienburg*, Ontario Vol. 24-22. Acceso: 22/07/07.

Disponible: <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmte/98pdf/cdr2422e.pdf>

CDC, 1992. Foodborne Disease Outbreak Line List. Acceso 05/10/07 Disponible en: http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb/fbo1992/fbofinal1992.pdf

CDC, 2002. Centers for Disease Control and Prevention. Summary Statistics. Acceso: 27/09/2007. Disponible en:

http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb/fbo1992/fbofinal1992.pdf

CDC, 2002a Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Salmonella* Serotype Javiana Infections --- Orlando, Florida. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 51(31):683-684.

CDC, 2002b. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreaks of *Salmonella* Serotype Poona Infections Associated with Eating Cantaloupe from Mexico-United States and Canada, 200-2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. **51**(46):1044-1047.

CDC, 2005. Centers for Disease Control and Prevention. Summary Statistics. Acceso: 27/09/07. Disponible en:

http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb/fbo2005/2005_Linelist.pdf

CDC, 2005a. Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Phogens Transmitted Commonly Through Food 10 Sites, United Sates, 2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. **54**(14):352-356.

CDC, 2005b. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreaks of *Salmonella* Infections Associated with Eating Roma Tomatoes United States and Canada. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. **54** (13):325-328.

CDC, 2006. Salmonellosis. "Outbreak Investigation". Acceso: 22 /07/07 Disponible: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_2006/outbreaknotice.ht

CFR, 2000a Code of Federal Regulations. Title 21, Part 110.3. Current Good Manufacturing Practice in Manufacturing, Packing, or Holding Human Food: Acceso: 02/07/07 Definiciones. Disponible en:

<http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/index.html>

CFR, 2000b. Code of Federal Regulations. Title 21, Part 173.300. Secondary Direct Food Additives Permitted in Food for Human Consumption: Chlorine Dioxide. Acceso: 08/07/07. Disponible en: <http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/index.html>

Chaidez, Q. C., 2002. Inocuidad de Frutas y Hortalizas Frescas: Efectos del Agua Contaminada. *Agua Latinoamérica*, Mayo-Junio p 36-39. Acceso: 04/05/07.

Disponible en: <http://www.agualatinoamerica.com/docs/PDF/S-6-02quirosz.pdf>

Chaidez, Q. C., Moreno, M., Rubio, W., Angulo, M., Valdez, B. 2003. Comparison of the Disinfection Efficacy of Chlorine-Based Products for Inactivation of Viral Indicators and Pathogenic Bacteria in Produce Wash Water. *International Journal of Environmental Health Research*. **13**(3)295-302.

Chaidez, Q. C., Cazares, D. G., Gortáres, M. P., 2004. Incidencia y Sobrevivencia de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Listeria spp.* en Agua de Uso Agrícola en el Valle de Culiacán. Memorias del I Congreso Regional de Ciencias Ambientales. Cd. Obregón, Sonora, 21-22 de octubre de 2004. CYTA-O2.

Chaidez, Q. C., Lopez, J., Vidales, J., Castro-Del Campo, N. 2007. Efficacy of Chlorinated and Ozonated Water in Reducing *Salmonella typhimurium* Attached to Tomato Surfaces *International Journal of Environmental Health Research*, **17**(4):311-318.

Conway, W.S., Leverentz, B., Safner, R. A. 2000. Survival and Growth of *Listeria monocytogenes* on Fresh-Cut apple Slices and its Interaction with *Glomerella cingulata* and *Penicillium expansum*. *Plant Disease* 84:177-181.

Cummings, K., Barrett, E., Mohle-Boetani, J. C., Brooks, J. T., Farrar, J. Hunt, T., Fiore, A., Komatsu, K., Werner, S. B. and Slutsker, L., 2001. A Multistate Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Baildon Associated With Domestic Raw Tomatoes. *Emerging Infectious Diseases*. **7**(6):1046--1048.

Crosa, J.H., Brenner, D.J., Ewing, W.H., Falkow, S. 1973. Molecular Relationships Among the *Salmonellae*. *Journal of Bacteriology*. **115**:307-315.

DeWaal, C. S., Barlow, K., Alderton, L., Jacobson, M. F. 2001. Outbreak Alert Closing the Gaps in Our Federal Food Safety Net. Center for Science in the Public Interest. Washington, D. C.

Del Rosario, B.A., Beuchat, L.R. 1995. Survival and Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Cantaloupes and Watermelon. *Journal of Food Protection*. **58**:105-107.

Divizia, M., Santi, A. L., and Pana, A. 1988. Ultrafiltration: An Efficient Second Step for Hepatitis A Virus and Poliovirus Concentration. *Journal of Virological Methods*. 23:55-62.

Dawson, D.J., Paish, A., Staffell, L. M., Seymour, I. J., and Appleton, H. 2005. Survival of Viruses on Fresh Produce, Using MS2 as a Surrogate for Norovirus. *Journal of Applied Microbiology*. 98:203–209

Dykes, G. A., and Moorhead, V. 2002. Combined Antimicrobial Effect of Nisin and Listeriophage Against *Listeria monocytogenes* in Broth But not in Buffer or on Raw Beef. *International Journal Food Microbiology*. 73:71–81.

D'Herelle F. 1917. The Bacteriophage and its Clinical Application, Springfield, Charles C. Thomas, Publisher. pp 369-381.

Ellis, D. E., Whitman, P. A. and Marshall, R. T. 1973. Effects of Homologous Bacteriophage on Growth of *Pseudomonas fragi* WY in Milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 25(1):24–25.

ERS, 2006. Economic Research Service. Food Availability (Per Capita) Data System. Acceso: 10/08/07 Disponible en: <http://www.ers.usda.gov/>

Espigares, R. E., Álvarez, A. A., 2002. Algunos Aspectos del Mecanismo de Transmisión en *Salmonella*. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 2:19-25.

Espinoza-Medina, I. E., Rodríguez-Leyva, F. J., Vargas-Arispuro, I., Islas-Osuna, M. A., Acedo-Félix, E., Martínez-Téllez, M. A. 2006. PCR Identification of *Salmonella*: Potential Contamination Sources From Production and Postharvest Handling of Cantaloupes. *Journal of Food Protection*, **69**(6):1422-1425.

FAO, 1999. La Agricultura Orgánica. Revista Enfoques. Acceso: 01/11/07. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/esp/revista/9901sp3.htm>

FAO, 2006. Mejoramiento de la Inocuidad y la Calidad de Frutas y Hortalizas. Servicio de Calidad de los Alimentos y Normas Alimenticias (ESNS). Dirección de Alimentación y Nutrición. Acceso 27/08/07

Disponible en: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/FFV_brochure_es.pdf

FDA, 1997. Fruits and Vegetables: Eating Your Way to 5 A Day. Acceso: 03/12/07
Disponible en: http://www.fda.gov/fdae/features/1997/297_five.html

FDA, 1998. Guía para Reducir al Mínimo el Riesgo Microbiano en los Alimentos, en el Caso de Frutas y Vegetales Frescos. Acceso: 30/10/07. Disponible en:
<http://www.foodsafety.gov/~mow/sprodgui.html#ii>

FDA. 2001. Secondary Direct Food Additives Permitted in Food for Human Consumption. Food Drug and Administration. Fed Reg **66**(123):33829-33830.

FDA, 2006. Approval of *Listeria*-specific Bacteriophage Preparation on Ready-to-Eat (RTE) Meat and Poultry Products. Acceso 15/08/07.

Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opabacqa.html>

FDA, 2007. Recalls, Market Withdrawals and Safety Alerts. Acceso: 18/11/07.

Disponible en: <http://www.fda.gov/recalls/>

Gawande, P.V., Bhagwat, A.A. 2002. Protective Effect of Cold Temperature and Surface Contact on Acid Tolerance of *Salmonella* spp. *Journal Applied Microbiology*. 93:689-696.

Gene M. Bacteriophage, 2006. Microbiology and Immunology On-line Textbook, chapter seven. University of South Carolina. Acceso: 22/07/07.

Disponible en: <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/phage.htm>

Gill, J. J., Griffiths, M. W. and Sabour, P. M. 2002. Characterization of Putative Whey Proteins Which Inhibit Bacteriophage Binding to *Staphylococcus aureus*, p. 81. In Proceedings of Agriculture and Agri-Food Canada's Federal Food Safety and Nutrition Research Meeting, Guelph, Ontario, Canada, 15 to 17 September 2002.

Goode, D. Allen, V.M. Barrow, P.A. 2003. Reduction of Experimental *Salmonella* and *Campylobacter* Contamination of Chicken Skin by Application of Lytic Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(8):5032–5036.

González, F. M. y Rojas, H. R. 2005. Enfermedades transmitidas por Alimentos y PCR: Prevención y Diagnóstico. *Salud Pública de México*. **47**(5):388-390.

Grahn, A. M., Butcher, S. J., Bramford, J. K., bramfors, D. H. 2004. PRD1 Dissecting the Genome, Structure and Entry. Acceso: 03/06/07.

Disponible en: http://www.thebacteriophages.org/chapters/0130_figure_003.htm

Greer, G. G. 1986. Homologous Bacteriophage Control of *Pseudomonas* Growth and Beef Spoilage. *Journal of Food Protection*. **49**:104–109.

Greer, G. G., and Dilts, B. D. 2002. Control of *Brochothrix thermosphacta* Spoilage of Pork Adipose Tissue Using Bacteriophages. *Journal of Food Protection*. **65**:861–863.

Greer, G. G., 2002. Bacteriophages Control of Foodborne Bacteria. *Journal of Food Protection*. **68**(5):1102–1111.

Gutiérrez, C. L. Montiel, V. E., Aguilera, P. P., González, Andrede M. C. 2000. Serotipos de *Salmonella* Identificados en los Servicios de Salud de México. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **42**(6):490-495.

Gurgle, 2007. F38 Perfect Choice Perfect Pureness. Filters Use Hyflux Proprietary Ultrafiltration Membrane Technology Capable of Removing Many Chemicals Linked to Cancer, Liver and Kidney Damage. Acceso 02/11/07. Disponiblene:

http://www.air2water.net/commercial_products_gurgle.html

Hanlon, G. W., Denyer, S. P., Olliff, C. J., Ibrahim, L. J. 2001. Reduction in Exopolysaccharide Viscosity as an Aid to Bacteriophage Penetration through *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(6):2746-2753.

Harris, L.J., Farber, J.N., Beuchat, L.R., Parish, M.E., Suslow, T.V., Garret, E.H., Busta, F.F., 2003. Outbreaks Associated With Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2 (Supplement) 78-141.

Hedberg C. W, David, M. J., White, K. E., MacDonald, K. L., Osterholm, M.T. 1993 Role of Egg Consumption in Sporadic *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* Infections in Minnesota. *Journal Infectious Disease*.**167**(1):107-111.

Hill, V. R., Polaczyk, A. L., Hahn, D., Narayanan, J., Cromeans, T. L., Roberts, J. M., Amburgey, J. E. 2005. Development of a Rapid Method for Simultaneous Recovery of Diverse Microbes in Drinking Water by Ultrafiltration with Sodium Polyphosphate and Surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(11):6878-6884.

Hirotsani, H., Naranjo, J., Moroyoqui, P. G., Gerba, C. 2001. Demonstration of Indicator Microorganisms on Surface of Vegetables on the Market in the United States and Mexico. *Journal of Food Science* **67**(5):1847-1850.

Hogg, S. 2005. Viral Replication Cycles. *Essential Microbiology*, Editorial John Wiley, P 247

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J.T., Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Williams.

Huang, T., Chuanling, X., Walker, K., West, P., Zhang, S. Weese, J. 2006. Decontamination Efficacy of Combined Chlorine Dioxide with Ultrasonication on Apples and Lettuce. *Journal of Food Science*. **71**(4):134-139.

ICTV, 2006. International Committee on Taxonomy of Viruses. Enterobacteria phage P22. Acceso: 25/11/07. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/02.054.0.03.001.htm>

Iturriaga, M. H., Tamplin, M. L., Escartín, E. F., 2007. Colonization of Tomatoes by *Salmonella* Montevideo Is Affected by Relative Humidity and Storage Temperature. *Journal of Food Protection*. **70**(1)30-34.

Janisiewicz, W. J., Conway, W. S., Leverentz, B. 1999. Biological Control of Postharvest Decays of Apple can Prevent Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Apple Wounds. *Journal of Food Protection*. 62:1372-1375.

Janse, A., Gerba, C. 2005. The Germ Freak's Guide to Outwitting Colds and Flu: Guerilla Tactics to Keep Yourself Healthy at Home, at Work and in the World. Health Communications, Inc. p 52

Khadre, M. A., Yousef, A. E., Kim, J. G., 2001. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. *Journal of Food Science*. 66:1242-1252.

Kim, J. G. Yousef, A. E., Dave, S. 1999. Application of ozone for Enhancing the Microbial Safety and Quality of Foods: A Review. *Journal of Food Protection*. 62:1071-1087.

Kivelä, H. M., Daugelavičius, R., Hankkio, R. H., Bamford, J. K. and Bamford, D. H. 2004. Penetration of Membrane-Containing Double-Stranded-DNA Bacteriophage PM2 into *Pseudoalteromonas* Hosts. *Journal of Bacteriology*. **186**(16): 5342–5354.

Kostrzynska, M., Campos, M. C., Griffiths, M. and Lepp, D. 2002. Biocontrol of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* DT104 on Poultry Products Using Bacteriophages, p. 35. In Proceedings of the Agriculture and Agri-Food Canada Food Network Meeting, Lacombe, Alberta, Canada, 30 to 31 May 2002.

Lang, M. M., Harris, L. J., Beuchat, L. R. 2004. Evaluation of Inoculation Method and Inoculum Drying Time for Their Effects on Survival and Efficiency of Recovery of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* Inoculated on the Surface of Tomatoes. *Journal of Food Protection*. 67(4):732-741.

Leverentz, B., Conway, W., Alavidze, z., Janisiewicz, W., Fuchs, Y., Camp, M., Chighladze Y., Sulakvelidze, E. 2001, Examination of Bacteriophage as a Biocontrol Method for *Salmonella* on Fresh-Cut Fruit: A Model Study. *Journal of Food Protection*. 64(8):1116–1121.

Leverentz, B., Conway, W. S., Camp, M. J., Janisiewicz, W. J., Abuladze, T., Yang, M., Saffner, R. and Sulakvelidze, A. 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on Fresh-Cut Produce by Treatment With Lytic Bacteriophages and a Bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:4519–4526.

Leverentz, B., Conway, W. S., Janisiewicz, W., and Camp, M. J. 2004. Optimizing Concentration and Timing of a Phage Spray Application to Reduce *Listeria monocytogenes* on Honeydew Melon Tissue. *Journal of Food Protection*. 67:1682–1686.

Madigan M., Martinko J., Parker J., 2000. *Biología de los Microorganismos de Brock*. 8 ed. Madrid, Prentice Hall. p 150

Mead, P.S., L. Slutsker, V. Dietz, L.F. McCaig, J.S. Bresee, C. Shapiro, P.M.Griffin, and R.V. Tauxe. 1999. Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*. **5**(5):607-25.

Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A., Griffiths, M.W. 2001. Effect of Phage on the Survival of *Salmonella* Enteritidis During Manufacture and Storage of Cheddar Cheese Made From Raw and Pasteurized Milk. *Journal of Food Protection*. **64**(7):927–33.

Mohle-Boetani, J. C., Reporter, R., Werner, S. B., Abbott, S., Farrar, J., Waterman, S.H., Vugia, D. J., 1999. An Outbreak of *Salmonella* Serogroup Saphra Due to Cantaloupes from Mexico. *Journal Infectious Disease*.**180**(4):1361-1364.

Munsch, P., Olivier, J. M. and Houdeau, G. 1991. Experimental Control of Bacterial Blotch by Bacteriophages, p. 389–396. In M. J. Maher (ed.), Science and Cultivation of Edible Fungi, Balkema, Rotterdam, The Netherlands.

Nguyen-the, C., Carlin, F. 1994. The Microbiology of Minimally Processed Fresh Fruits and Vegetables. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. **34**:371-401.

O'Flynn, G., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. and Coffey, A. 2004. Evaluation of a Cocktail of Three Bacteriophages For Biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied Environmental Microbiology*. **70**:3417–3421.

Pao S, Davis CL. 1999. Enhancing Microbiological Safety of Fresh Orange Juice by Fruit Immersion in Hot Water and Chemical Sanitizers. *Journal of Food Protection*. **62**(7):756-760.

Pao, S., Randolph, S. P., Westbrook, E. W., Shen, H. 2004. Use of Bacteriophages to Control *Salmonella* in Experimentally Contaminated Sprout Seeds. *Food Microbiology and Safety*. **69**(5):127-130.

Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Harris, L. J., Garret, E. H., Farber, J. N. Busta, F. F. 2003. Methods to Reduce/Eliminate Pathogens from Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2**:161-173.

Parnell, T. L., Harris, L. J., Suslow, T. V. 2005. Reducing *Salmonella* on Cantaloupes and Honeydew Melons Using Wash Practices Applicable to Postharvest Handling, Foodservice, and Consumer Preparation. *International Journal of Food Microbiology*. **99**(1):59-70.

Pirovani, M. E., Guemes, D. R., Di Pentina, J. H., Tessi, M. A. 2000. Survival of *Salmonella hadar* After Washing/Disinfection of Minimally Processed Spinach. *Letter Applied Microbiology*. **31**:143-148.

Randhawa, P. S., and Civerolo, E. L. 1986. Interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* with Pruniphage and Epiphytic Bacteria on Detached Peach Leaves. *Phytopathology*. **76**:549-553.

Richert, K.J., Albrecht, J.A., Bullerman, L.B., Sumner, S.S. 2000. Survival and Growth of *Escherichia coli* O157:H7 on Broccoli, Cucumber and Green Pepper. *Dairy Food Environmental Sanit.* 20:24-28.

Rodgers, S. L., Cash, J. N., Siddiq, M., Ryse, E. T. 2004. A comparison of Different Chemical Sanitizer for Inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in Solution and on Apples, Lettuce, Strawberries and Cantaloupe. *Journal of Food Protection.* 67:721-731.

Ronda, C., Vázquez, M., López, R. 2003. Los Bacteriófagos como Herramienta para Combatir Infecciones en Acuicultura. *Revista Aquatic.* 18:3-10. Acceso: 02/05/07
Disponibile en: http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/18_2.pdf

Rydman, P. S. and Bamford, D. H., 2002. The Lytic Enzyme of Bacteriophage PRD1 Is Associated with the Viral Membrane. *Journal of Bacteriology.* 184(1):104-110.

Rydman, P.S. and Bamford, D. H., 2002. Phage Enzymes Digest Peptidoglycan To Deliver DNA. *American Society for Microbiology.* Acceso: 18/06/07.
Disponibile en: <http://newsarchive.asm.org/jul02/feature2.asp>

Sapers, G. M., Miller, R. L., Pilizota, V., Mattrazzo, A. M. 2001. Antimicrobial Treatment for Minimally Processed Cantaloupe Melon. *Journal of Food Science.* 66(2):345-349.

Schnaebel, F. L., Fernando, W. G. D., Meyer, M. P. and Jones, A. I. 1999. Bacteriophages of *Erwinia amylovora* and their Potential for Biocontrol, p. 649–653. In M. T. Mornol and H. Saygili (ed.), Proceedings of the 8th International Workshop on Fireblight. International Society of Horticultural Science, Leven, Belgium.

SIAP, 2005. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Acceso: 05/0//07. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/>

Singh, N., Singh, R. K., Bhunia, A. K., Stroshine, R. L. 2002. Efficacy of Chlorine Dioxide, Ozone, and Thyme Essential Oil or a Sequential Washing in Killing *Escherichia coli* O157:H7 on Lettuce and Baby Carrots. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. **35**(8):720-729.

Sivapalasingam, S., Barrett, E., Kimura, S., Van Dune, S., De Witt, W., Yin, M., Frisch, A., Phan, Q., Goud, E., Shillam, P., Reddy, V., Cooper, T., Hoekstra, M., Higgins, C., Sanders, P., Tauxe, R.V., Slutsker, L., 2003. A Multistate Outbreak of *Salmonella enterica* Serotype Newport Infection Linked to Mango Consumption: Impact of Water-Dip Disinfection Technology. *Clinical Infectious Diseases*. **37**:1585–1590.

Sklar, I.B., Joerger, R. D. 2001. Attempts to Utilize Bacteriophage to Combat *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Infection in Chickens. *Journal Food Safety*. **21**(1):15–29.

Splitstoeser, D. F. 1970. Predominant Microorganisms on Raw Plant Food. *Journal Milk Food Technology*. 33:500-505.

SSA-DGE, 1994. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. México, D.F.: SSA. 187.

SSA-DGE, 1998. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. México, D.F.

SSA, 1999. Secretaría de Salud. Boletín de Epidemiología. Sem 50. México, D.F.: Dirección General de Epidemiología.

Stine, S. W., I. Song, C. Y. Choi, and C. P. Gerba. 2005. Effect of Relative Humidity on Preharvest Survival of Bacterial and Viral Pathogens on the Surface of Cantaloupe, Lettuce, and Bell Peppers. *Journal of Food Protection*. 68:1352-8.

Strömsten, N. J., Bamford, D. H., and Bamford, J., 2005. *In vitro* DNA Packaging of PRD1: A Common Mechanism for Internal-Membrane Viruses. *Journal of Molecular Biology*. 348(3):617-629.

Suslow, T. V. 2004. Ozone Applications for Postharvest Disinfection of Edible Horticultural Crops. University of California, Publication 8133. Acceso: 01/09/07. Disponible en: <http://anrcatalog.ucdavis.edu/pdf/8133.pdf>

Tauxe, R.V., 1997. Emerging Foodborne Diseases and Evolving Public Health Challenge. *Emerging Infectious Disease*. (3)4:425-434.

Tortora, G. J. Funke, B. R., Case, C. L., 2001. Microbiology an Introduction. Addison Wesley Longman, Inc.

Twort, E., 1915. An Investigation on the Nature of Ultramicroscopic Viruses. *Lancet* II:1241.

Ukuku, D. O. y Sapers, G. M. 2001. Effect of Sanitizer Treatments on *Salmonella stanley* Attached to the Surface of Cantaloupe and Cell Transfer to Fresh-Cut Tissues During Cutting Practices. *Journal of Food Protection*. 64(9):1286-1291.

Ukuku, D. O. 2006. Effect of Sanitizing Treatments on Removal of Bacteria From Cantaloupe Surface, and Re-Contamination with *Salmonella*. *Food Microbiology* 23:289-293.

Uribe, C., Suárez, M. C., 2006. Salmonelosis no Tifoidea y su Transmisión a Través de Alimentos de Origen Aviar. *Colombia Médica*. 37(2):151-158.

USDA, 2007. Foreign Agricultural Service. The U.S. and World Situation: Fresh and Processed Tomatoes. Acceso 03/07/07.

Disponible en: <http://www.fas.usda.gov/http/2007%20Tomatoes.pdf>

Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Schara, G., Zehnder, A.J.B. 1987. The Role of Bacterial Cell Wall Hydrophobicity in Adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*. 53:1893-1897.

Vásquez, A. J. y Cabral, M. A. 2001. La Inocuidad Alimentaria, Realidad y Reto Mundial. *fna/ana* 28. Acceso: 27/09/07

Disponible en: <http://ftp.fao.org/docrep/fao/003/y0600m/y0600m01.pdf>

Vispo, S. N. And Puchades, Y., 2001 Bacteriófagos: de la Terapia con Fagos a la Biología Combinatoria. *Biotecnología Aplicada*. 18:135-147.

Wei, C.L., Huang, T.S., Kim, J.M., Lin, W.R., Tamplin, M.L., Bartz, J.A. 1995. Growth and Survival of *Salmonella montevideo* on Tomatoes and Disinfection with Chlorinated Water. *Journal of Food Protection*. 58:829-836.

Weissinger, W. R. Chantarapanont, W., Beuchat, L. R. 2000. Survival and Growth of *Salmonella bairdson* in Shredded Lettuce an Diced Tomatoes, and Effectiveness of Chlorinated Water as Sanitizer. *International Journal of Food Microbiology*. 62(1):123-131.

Weng, A. Z., Alvarez, M.J., Díaz R.O., Rodríguez, S. M. 2003. Recobrado de *Salmonella* sp Conservada por Método Simple a Temperatura Ambiente. *VacciMonitor*. 12(3):5-10.

Weill, F. X., Guesnier, F., Guibert, V., Timinouni, M., Demarti, M., Polomack, L. and Grimont, P. 2006. Multidrug Resistance in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium from Humans in France (1993 to 2003). *Journal of Clinical Microbiology*. **44**(3):700-708

Whichard, J. M., Sriranganathan, N. and Pierson, F. W. 2003. Suppression of *Salmonella* Growth by Wild-Type and Large-Plaque Variants of Bacteriophage Felix 01 in Liquid Culture and on Chicken Frankfurters. *Journal of Food Protection*. **66**:220–225.

Xu, L. 1999. Use of Ozone to Improve the Safety of Fresh Fruit and Vegetables. *Food Technology*. **53**:58-62.

Zhang, S., Farber, J. M. 1996. The Effects of Various Disinfectants Against *Listeria monocytogenes* on Fresh-Cut Vegetables. *Food Microbiology* **13**:311-321.

Zhuang, R. Y., Beuchat, L. R., Angulo, F. J. 1995. Fate of *Salmonella montevideo* on and in Raw Tomatoes as Affected by Temperature and Treatment With Chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**(6):2127-2131.

