

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

EVALUACIÓN *in vitro* DE DESINFECTANTES CLORADOS EN
CONDICIONES DE TINA DE LAVADO DE TOMATE

POR

MARÍA DE JESÚS MORENO MONTOYA

TESIS APROBADA POR LA

**UNIDAD CULIACÁN
EN FISIOLÓGIA Y TECNOLOGÍA POSTCOSECHA
EN FRUTAS Y HORTALIZAS**

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

APROBACION

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la C. María de Jesús Moreno Montoya, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Microbiología.



Dr. Cristóbal Chaldez Quiroz

Director de tesis

Dr. Jorge Humberto Siller Cepeda

Asesor interno



M. C. José Armando Carrillo Facio

Asesor interno



Dr. José Benigno Valdez Torres

Asesor externo

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

La publicación en 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 la tesis.

Dr. Inocencio Higuera Ciapara

Director General

Nada te turbe,
Nada te asuste,
Todo se pasa...
En esta vida,
sólo Dios basta,
¡Quien a Dios tiene,
nada le falta!

Autor Anónimo

DEDICATORIAS

A Dios por ser mi luz y mi esperanza. Gracias Señor por estar siempre aquí.

A mis padres por su amor y fortaleza y, por conducirme por el camino del estudio.

A mis hermanos por su cariño y sus deseos de superación.

A mi esposo por brindarme su amor y apoyo.

A mis hijos por todo lo que representan.

A mis sobrinos por el cariño que nos tenemos.

A mis abuelos, en paz descansen.

A la tía Angelina y mi suegra por cuidar de mis hijos con tanta dedicación.

A mis tíos Beto y Chuy, así como a mis primas Lety y Aracely por su cariño, principalmente a mi prima Mela y Gustavo. mi familia en Culiacán.

A mis compañera y amiga Bertha Alicia Pérez, por su apoyo e impulso para la realización de esta maestría.

Con todo respeto al M.C. Vicente López Portillo y Tostado, rector de la Universidad de Occidente, por promover el estudio de posgrados.

A Rosabel Vélez y Cosme Bojórquez grandes amigos. por su compañerismo, apoyo y amistad, los mejores compañeros de la maestría.

A mis compañeros de otros grados, por su apoyo, dedicación y deseos de superación.

AGRADECIMENTOS

A la Universidad de Occidente

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología

Al Biólogo Emilio Thomas Lomeli de la Comisión Nacional del Agua

Al Dr. Cristóbal Chaidez, director de tesis, por su apoyo y excelente dirección. ¡Muchas gracias!

Al Dr. Benigno Valdez por su apoyo tan valioso en el área estadística.

Al M.C. Armando Carrillo y Dr. Jorge Siller por su importante orientación

Al Dr. Tomás Osuna, Coordinador de Docencia, por su gran apoyo.

A mis profesores de Maestría, Dr. Miguel Angel Angulo, Dr. Raymundo García, M.C. Felipe Peraza, Dr. Sócrates Trujillo, Dr. Federico Hann, Dra. Mary Quiñonez y Dra. María Dolores Muy, por sus conocimientos y orientación.

Al Ing. Werner por su gran ayuda técnica y su amistad, asimismo a la Ing. Evelia Araiza por su apoyo y amistad, ¡Muchas gracias!

A los chicos; Javier, Gabriel, Jaques, Lucio, Ernesto, Nohelia, Marcela, Hilda y Kory, por su apoyo y porque compartimos momentos agradables.

A todo el personal del CIAD, Culiacán, Raúl, Isidro, Adriana, Laura, Betty, Manuel, Sr. Raúl, Arnulfo, en especial a Verónica, Lalo y Víctor, por su apoyo y amistad.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE CUADROS	xii
RESUMEN	xiii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
HIPÓTESIS	4
METAS	5
REVISIÓN DE LITERATURA	6
Importancia económica del tomate	6
Descripción del problema	14
La Calidad del agua	17
Desinfección	21

La importancia del uso del cloro	23
Acción desinfectante del cloro	23
Efectividad del cloro	24
Generalidades de los desinfectantes clorados.....	26
Hipoclorito de sodio	26
Tricloro-s-triazinetrióna	31
Tricloromelamine	34
Generalidades de las especies en estudio	37
<i>Escherichia coli</i>	37
<i>Salmonella typhimurium</i>	43
Bacteriófagos	53
Turbidez	62
MATERIALES Y MÉTODOS	68
Estudios preliminares	68
Desinfectantes	72
Microorganismos	72
Medios de cultivo	72
m-Endo Agar LES	72
Agar Entérico Hecktoen	73
Agar de Soya de Trypticaseína	73
Caldo de Soya de Trypticaseína	73
Análisis fisicoquímicos	76

Temperatura	76
pH	76
Turbidez.....	76
Cloro total	77
Cloro libre	78
Purificación de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella typhimurium</i>	79
Propagación de MS-2	80
Evaluación del desinfectante en casos extremos de contamina- ción	81
Análisis estadístico	83
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
Análisis descriptivo	85
Análisis de varianza.....	95
CONCLUSIONES	107
SUGERENCIAS.....	109
BIBLIOGRAFÍA.....	110

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Producción de alimentos en México	7
2. México es el exportador principal de frutas y hortalizas en a los Estados Unidos	9
3. En México, el tomate es la hortaliza de mayor exportación a Estados Unidos	10
4. Importaciones de tomate de Estados Unidos durante los ciclos 95-96 a 99-00.....	12
5. Superficie sembrada de hortalizas en México durante el ciclo 1997- 1998	13
6. Reacciones del cloro en el agua	30
7. Casos reportados de salmonelosis en Estados Unidos	47
8. Replicación de bacteriófagos	60
9. Desinfectantes usados en empaques de frutas y hortalizas del Valle de Culiacán	71
10a. Reducción logaritmica aplicando NaOCl y turbidez de 2 UNT	86
10b. Reducción logaritmica aplicando TCM y turbidez de 2 UNT...	87
10c. Reducción logaritmica aplicando TsT y turbidez de 2 UNT....	88
11a. Reducción logaritmica aplicando NaOCl y turbidez de 100 UNT	89
11b. Reducción logaritmica aplicando TCM y turbidez de 100 UNT	90

11c. Reducción logaritmica aplicando TsT y turbidez de 100 UNT	91
12a. Reducción logaritmica aplicando NaOCl y turbidez de 200 UNT	92
12b. Reducción logaritmica aplicando TCM y turbidez de 200 UNT...	93
12c. Reducción logaritmica aplicando TsT y turbidez de 200 UNT	94
13. Efectos principales de microorganismo, turbidez, desinfectante y concentración del desinfectante.....	97
14. Efectos de Interacciones dobles para logaritmos reducidos de microorganismo, turbidez, desinfectante y concentración del desinfectante	99
15 a. Efectos principales de MS-2	101
15 b. Efectos principales de <i>E. coli</i>	101
15 c. Efectos principales de <i>S. typhimurium</i>	102
16 a. Efectos de Interacciones triples para MS-2	104
16 b. Efectos de Interacciones triples para <i>E. coli</i>	105
16 c. Efectos de Interacciones triples para <i>S. typhimurium</i>	106

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Ejemplos de microorganismos patógenos asociados con frutas y hortalizas involucrados en epidemias de enfermedades	16
2. Virus entéricos humanos que pueden estar presentes en agua contaminada	19
3. Propiedades físicas y químicas de tricloro-s-triazinetrióna	33
4. Propiedades físicas y químicas de tricloromelamine	35
5. Costo, cloro total y cloro libre de los desinfectantes	36
6. Dosis mínima infecciosa de algunos microorganismos patógenos	54
7. Características del grupo Picornavirus	56
8. Virus transmitidos por la ruta fecal-oral	57
9. Porcentajes de pudriciones de tomate en distintos puntos del proceso de empaque, durante su almacenamiento a 0 y 10 días en 20 °C	67
10. Resultados de las determinaciones realizadas en tres empaques del valle de Culiacán	69
11. Controles positivos de microorganismos utilizados con medios de cultivo y técnicas de laboratorio	75
12. ANOVA de logarilmos reducidos usando suma de cuadrados ajustados para pruebas.....	96

RESUMEN

En este estudio se evaluó la actividad microbiana de los desinfectantes clorados, hipoclorito de sodio, tiodros-triazinetrióna y tiodromelamine, para reducir en casos extremos de contaminación utilizando cultivos positivos de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y el bacteriófago MS2, en condiciones de faja de lavado de tomate, con el propósito de aportar información sobre desinfectantes clorados y recomendar el mejor desinfectante bajo condiciones óptimas de trabajo. Se realizaron estudios preliminares de pH, temperatura, turbidez y concentración de cloro en empaques del Valle de Quacán para establecer las condiciones *in vitro* de la faja de lavado de tomate. Se evaluaron cada uno de los desinfectantes en las mismas condiciones para reducir a cada uno de los microorganismos, en tres estados de turbidez 2, 100 y 200 Unidades Nefelométricas (UNT), con tres concentraciones de cloro total donde el tiempo de contacto en cada corrida fue de 2 minutos posteriormente se determinaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y Unidades Formadoras de Placa (UFP) para bacterias y virus, respectivamente.

En general, el desinfectante Tiodros-triazinetrióna demostró ser el más efectivo, seguido del hipoclorito de sodio y finalmente tiodromelamine aunque estadísticamente tiodros-triazinetrióna e hipoclorito de sodio no presentaron diferencias significativas respecto a efectividad. Se observó que la turbidez reduce la actividad oxidante de los desinfectantes, esto es, a mayor turbidez menor efectividad. El bacteriófago MS2 fue más resistente que las bacterias, y *E. coli* más resistente que *S. typhimurium*.

rrwyor turJi,Jr:i: 1T12mol efec11v1dacJ. El klc:lerióf,1!:JO MS-2 fue rnés resistente que las bacterias, y E. coli l)lás nsistent(J que S. typh1rnurium

INTRODUCCIÓN

Las frutas y hortalizas frescas son parte esencial de la dieta humana proporcionando salud y bienestar a los consumidores. En 1991, el gobierno federal de Estados Unidos se unió con la Fundación de los Productos Agrícolas para iniciar el programa cinco al día con el objetivo de obtener una mejor salud (Taylor, 2001). El Instituto Nacional del Cáncer ha publicado que la cuarta parte de los americanos están comiendo cinco raciones de frutas y hortalizas al día, ya que así se reducen las probabilidades de padecer cáncer, enfermedades del corazón, diabetes, presión sanguínea alta y apoplejía; así también, ayudan al control de peso y proporcionan vitaminas y minerales que nuestros cuerpos necesitan para estar saludables y activos (Taylor, 2001; Kalt y Kushad 2000; Elliott, 1999).

El tomate es la principal hortaliza que se produce y exporta en México; siendo el mercado de los Estados Unidos el principal receptor (Ojeda *et al*, 1996); sin embargo, las frutas y hortalizas frescas pueden ser el vehículo de transmisión de enfermedades de salud pública causadas por microorganismos (Castro, 1999). Se han reportado microorganismos asociados con agua potable, de riego, en parques recreativos y en lavado de tomate (Rodríguez, 1999). En reportes recientes, se informa que durante los últimos años se ha detectado un mayor número de enfermedades transmitidas por frutos frescos contaminados; bacterias como *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* son patógenos capaces de causar enfermedades en humanos, pueden estar presentes en agua utilizada

para irrigación o en suelo donde la planta es cultivada (Beuchat, 1995). *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* son microorganismos preocupantes en la amplia variedad de alimentos que no han sido tratados mediante un proceso de reducción. Cepas virulentas de *E. coli* se han incrementado como causa de brotes epidémicos debido al consumo de alimentos, al grupo *E. coli* enterohemorrágico, en el que se encuentra el serotipo y serogrupo O157:H7, se considera altamente virulenta debido a su baja dosis de infección y severas consecuencias (Gänzle *et al.*, 1999; Salyers, 1994). Enfermedades virales como la hepatitis A y otras causas de gastroenteritis también son transmitidas por alimentos o agua contaminada (Bitton, 1994).

El tipo de producto, las condiciones del proceso y manejo previo afectan la diversidad de microorganismos encontrados en productos frescos (Gross y Wang, 1999).

La calidad y procedencia del agua que entra en contacto con frutas y hortalizas frescas determina la posibilidad de contaminación microbiana (FDA, 1998). Se ha reportado que la turbidez en el agua reduce la eficiencia de la desinfección del cloro y de otros desinfectantes, por lo que bacterias o virus pueden sobrevivir en el agua (Wei *et al.*, 1995; Karch y Loftis, 2000), esto se ha reportado en el agua de la tina de lavado de un empaque de tomate, donde se informó que *Salmonella montevideo* pudo haber sobrevivido en las partículas presentes en el agua (Wei *et al.*, 1995)

Es preferible prevenir en lugar de aplicar acciones para combatir la contaminación (FDA, 1998). El uso de desinfectantes es un método efectivo

para controlar los microorganismos del agua y aquellos presentes en los productos frescos o que se desarrollan sobre la superficie de los equipos de trabajo (Wei *et al*, 1995), dentro de estos compuestos, los que derivan del cloro son los más ampliamente utilizados en las plantas de alimentos (Price, 1993) Esto concordó con la información de una encuesta via telefónica de diez empaques de hortalizas frescas del Valle de Culiacán, donde se observó que los desinfectantes clorados son los más utilizados.

La prevención de la contaminación de frutas y hortalizas con microorganismos patógenos debería ser la meta de todos, desde las fases de pre-cosecha y pos-cosecha hasta que el producto llegue al consumidor (Beuchat, 1998).

Por todo lo descrito, el presente trabajo consistió en evaluar la actividad microbicida de tres desinfectantes clorados: hipoclorito de sodio, tricloro-s-triazinetrióna y tricloromelamine en casos extremos de contaminación con *E. coli*, *S. typhimurium* y bacteriófago MS-2, simulando condiciones de una tina de lavado de tomate.

OBJETIVO

Objetivo General

Evaluar la actividad microbicida de hipoclorito de sodio, tricloromelamine, tricloro-s-triazinetrióna, simulando condiciones de lavado de tomate.

Objetivos Particulares

1. Determinar la capacidad microbicida de hipoclorito de sodio, tricloromelamine y tricloro-s-triazinetrióna en la reducción de *E. coli*, *S. typhimurium* y el bacteriófago MS-2.
2. Establecer si la concentración de cloro que se utiliza en los empaques agrícolas es la adecuada, asumiendo casos extremos de agua contaminada con *E. coli*, *S. typhimurium* y el bacteriófago MS-2.
3. Evaluar la efectividad de los tres desinfectantes clorados con diferentes grados de turbidez.

HIPÓTESIS

1. Los tres desinfectantes clorados en las concentraciones de 100, 200 y 300 ppm son efectivos contra *E. coli*, *S. typhimurium* y el bacteriófago MS-2.
2. La turbidez del agua disminuye la efectividad de los desinfectantes clorados.

METAS

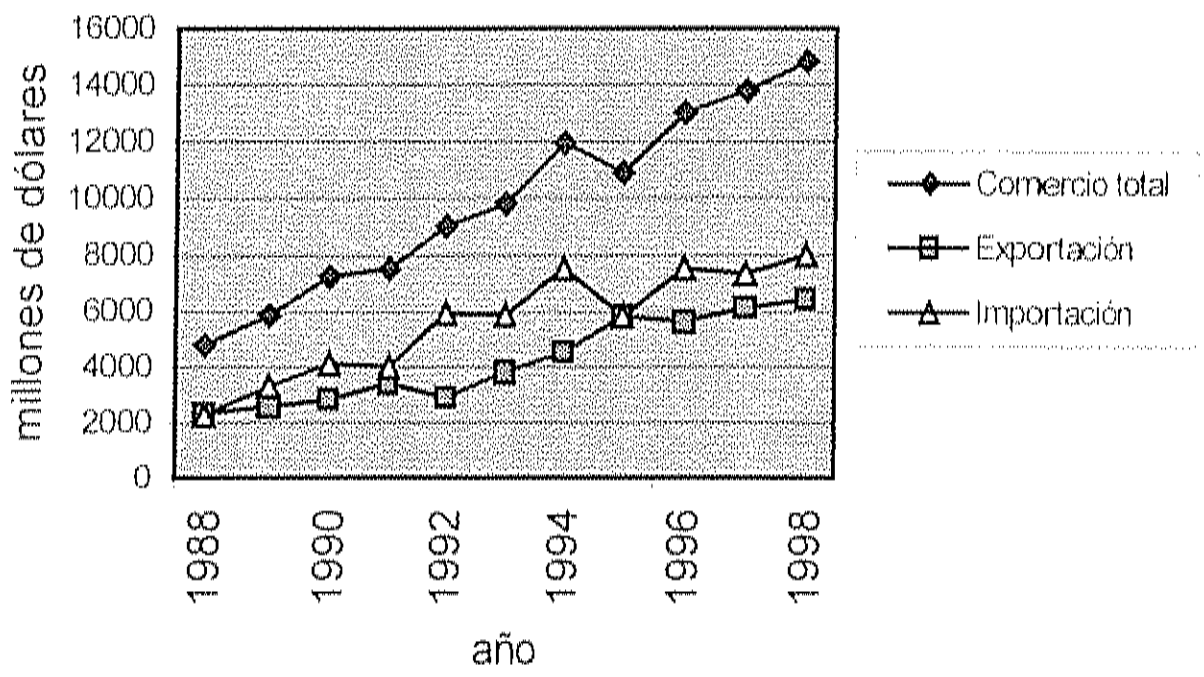
1. Determinar el mejor desinfectante clorado y la concentración adecuada contra *E. coli* con diferentes grados de turbidez.
2. Aportar información sobre la efectividad de algunos desinfectantes derivados del cloro en empaques hortícolas.
3. Hacer recomendaciones sobre mejores condiciones de trabajo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia económica del tomate

México ha demostrado ser una de las economías emergentes con mayor proyección en el mundo, situándose en una posición privilegiada para importar y exportar productos alimenticios; las exportaciones agroalimentarias de México superan los 6,600 millones de dólares y el consumo de productos importados crece al 12 % anual. En 1998 el comercio total de alimentos rebasó los 14,800 millones de dólares (Figura 1), las importaciones en bienes de capital para el sector alimentario sobrepasan los 170 millones de dólares anuales (Bancomext, 2000).

Figura 1. Producción de alimentos en México

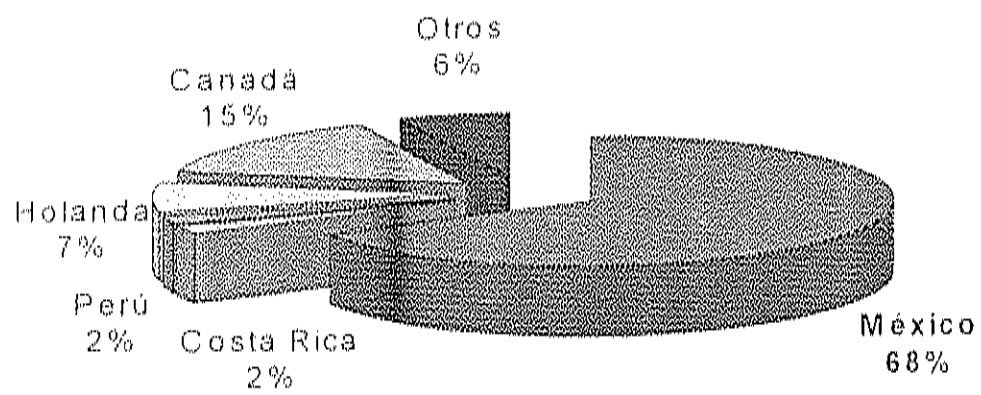


(Bancomext, 2000)

La producción hortofrutícola en México se mantiene como una industria competitiva a nivel mundial, debido en gran parte a la amplia diversidad de climas, las tecnologías empleadas y la mentalidad empresarial de nuestros productores. Estos factores han colocado a México como un país potencialmente productivo, en donde es posible obtener una amplia gama en diferentes productos en diferentes épocas del año. La horticultura en México genera más de 1 millón de empleos directos, que representan el 20 % de la población económicamente activa. A pesar de que en nuestro país se destina la mayor superficie al cultivo de granos (67%), estos cultivos solamente aportan el 36 % del valor de la producción. Las frutas y hortalizas ocupan en conjunto una superficie del 9 %, aportando el 18 % y el 16 % del valor total de la producción, respectivamente. Estos valores reflejan claramente la importancia que tienen estos cultivos en la economía nacional (Siller *et al.*, 2000).

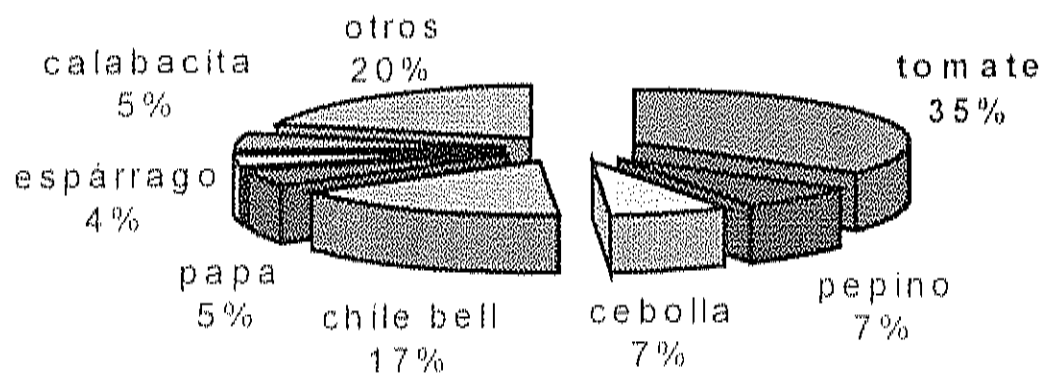
Dentro de las importaciones de frutas y hortalizas frescas a Estados Unidos, México con 1,500 millones de dólares domina como exportador (Figura 2), siendo el tomate la hortaliza principal (Figura 3). Las importaciones de tomate fresco a Estados Unidos fueron valuadas en 758 millones de dólares en 1998, más del 17 % que en 1997, debido al incremento por las ventas de México y Canadá; México con 567 millones y Canadá con 100 millones de dólares complementaron más del 80 % de la demanda de tomate importada en 1998 (USDA/FAS, 2000). Durante los ciclos 1995-1996 a 1999-2000, México se mantuvo en el primer lugar en las importaciones de tomate de Estados Unidos (Figura 4).

Figura 2. México es el exportador principal de frutas y hortalizas a Estados Unidos



USDA, 2000

Figura 3. En México, el tomate es la hortaliza de mayor exportación a Estados Unidos



USDA, 2000

De las 49 especies horticolas que se producen a nivel comercial en México el 57 % se concentra en los Estados de Sinaloa, Guanajuato, Sonora, Querétaro, Estado de México, Baja California, Jalisco y Morelos, siendo Sinaloa el Estado con mayor superficie sembrada de hortalizas (Figura 5), de acuerdo a estadísticas en el ciclo 1997-1998, la superficie sembrada fue de 59.734 hectáreas, siendo el tomate la principal hortaliza (Siller *et al* , 2000)

Figura 4. Importaciones de tomate durante los ciclos 95-96 a 99-00 de Estados Unidos

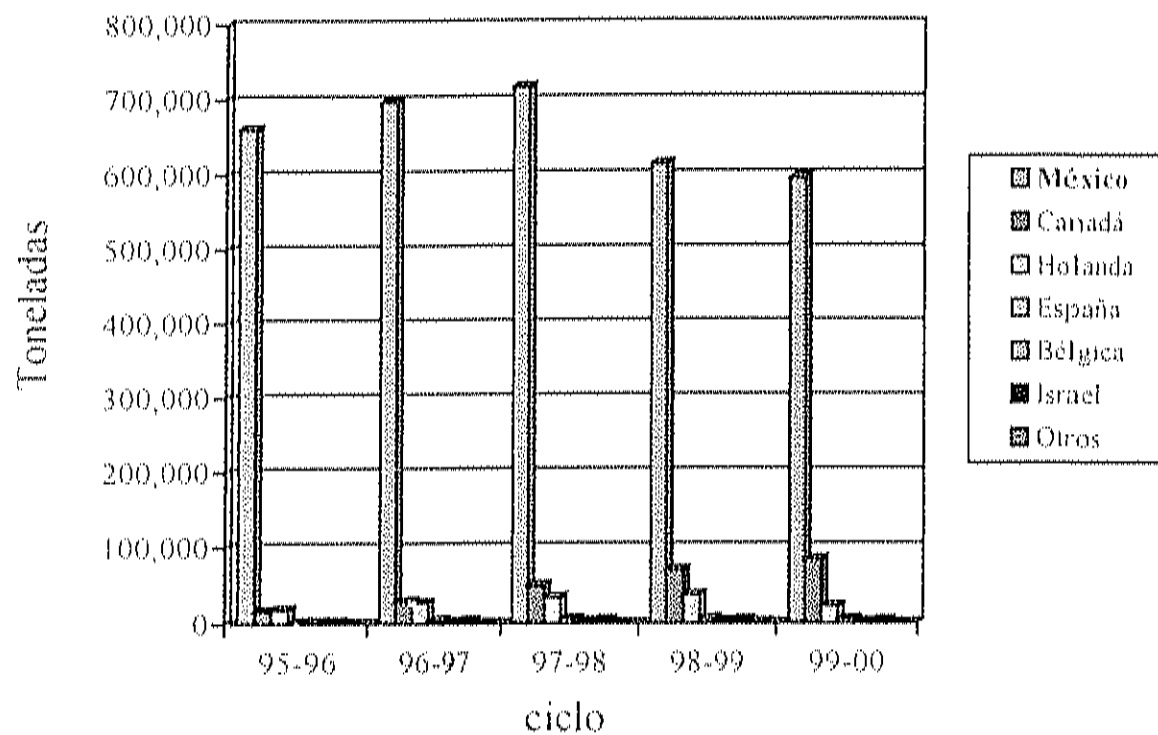
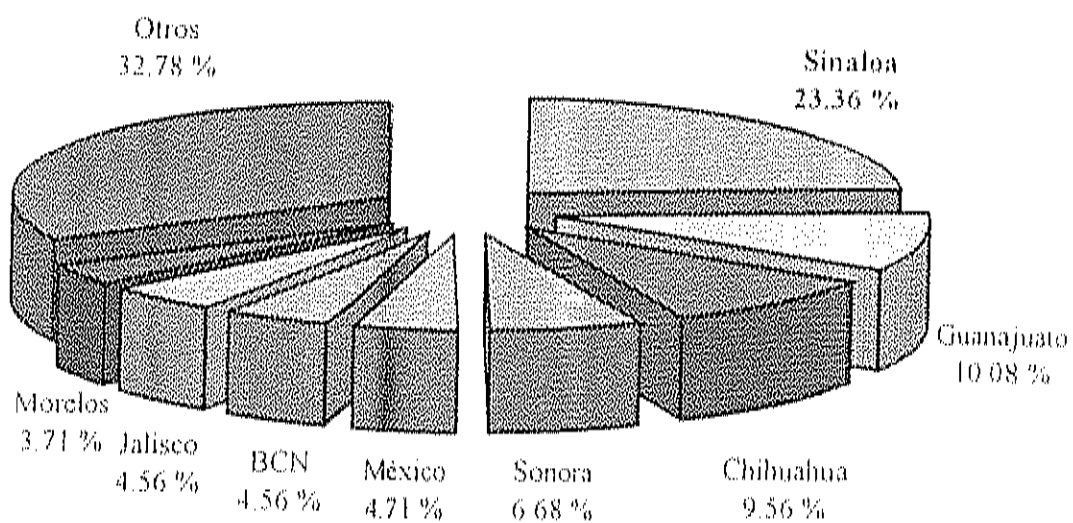


Figura 5. Superficie sembrada de hortalizas en México en el ciclo 1997-1998



Siller *et al.*, 2000

Descripción del problema

En muchos países se han llevado a cabo numerosos estudios para determinar la presencia de microorganismos patógenos de salud pública en frutas y hortalizas, donde se han encontrado porcentajes altos de frutas y hortalizas conteniendo bacterias capaces de causar infecciones a humanos; además, numerosas epidemias de enfermedades causadas por bacterias, virus y parásitos que han sido relacionados epidemiológicamente por el consumo de frutas y hortalizas frescas, donde los resultados de estas investigaciones se observan en el cuadro No.1 (Beuchat, 1998; Wei, 1995).

Las frutas y hortalizas frescas pueden ser el vehículo de transmisión de las enfermedades causadas por microorganismos (Castro, 1999). En países en desarrollo, algunos factores que contribuyen con el incremento real de enfermedades asociadas con frutas y hortalizas son: el uso de aguas residuales no tratadas y estiércol como fertilizante, para la producción de las frutas y hortalizas. Los patrones de cambio de consumo de alimentos podrían también incrementar el riesgo de enfermedades asociadas con estos productos; finalmente la susceptibilidad de las personas para adquirir enfermedades, como los ancianos, personas con el sistema inmune deficiente o con enfermedades crónicas (Beuchat, 1998). El tipo de producto, las condiciones del proceso y manejo previo afectan la diversidad de microorganismos encontrados en productos frescos, algunos microorganismos llegan a dominar en la población en función de la composición de la población original del producto en el campo,

distribución del tiempo, distribución de la temperatura y la atmósfera dentro del empaque, otra determinante principal de la población microbiológica es la condición fisiológica del producto, factores que dañan o debilitan el tejido de la planta, lo que se asume que fomentan el crecimiento microbiano, mientras que condiciones que mantienen la integridad fisiológica de los tejidos se espera que desfavorezca este crecimiento (Gross y Wang, 1999).

Dado a esta problemática, Estados Unidos ha anunciado el cierre de fronteras a países que no cumplan con inocuidad alimentaria (El debate, 2001) En 1997, el presidente de Estados Unidos anunció el plan "Iniciativa de ley para asegurar la inocuidad de frutas y hortalizas producidos en o importados a su país", con la finalidad de proteger la salud de sus consumidores, exigiendo los más altos estándares de calidad (FDA, 1998).

Cuadro No. 1. Ejemplos de microorganismos patógenos asociados con frutas y hortalizas involucrados en epidemias

Microorganismo	Alimento
<i>Bacillus cereus</i>	Coles
<i>Campylobacter jejuni</i>	Pepino y lechuga
<i>Clostridium botulinum</i>	Ensalada de vegetales
<i>Cryptosporidium parvium</i>	Cidra de manzana
<i>Cyclospora cayetanesis</i>	Fresas
<i>E. coli</i> O157:H7	Rábanos, jugo de manzana, cidra de manzana, lechuga
<i>Fasciola hepática</i>	Berro
<i>Giardia lamblia</i>	Hortalizas (zanahorias)
<i>Hepatitis A virus</i>	Lechuga, frambuesas, fresas
Norwalk virus	Ensalada tossed
<i>Salmonella agona</i>	Ensalada de col y cebollas
<i>S. poona</i> , <i>S. miami</i> y <i>S. oranienburg</i>	Melón
<i>Salmonella saint-paul</i>	Judías
<i>Salmonella stanley</i>	Alfalfa
<i>Salmonella thompson</i>	Raíces de hortalizas y algas secas
<i>Shigella flexneri</i>	Ensalada variada
<i>Shigella sonnei</i>	Lechuga y ensalada tossed
<i>Vibrio cholerae</i>	Ensalada y hortalizas

Beuchat, 1998. Wei, 1995

La calidad del agua

La calidad y procedencia del agua que entra en contacto con frutas y hortalizas frescas determina la posibilidad de contaminación microbiana, por lo que el agua que se emplea en sus cultivos debe ser de tal calidad que no sea vehículo de transmisión de enfermedades (FDA, 1998). En el campo las tres cuartas partes del abastecimiento del agua provienen de ríos y la otra cuarta parte de pozos. El hombre ha construido presas y sistemas de distribución para hacer un mejor uso del recurso, de esta manera es posible establecer un proceso productivo continuo a lo largo del año sin depender exclusivamente de las lluvias de temporal. Los costos son grandes, por lo cual todavía la mayor parte de la población agrícola queda a expensas de las lluvias. En cualquier caso para el adecuado funcionamiento de las labores del campo es necesario vigilar la calidad del agua (Guerrero, 1999; Rodríguez, 1999), al respecto se han recomendado prácticas higiénicas, que rigen los principales factores que deben controlarse como los microorganismos presentes introducidos a las aguas de riego por las descargas de los drenajes (Bell y Kiriakides, 1998). La contaminación por microorganismos puede acarrear graves problemas no solamente a la salud de plantas y animales sino también a la del hombre. Las descargas de drenajes en aguas de riego o mantos freáticos ha causado la inhabilitación de extensas zonas para la agricultura. La presencia de microorganismos debe vigilarse, ya que una población de 400 y 100 coliformes totales y fecales, respectivamente por 100 ml es la máxima cantidad permisible

en el agua de riego (Guerrero, 1999). En algunos países son permitidos promedios geométricos máximos de 1 000 coliformes totales por 100 ml o 200 coliformes fecales por 100 ml, durante un periodo de 30 días (Nava, 1987). La norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, establece que para determinar la contaminación por patógenos se toma como indicador a los coliformes fecales, el límite máximo permisible en las descargas de aguas residuales para uso en riego agrícola es de 1, 000 y 2, 000 como número más probable de coliformes fecales por cada 100 ml para el promedio mensual y diario, respectivamente (CNA, 1997).

La mayoría de los virus patógenos son de origen fecal o urinario, por lo que llegan a ser una preocupación para la salud humana cuando las aguas residuales contaminadas tienen contacto con productos frescos, situación principalmente que ocurre con excremento de animales y humanos que son depositados en el agua utilizada para irrigación (Shewfelt, 1993), en el cuadro No. 2 se muestran los virus entéricos que pueden estar presentes en el agua contaminada.

Cuadro 2. Virus entéricos humanos que pueden estar presentes en agua contaminada

Virus	Número de tipos	Enfermedades
Enterovirus		
Poliovirus	3	Parálisis, meningitis y fiebre
Echovirus	31	Meningitis, rash, diarrea, fiebre y enfermedades respiratorias.
Coxsackievirus A	23	Enfermedades respiratorias, meningitis, fiebre y Herpangina.
Coxsackievirus B	5	Miocarditis, rash, alteraciones congénitas del corazón, fiebre, meningitis y enferm. respiratorias
Virus de la Hepatitis A	1	Hepatitis A
Norwalk (Gastroenteritis)	2	Vómito, diarrea y fiebre
Rotavirus	3	Vómito y diarrea
Reovirus	3	No está establecido claramente
Adenovirus	37	Enfermedades respiratorias, infección en los ojos y gastroenteritis
Parvovirus	3	Fiebre, rash y anemia aplásica.

Rao, *et al*, 1986

Factores como el estado de cultivo y la forma en que se manipulan las frutas y hortalizas determinan la posibilidad de contaminación con microorganismos patógenos transmitidos por el agua. Las frutas y hortalizas con superficies amplias como hortalizas con hojas y aquellas en que, debido a sus características superficiales permiten la adherencia, son más susceptibles a la contaminación microbiana. La industria hortofrutícola utiliza métodos de desinfección para asegurar la calidad del agua y evitar la posibilidad de contaminación (Gross y Wang, 1999, FDA, 1998).

El agua puede llegar a ser contaminada por alrededor de 140 tipos de virus entéricos, su presencia dentro de aguas residuales reflejan infecciones de virus entre la población. Los virus entéricos están presentes relativamente en números pequeños dentro del agua y agua de desecho; por consiguiente, las muestras del medio ambiente de 10 a 1000 litros deben de estar concentradas para detectar estos patógenos. Desde el punto de vista epidemiológico, los virus entéricos son principalmente transmitidos por contacto de persona a persona; sin embargo, ellos también pueden ser transmitidos por agua ya sea directamente con agua para beber o de albercas, o indirectamente a través de alimentos contaminados como mariscos y hortalizas (Bitton, 1994).

El departamento de alimentos y drogas de Estados Unidos (FDA); elaboró un documento titulado "Guía para minimizar riesgos en la seguridad microbiológica de frutas y hortalizas frescas", esta guía recomienda buenas prácticas agrícolas y de manufactura para minimizar los riesgos comunes durante el cultivo, cosecha, empaque y transporte de la mayoría de las frutas y

hortalizas frescas que habitualmente se consumen frescas o mínimamente procesadas (Smith, 1998)

Un tratamiento adecuado de desinfección de frutas y hortalizas frescas puede reducir el riesgo de contaminación microbiana, este paso es importante ya que la mayor parte de esta contaminación ocurre en la superficie y los microorganismos patógenos pasan a otras frutas y hortalizas, por lo que se contaminan cantidades importantes de estos productos. Por otra parte, si el agua se contamina durante el lavado y se utiliza, será una fuente potencial de contaminación microbiana (FDA, 1998)

Desinfección

La desinfección es la destrucción de microorganismos patógenos, como virus, bacterias y protozoarios. El uso del cloro se inició a principios del siglo pasado para prevenir enfermedades causadas por microorganismos. La destrucción de microorganismos patógenos por desinfección ayuda considerablemente a la reducción de enfermedades por consumo de agua y alimentos (Bitton, 1994) La desinfección es parte esencial del procesamiento de los alimentos, los productores deben ofrecer siempre altos estándares higiénicos desde las materias primas, hasta la misma planta (Torres, 1997).

De acuerdo a la resistencia de los microorganismos a la desinfección, el orden es: Quistes de protozoarios, bacterias formadoras de esporas, virus entéricos y bacterias vegetativas (Bitton, 1994)

El daño por cloro puede afectar a una amplia variedad de patógenos, incluyendo *E. coli* enterotoxigénica, *Salmonella typhimurium*, entre otros, el límite de daño por cloro depende del tipo de microorganismo de que se trate. El mecanismo de acción del cloro libre puede ser potencializado por la adición de sales tales como KCl, NaCl o CsCl (Bitton, 1994)

La prevención de la contaminación en frutas y hortalizas frescas es una tarea difícil, ya que los microorganismos se encuentran en el suelo y en la superficie de los frutos en el momento de ser cosechados, en fuentes de suministro que proveen agua no apropiada para riego, y el lavado de frutas y hortalizas frescas (Smith, 1998) Es preferible prevenir la contaminación que tomar medidas correctivas una vez que ocurre. Sin embargo, el uso de compuestos químicos antimicrobianos en el agua de lavado ayuda a reducir la acumulación de microorganismos y en la superficie de las frutas y hortalizas, por lo que los desinfectantes generan cierta seguridad de reducir la contaminación microbiana (FDA, 1998). La efectividad de los agentes antimicrobianos depende de su estado químico y físico, las condiciones de tratamiento (como la temperatura del agua, su nivel de acidez y el período de contacto), la resistencia de los microorganismos patógenos, y la naturaleza de la superficie de las frutas y hortalizas (Price, 1997; Thurman and Gerba, 1988) Por ejemplo, normalmente se añade cloro al agua en una proporción de 50 a 200 partes por millón (ppm) a un pH de 6.0 a 7.5 para el tratamiento de frutas y hortalizas frescas después de la cosecha, siendo el período de contacto entre 1 y 2 minutos (FDA, 1998)

El término desinfectante es usado generalmente en la industria alimentaria para referirse a los agentes que reducen el número de microorganismos presentes en el ambiente a un nivel aceptable no necesariamente estéril (Hayes, 1997), los desinfectantes para uso en alimentos deberían tener idealmente las siguientes propiedades:

- Ser igualmente efectivo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas y tener efecto contra la mayoría de las esporas de levaduras.
- Ser estable en presencia de residuos orgánicos y sales en el agua.
- No corrosivo, no tóxico, ni irritante para piel y ojos.
- Libre de olor o de olor inofensivo.
- Estable en forma concentrada durante almacenamiento prolongado y en forma diluida en periodos cortos.
- Fácilmente soluble y enjuagable en agua.
- De precio accesible y de alta efectividad.

La importancia del uso de cloro

Acción desinfectante del cloro

La desinfección con cloro es muy común en tratamientos de agua, debido a su bajo costo, habilidad para generar cloro residual y su efectividad a bajas concentraciones (Curtis, 1998) Algunos desinfectantes pueden ser añadidos a materiales ingeridos por los humanos como es el caso del cloro (Garbutt, 1997).

siendo este uno de los desinfectantes más ampliamente utilizados en la industria alimentaria, el cual es efectivo contra esporas bacterianas, virus, levaduras y hongos, bacterias Gram positivas y Gram negativas; en orden decreciente de acuerdo a su resistencia al efecto del cloro (Garbutt, 1997) Cuando el cloro es disuelto en agua se disocia en su forma activa el ácido hipocloroso, éste se difunde a través de las membranas celulares donde oxida las dobles ligaduras de los ácidos grasos presentes, también oxida los grupos sulfhidrilo de las enzimas celulares. De la misma manera, el cloro destruye la cubierta de las esporas bacterianas; una solución de hipoclorito de sodio al 10 % es suficiente para destruir esporas (Price, 1993, Garbutt, 1997) La cloración se lleva a cabo generalmente utilizando cloro o uno de sus hipocloritos, ambos son desinfectantes moderadamente efectivos para las superficies que están en contacto con frutas y hortalizas durante la cosecha, manejo posterior y equipo de procesado. En el agua de lavado de frutas y hortalizas frescas se utiliza comúnmente concentraciones de 50 a 200 ppm de cloro y un tiempo de contacto de 1 a 2 minutos (Beuchat, 1998).

Efectividad del cloro

El cloro se encuentra entre los compuestos más conocidos, el cual es efectivo contra todo tipo de microorganismo, fácil de manejar y de costo relativamente bajo; sin embargo, pierde su actividad en presencia de materia orgánica (Rodríguez, 1999)

La efectividad del cloro se relaciona con el pH y la temperatura además del tipo de producto, el número y diversidad de los microorganismos presentes el tiempo de contacto y la turbidez del agua también tienen gran influencia sobre el poder desinfectante del cloro (Garbutt, 1997; Hayes, 1997; Beuchat, 1998)

La desinfección con cloro es muy común en tratamientos de agua, debido a su bajo costo, habilidad para generar cloro residual y su efectividad a bajas concentraciones (Curtis, 1998) El cloro ha sido usado por muchos años en tratamientos de agua de consumo y residuales, así como en desinfección de equipo para el procesamiento de alimentos y superficies del área del proceso También se ha usado como un desinfectante en el lavado y asperjado en la industria de frutas y hortalizas (FDA, 1998; Beuchat, 1998).

El cloro causa dos tipos de daño a las células bacterianas, el primero es la interrupción en la integridad de la membrana celular, causando pérdida en la permeabilidad celular y la interrupción de otras funciones celulares; la exposición al cloro trae como consecuencia la liberación de proteínas, RNA y DNA. El segundo daño es a ácidos nucleicos y enzimas, el cloro también daña tanto a los ácidos nucleicos como a las enzimas, una de las consecuencias de la actividad de la catalasa reducida es la inhibición por el peróxido de hidrógeno acumulado. En el caso de los virus, el mecanismo de acción puede depender del tipo de virus, el daño a ácidos nucleicos es el principal modo de activación del bacteriófago f2 o poliovirus tipo, la cubierta proteica parece ser el blanco para otros tipos de virus, como los rotavirus (Bitton 1994)

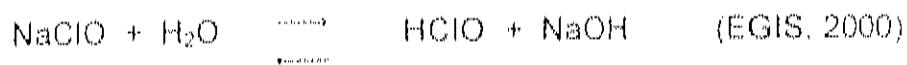
Se han realizado diversos estudios con respecto a la efectividad bactericida del cloro en hortalizas frescas previamente inoculados en su superficie con bacterias patógenas; uno de los más claros y sencillos se realizó con coles de Bruselas que fueron sumergidas en una solución de cloro de 200 ppm por 10 seg se observó una reducción del número de células viables de *Lysteria monocytógenes* de 100 veces, por otro lado se hizo el mismo procedimiento pero utilizando agua estéril y sólo se obtuvo una reducción de 10 veces el número de células viables de la bacteria (Beuchat, 1998) Así también se estudió la efectividad del cloro para la inactivación de *Salmonella montevideo* en tomate verde maduro: las poblaciones de la bacteria en la superficie y en el pedúnculo fueron reducidas significativamente por la inmersión de los tomates por dos minutos en soluciones de 60 a 110 ppm de cloro; por otro lado, la inmersión de los tomates en una solución de 320 ppm de cloro no garantizó la completa inactivación de esta bacteria (Zhuang y Beucaht, 1995).

Generalidades de desinfectantes clorados

Hipoclorito de sodio

La cloración es llevada a cabo usando el cloro o uno de los hipocloritos, los cuales son desinfectantes moderadamente efectivos que pueden estar en contacto con frutas y hortalizas durante la cosecha y manejo para el equipo de procesamiento (FDA, 1998; Beuchat, 1998).

El hipoclorito de sodio aproximadamente al 15 % ("lejía", "cloro líquido") es un líquido de color amarillo pálido y tacto jabonoso reacciona con el agua generando ácido hipocloroso y sosa, de acuerdo a la siguiente ecuación química:



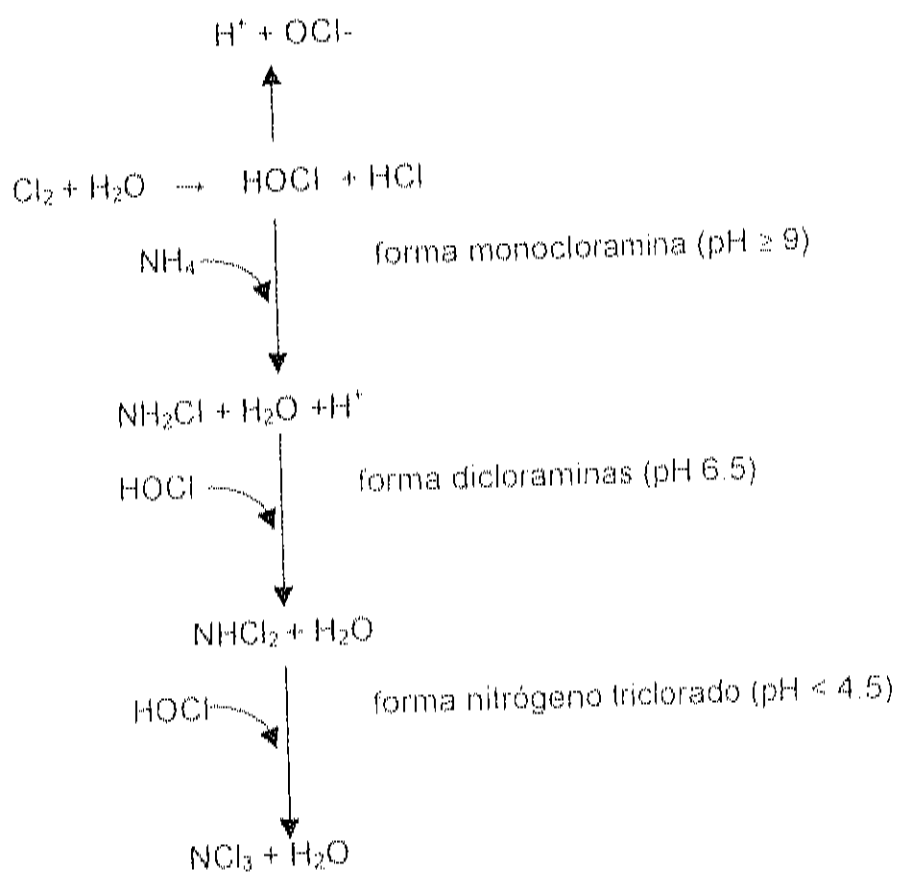
La actividad letal o inhibitoria depende de la cantidad de cloro libre disponible como ácido hipocloroso (HClO) en el agua que está en contacto con las células microbianas (Curtis, 1998). Existen posibles reacciones del cloro en el agua (Figura 6), de los tres componentes clorados (HClO, OCl⁻ y NH₂Cl), el ácido hipocloroso es el más efectivo para la inactivación de bacterias patógenas e indicadoras, tratamientos con agua de 1 mg/l. o menos y alrededor de 30 minutos, es generalmente suficiente para reducir un número de bacterias (Bitton, 1994). El ácido hipocloroso es el componente antimicrobiano activo en la solución, al agregar hipoclorito de sodio el pH se incrementa, el ácido se disocia rápidamente a iones hipoclorito (OCl⁻) a pH alto, o cloro gas (Cl₂) a pH bajo, por lo que se debe mantener en el rango de 6.5 a 7.5 para que el ácido hipocloroso sea estable (Izumi, 1999), a medida que el pH en la solución es reducido, el equilibrio es en favor del HOCl. Sin embargo, los contenedores metálicos y el equipo de procesamiento son con frecuencia susceptibles a la corrosión a pH bajo, por lo que se recomienda un pH de 6.0 a 7.5 para llevar a

cabo una actividad desinfectante efectiva sin dañar las superficies de los equipos (Curtis, 1998, Izumi, 1999, Beuchat, 1998). Los porcentajes de cloro como HOCl a pH de 6.0 y 8.0 son alrededor de 97 % y 23 % respectivamente, a 20 °C. El cloro gas tóxico es formado a pH debajo de 4. Con respecto al pH, el equilibrio es en favor del HOCl a medida que la temperatura decrece, esto es debido a que el cloro vaporiza con el incremento de la temperatura. El cloro rápidamente pierde actividad con el contacto de materia orgánica o exposición al aire, luz o metales. Es importante saber que las personas que usan agua clorada como un desinfectante en exposición prolongada, los vapores de cloro pueden causar irritación en la piel y en el tracto respiratorio. La exposición límite es de 1 ppm en Estados Unidos hasta los 15 minutos. La máxima solubilidad del cloro es llevada a cabo en el agua alrededor de 4°C. Sin embargo, la temperatura del agua clorada debería ser idealmente por lo menos 10 °C más alta que la de frutas y hortalizas para llevar a cabo un diferencial de temperatura positivo (Zhuang y Beuchat, 1995; Bartz y Showalter 1981), aunque se debe minimizar el lavado con agua caliente en los tejidos y áreas abiertas por daños mecánicos o presentes de manera natural, por ejemplo lenticelas o estomas en la cutícula u hojas (Beuchat, 1998), ya que los patógenos son hospedados bajo la cutícula o en las lenticelas al momento de la cosecha lo que ocasiona la dificultad de los bactericidas y fungicidas convencionales de penetrar en la cutícula durante el control poscosecha (Ojeda *et al*, 1995).

El hipoclorito de sodio en disolución no es un producto estable y debe almacenarse en una área fresca y oscura, debido a que la luz ultravioleta y el

calor lo descomponen, contiene sosa cáustica como estabilizante, por lo que su continua adición producirá un incremento del pH del agua (EGIS, 2000)

Figura 6. Reacciones del cloro en el agua



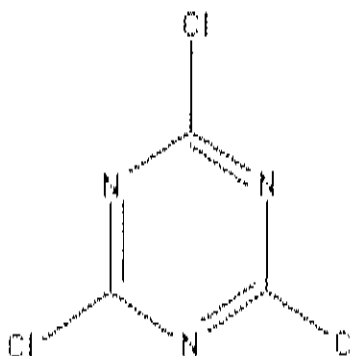
Thurman y Gerba, 1988

Tricloro-s-triazinetrióna

Sus sinónimos son 2,4,6-Triclorotriazina; 2,4,6- Tricloro-1,3,5-Triazina; Triclorocianidina; Tricloruro de s-Triazina; 2,4,6-Tricloro-s-triazina.

El número de CAS: 108-77-0.

Su fórmula condensada es $C_3Cl_3N_3$ y su fórmula estructural es:



La toxicidad oral en ratas LD_{50} es de 930 mg/8kg.

La materia prima con que se elabora es hidrógeno:cianuro:ácido hidrocianico (74:90:8).

Es un producto que se utiliza en la desinfección de albercas.

Se recomienda utilizar a pH de 7.2 a 7.6 y temperatura máxima de 29 °C.

Sus ventajas de uso son:

Eficiencia por su estabilización

Reducción en la pérdida de cloro en el agua provocada por los rayos solares y la temperatura.

En el Cuadro 3 se muestran sus propiedades físicas y químicas

Cuadro 3. Propiedades Físicas y Químicas de Tricloro-s-triazinetrióna

Propiedad	Características
Estado físico	Cristales color claro y olor pungente
Apariencia	Polvo blanco cristalino
Punto de fusión	145-147 °C
Punto de ebullición	192 °C
Densidad	1.32
Solubilidad en agua	Se hidroliza

Tricloromelamine. TCM

Su fórmula es N2, N4, N6 - Tricloro - 2,4,6 - Triamino - 1,3,5 - Triazina (C3H3N6Cl3).

El número de CAS: 7673-09-8.

Se utiliza en algunas áreas como:

- Bares y restaurantes, áreas de servicio de alimentos
- Lavado de frutas y hortalizas en la Armada de Estados Unidos
- Industrias procesadoras de carne, pollo y pescado
- Hospitales

Sus ventajas de uso son:

- Fácil manejo
- No deja olores ni manchas
- Su actividad es consistente

Cuadro 4. Propiedades Físicas y Químicas de Triclorometamina

Propiedad	Características
Estado físico	Polvo color blanco
Peso molecular	229,46
Punto de fusión	300 °C
Densidad	21 lbs/ft3
Punto de Ignición	150 °F

H&S Chemical Co., Inc.

Cuadro 5. Costo, cloro total y cloro libre de los desinfectantes

Desinfectante	Costo (l/kg)	Ppm de Cloro total	% de Cloro total	ppm de cloro libre	% de cloro libre
NaOCl	\$ 3 por litro	82, 500	8.25	74, 000	7.4
TCM	\$ 36 por kg	30, 000	3	17, 000	1.7
TsT	\$ 110 por kg	900, 000	90	890, 000	89

Generalidades de las especies en estudio

Escherichia coli

Escherichia coli es microflora normal del tracto intestinal de humanos y otros animales de sangre caliente. *E. coli* fue descubierta en el año de 1885 por el Dr. Theodor Escherich, desde entonces ha sido estudiada por los bacteriólogos, ya que es fácil de crecer, manipular y caracterizar (Bell, 1998; Brown, 1995).

Las cepas que causan diarrea son categorizadas dentro de los grupos de propiedades virulenta, mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos y características antigénicas. Los principales grupos son designados como enterotoxigénicos, enterohemorrágico, enteropatogénico, enteroinvasivo, difuso-adherente y enteroagregativo. Las frutas y hortalizas han llegado a ser contaminadas con uno o más de estos grupos, tanto en el campo como en el manejo poscosecha. *E. coli* es causa de la diarrea del viajero, enfermedad que en ocasiones padecen individuos que visitan países con estándares de higiene en alimentación y agua diferentes a los de su país. Se cree que las frutas y hortalizas crudas contaminadas son una causa común de la diarrea del viajero, ya que ha sido asociada por consumo de ensaladas y zanahorias (Beuchat, 1998). *E. coli* puede sobrevivir a pH mínimos de 4.4 y máximo de 9.0, se puede reducir por lo menos hasta 10^6 veces con tratamientos de agua caliente a 70 °C por 2 min (Bell, 1998).

E. coli O157:H7 ha sido reconocida con mayor frecuencia, recientemente como un patógeno por consumo de alimentos. Desde que se conoce que el

patógeno, se encuentra de manera natural en el ganado, la mayoría de las epidemias de esta enfermedad han sido asociadas con carne y productos lácteos de poco cocimiento. Sin embargo, se han relacionado epidemias con lechuga, sidra de manzana, rábano y alfalfa. De acuerdo a algunos estudios, *E. coli* puede crecer en cubos de melón y sandía, lechuga picada, rodajas de pepinos y sidra de manzana. La contaminación de frutas y hortalizas con *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica puede ocurrir cuando el ganado y aún otros rumiantes como venados, entran inadvertidamente al campo o cuando impropiamente estiércol de vaca ha sido aplicado como fertilizante. El potencial de contaminación puede incrementarse cuando frutas y hortalizas han caído de la planta a la tierra y son recogidas y dispuestas a una cadena de manejo y procesamiento, también pueden ser contaminados por partículas de tierra del aire, es posible que frutas y hortalizas puedan llegar a ser contaminadas. Los trabajadores en granjas y empaques pueden ser una fuente de *E. coli* O157:H7 (Beuchat, 1998).

E. coli es el organismo más común en microbiología, se conoce gran cantidad sobre la bioquímica y genética de *E. coli* y, esta bacteria continua siendo una importante herramienta biológica para la investigación. Su presencia en el agua y en los alimentos es importante como un indicador de contaminación fecal y que otros microorganismos de origen fecal, incluyendo patógenos pueden estar presentes (Tortora *et al*, 1994; Doyle, 1996). Hoy en día *E. coli* es el principal indicador de contaminación fecal entre los organismos indicadores fecales comúnmente usados, en evaluaciones para alimentos

seguros, la presencia de *E. coli* significa una posibilidad mayor de riesgo que la presencia de otras bacterias coliformes (Doyle, 1996). *E. coli* no es usualmente considerada como patogénica; sin embargo, puede ser una causa común en infecciones del tracto urinario. Ciertas cepas producen enterotoxinas que comúnmente ocasionan la diarrea del viajero y ocasionalmente causan serios problemas en enfermedades por consumo de alimento (Tortora, 1994). Algunos microorganismos son básicamente de una enfermedad. En contraste, los tipos de *E. coli* pueden causar una impresionante variedad de diferentes tipos de enfermedades, incluyendo diarrea, disentería, síndrome urémico hemolítico, infecciones de vejiga, septicemia, neumonía y meningitis. El tipo de *E. coli* que causa diarrea no causará infecciones urinarias o meningitis. La versatilidad de los tipos de *E. coli* son vistos debido al efecto que diferentes cepas han adquirido grupos de genes virulentos, la mayoría de los serotipos de *E. coli* son virulentos (Salyers, 1994).

Los serotipos fueron inicialmente clasificados en base a la reacción con anticuerpos específicos. El sistema serológico está basado sobre los antígenos en la superficie de *E. coli*. El antígeno O es usado para determinar el serogrupo y el antígeno H (flagelo) identifica el serotipo. Una nueva clasificación está basada en los factores de virulencia, tales como: antinvasivos, síntomas, propiedades adherentes y toxinas (Cabello, 1998).

Dentro del grupo *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), existe un predominante serogrupo y serotipo O157:H7. Los tipos EHEC han sido reconocidos recientemente como una causa de serias enfermedades, se ha

visto recientemente un número de malestares en países en desarrollo (Salyers, 1994). *E. coli* O157:H7 ha sido detectada en heces de animales y humanos, así como en agua recreacional y en agua utilizada para irrigación de frutas y hortalizas (Suslow, 1998).

E. coli enterohemorrágica O157:H7, primeramente reconocida como un patógeno humano en 1982, es ahora conocida como una importante causa de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. *E. coli* O157:H7 ha sido encontrada en agua recreacional y en agua utilizada para irrigación de frutas y hortalizas; ha sido detectada en heces de animales y humanos. En investigaciones recientes, se ha demostrado que *E. coli* O157:H7 es más resistente que *E. coli* estándar en condiciones ácidas, de secado o congelado; así como, las condiciones adversas del medio ambiente que inactivan a la bacteria *E. coli* convencional, *E. coli* O157:H7 es mucho más tolerante (Suslow, 1998).

Se investigó la habilidad de *E. coli* O157:H7 para sobrevivir y crecer en cubos de sandía y melón sobre la superficie externa. La población del patógeno se incrementó en cubos almacenados a 25 °C, permaneciendo constantes a 5 °C sobre 34 horas de periodo de almacenamiento. El crecimiento fue observado en la corteza de melones bajo humedad relativa alta a 25 °C por 14 a 22 días. El patógeno rápidamente se inactivó en la corteza de melones almacenados a 5 °C. *E. coli* O157:H7 no fue detectada en melones no inoculados (Del Rosario, 1994).

E. coli O157:H7 aislada de un paciente fue utilizada en seis diferentes lotes de sidra de manzana no pasteurizada. Además, de la eficacia de dos preservativos: 0.1 % de benzoato de sodio y 0.1 % de sorbato de potasio, usados por separado y en combinación fueron evaluados para efecto antimicrobiano en la bacteria. Los estudios fueron hechos a 8 y 25 °C, con sidras teniendo valores de pH de 3.6 a 4.0. Los resultados revelaron que la población de *E. coli* O157:H7 se incrementó un \log_{10} de UFC/ml y permanecieron estables por aproximadamente 12 días en lotes inoculados con una población de 10,000 UFC por ml de *E. coli* O157:H7 y conservados a 8 °C. La bacteria sobrevivió de 10 a 21 días y 2 a 3 días a 8 y 25 °C, respectivamente. El sorbato de potasio tuvo un mínimo efecto en la población con sobrevivientes en sidra conteniendo benzoato de sodio, fueron detectados en sólo 2 a 10 días o menos y 1 a 2 días a 8 y 25 °C, respectivamente. Los rangos más altos de inactivación ocurrieron en la presencia de una combinación de 0.1 % de benzoato de sodio y 0.1 % de sorbato de potasio (Tong, 1994).

Se probó salsa estilo china en tres diferentes condiciones de secado, comúnmente empleadas durante el proceso de manufactura. El comportamiento de *E. coli* O157:H7 durante el periodo de secado fue comparado y determinado. El efecto de aditivos en la sobrevivencia de esta bacteria fue también identificado. Los resultados mostraron que las poblaciones de esta bacteria decrecieron 1.51 log UFC/g en salsa conteniendo aditivos después de 6 horas de periodo de secado a 50 °C. Sin embargo, el número de células viables de *E. coli* O157:H7 se incrementaron ligeramente en salsas sin aditivos. Cuando

llevados a secado por aire a 55 °C, por 6 horas y 55 °C de 2 a 5 horas y 60 °C por 3 a 5 horas una reducción en el número de células viables de la bacteria fue observado con y sin aditivos. La reducción fue más significativa en salsas conteniendo agentes curantes que sin éstos. *E. coli* no viable fue detectada después de 6 horas de secado en muestras conteniendo aditivos, mientras las muestras control contenían *E. coli* O157:H7 viable en población de 2.65 a 4.36 log UFC/g. Después de secar la salsa a 55 °C por 4 horas, la inactivación se incrementó en presencia de 30.0 g/kg de cloruro de sodio y 1.5 g/kg de sorbato de sodio. Por otro lado, la presencia de 0.07 a 0.15 g/kg de nitrito de sodio no incrementó la inactivación de *E. coli* O157:H7 comparada con su control (Chyang, 1997).

Se determinó la influencia del empacado de atmósferas modificadas, almacenamiento de temperatura y tiempo en supervivencia y crecimiento de *E. coli* O157:H7 inoculada en trozos de lechuga, rebanadas de pepino y trozos de zanahoria. El crecimiento de microorganismos psicrófilos y mesófilos y cambios en pH y cualidades sensoriales, como una evaluación subjetiva fueron monitoreados. El empacado bajo la atmósfera contenía 3 % de oxígeno y 97 % de nitrógeno, no habiendo aparente efecto con las poblaciones de la bacteria *E. coli* O157:H7, psicrófilos o mesófilos. Las poblaciones viables declinaron en hortalizas almacenadas a 5 °C y se incrementaron en hortalizas almacenados a 12 y 21 °C; sugirieron que un factor no conocido asociado con zanahoria pudiese inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7. La reducción de pH en frutas y hortalizas fue relacionada con incrementos iniciales en la población y

microfloras decrecieron eventualmente en algunas muestras. Aquéllas almacenadas a 21 °C, fueron atribuidas el efecto tóxico de ácidos acumulados. Cambios en apariencia visual de frutas y hortalizas no fueron influenciados substancialmente por el crecimiento de *E. coli* O157:H7. La habilidad de la bacteria para crecer en ensaladas de hortalizas frescas en condiciones de procesamiento y almacenamiento simulando aquéllas usadas rutinariamente en práctica comercial ha sido demostrada (Abdul-Raouf, 1993).

Salmonella typhimurium

Salmonella spp., bacteria nombrada así por su descubridor Daniel Salmon, posee la forma de bacilo, es corta (de 1 a 2 μm), móvil por poseer flagelos, Gram negativa, no forma esporas (Tortora *et al*, 1995); es un organismo anaerobio facultativo, bioquímicamente caracterizado por su habilidad de fermentar la glucosa con la producción de ácido y gas, presenta inhabilidad de fermentar lactosa y sacarosa; la temperatura óptima de crecimiento es alrededor de 38 °C, siendo relativamente sensible al calor a los 60 °C de 15 a 20 minutos, no se desarrolla a temperaturas menores de 7 a 8 °C. El género *Salmonella* está constituido por más de 2700 serotipos (Beuchat, 1995), el número es continuamente incrementado a medida que distintas cepas son aisladas, muchas de estas son nombradas por el lugar donde fueron aisladas, como *S. newport*, *S. derby*, *S. dublin*, *S. heidelberg* y *S. montevideo*; aunque originalmente su nombre fue registrado con palabras riesgosas y con frecuencia por la enfermedad o el animal afectado, por ejemplo: *S. typhimurium*

que causa tifoidea en ratones (Hayes, 1997), el esquema antigénico para clasificar *Salmonella* spp. reconoce más de 2300 serotipos y mientras que todos son considerados patógenos, sólo alrededor de 200 son asociados con enfermedades humanas (Beuchat, 1998). *Salmonella* spp. pertenece a la familia de las enterobacteriaceae que son ampliamente distribuidas en el medio ambiente, sus números en aguas de desecho están en el rango de unos cuantos a 8,000 organismos por 100 ml., se ha estimado que el 0.1 % de la población excreta *Salmonella* spp. en algún momento dado. En Estados Unidos la salmonelosis es principalmente causada por consumo de alimentos contaminados; este patógeno produce una endotoxina que causa fiebre, náusea y diarrea, pudiendo ser fatal sino se trata adecuadamente por antibióticos. Las especies implicadas en la contaminación de alimentos son *S. paratyphi* y *S. typhimurium*. Estas especies pueden crecer fácilmente en alimentos contaminados y causar intoxicación por alimentos. Especies tales como *S. typhimurium* y *S. enteritidis* causan gastroenteritis, la cual es caracterizada por diarrea y dolores abdominales (Bitton, 1994). Las condiciones higiénicas durante la producción, cosecha, transporte y distribución de frutas y hortalizas de algunos países no siempre pueden encontrarse requerimientos de higiene mínimos, lo que ocasiona la contaminación a otro país (Bell, 1998).

Existen reportes de salmonelosis humana relacionada con melón (Blostein, 1993; Golden, 1992) y alfalfa importadas a Estados Unidos (Bell, 1998). El lavado de frutas y hortalizas con agua contaminada y el manejo de producción por trabajadores infectados, vendedores y consumidores en el

mercado, contribuye a diseminar los microorganismos patogénicos, incluyendo a *Salmonella* spp. que ha sido aislada de muchos tipos de frutas y hortalizas frescas; epidemias de salmonelosis han sido asociada con una diversidad de hortalizas, incluyendo tomate, judía, melón, jugo de naranja y jugo de manzana; el patógeno puede crecer sobre la superficie de alfalfa, tomate y tal vez en otras frutas y hortalizas maduras, haciendo imperativo el uso de prácticas de manejo poscosecha (Beuchat, 1998). El principal hábitat de *Salmonella* spp. es el tracto intestinal de los animales en la granja y los pájaros, es de esperarse que estos animales podrían estar contaminados antes del consumo (Hayes, 1997).

Las especies o serotipos de esta bacteria que más intensamente han sido estudiados como causantes de infección por consumo de alimentos son *S. enteritidis*, *S. typhimurium* y *S. choleraesuis* y a nivel molecular, *S. typhimurium*, *S. choleraesuis* y *S. typhi*. *S. enteritidis* es causa común de infecciones y diarrea en animales y humanos. Se presenta con frecuencia en el consumo de alimentos principalmente leche y pollo, *S. typhimurium* es un subgrupo de *S. enteritidis* y afecta a una gran variedad de animales y al humano (Bourdon, 1985 y Salyers, 1994).

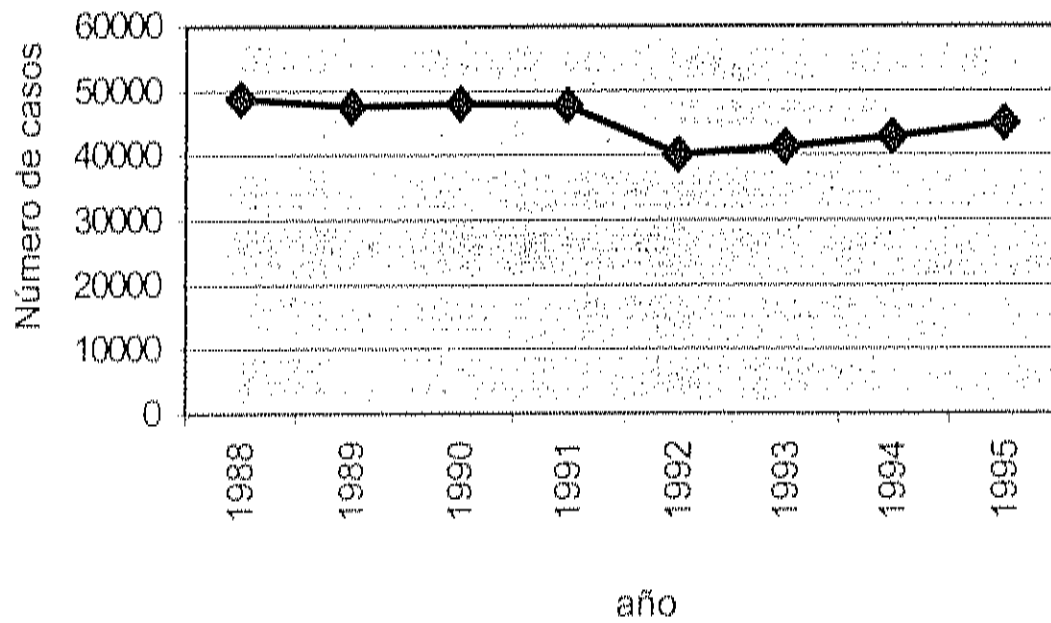
En general, *Salmonella* spp. se considera microorganismo patógeno en algún grado, por causar la enfermedad denominada salmonelosis o gastroenteritis, la cual ha ido aumentando (Figura 9) (Tortora *et al*, 1995). Las infecciones en humanos y animales inducen la enfermedad, el microorganismo penetra por las células epiteliales de las vellosidades del intestino delgado, seguido de la multiplicación dentro del intestino y su subsecuente lisis con la

salida de una potente endotoxina lipopolisacárida, que forma parte de la membrana de la célula y es principalmente responsable de los síntomas clínicos (Garbutt, 1997; Hayes, 1997). En los seres humanos, el periodo de incubación varía considerablemente, siendo usualmente entre 12 y 36 horas. Los principales síntomas son náuseas, dolor abdominal, somnolencia, diarrea y fiebre moderada; también puede presentarse deshidratación y sed excesiva. Los microorganismos pueden invadir el torrente sanguíneo y causar septicemia como caso más extremo, el paciente puede entrar en estado de coma (Hayes, 1997; Bitton, 1994) y puede ser fatal si no es tratada adecuadamente con antibióticos (Bitton, 1994).

El pH óptimo de crecimiento de *Salmonella* spp. es generalmente entre 6.5 y 7.5, aunque los organismos proliferan en este rango, también son capaces de crecer rápidamente en medios ácidos, el pH mínimo al cual *Salmonella* es capaz de iniciar y sostener el crecimiento, no está bien definido y variará dependiendo del serotipo, la temperatura de incubación y la naturaleza y composición del medio (Chee, 1970). *Salmonella* spp. es fácil de eliminar a concentraciones bajas de cloro libre en agua (Wei, 1995).

Los casos de *Salmonella* spp. son reportados con mayor frecuencia como epidemia de gastroenteritis en Estados Unidos con alimentos de origen animal como pollo u otros productos cárnicos. Las frutas y hortalizas frescas están implicados con menor frecuencia, aún que esta bacteria ha sido aislada de distintos productos frescos (Zhuang y Beuchat 1995; Golden, 1992).

Figura 7. Casos reportados de salmonelosis en Estados Unidos



Summary of Notifiable Diseases US MMWR 44(53), 1996

En Estados Unidos, se presentaron cuatro brotes de salmonelosis, incluyendo de 100 a 400 casos confirmados cada una, que fueron atribuidos a consumo de melón en 1990 con *S. chester* y en 1991 con *S. poona* y en tomates con *S. javiana* en 1990 y *S. montevideo* en 1993; esta última, ocurrió en Illinois, Minnesota y Wisconsin, aunque *S. montevideo* no fue aislada de tomates, la información epidemiológica demostró que los tomates frescos fueron la fuente de contaminación, ya que estos frutos se cortaron y se sumergieron por un periodo de tiempo corto antes del empaque dentro de una tina de lavado con agua clorada que contenía de 40 a 60 ppm, se observó que *S. montevideo* pudo haber sobrevivido en las partículas presentes en el agua de la tina (Wei, 1995).

En el año de 1974, en Estados Unidos, se reportó una epidemia de 296 casos confirmados con *S. typhimurium* por consumir sidra de manzana contaminada (D'Aoust, 1994); así también, se registraron cuatro tipos de salmonelosis en los que cada uno se incluyeron de 100 a 400 casos confirmados desde 1990 cuando se reportó el consumo de melones como responsable de la epidemia con *S. chester* y en 1991 con *S. poona*, así como en tomates con *S. javiana* en 1990 y *S. montevideo* en 1993 (Wei, 1995). *Salmonella* spp. figura prominentemente como una de las principales causas de diarrea en humanos, donde la tasa de incidencia durante la última década ha variado de 17.4 a 187 casos por 100, 000 habitantes, en los que se han identificado *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. newport* y *S. dublin* (D'Aoust, 1994). *Salmonella typhimurium* tipo (DY) 104 (R-tipo ACSSuT) es

resistente a la ampicilina, cloramfenicol, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclina. Algunas cepas exhiben resistencia a trimetropina y fluoroquinolonas. De los serotipos de *Salmonella*, el segundo reportado con más frecuencia como causa de infecciones en humanos en el año de 1995, en Estados Unidos fue *Salmonella typhimurium* (Jung, 1999).

S. enteritidis, *S. infantis* y *S. typhimurium* fueron reportadas como capaces de crecer en tomate cherry picados con un pH del fruto de 3.99 a 4.37, a 22 y 30 °C; el crecimiento límite de pH fue demostrado (Asplund, 1991).

Entre otros estudios, se evaluaron tomates verde maduros que se sumergieron en 3 litros de solución buffer de fosfato de potasio 0.1 M y pH 7 que contenía 30 ml de TSB con *S. montevideo*, se agitó por 2 minutos, los tomates se dejaron secar al aire por 5 horas y se almacenaron por 18 horas a 25 °C, se seleccionaron grupos de 6 tomates que fueron sumergidos en 1 litro de solución acuosa en concentraciones de 0, 60, 110, 210 y 320 ppm de cloro libre, se agitaron por 2 min, posteriormente se analizaron 3 tomates para evaluar en superficie y 3 para el centro, donde se evaluó la efectividad del cloro en la superficie y centro del fruto, demostrándose una reducción significativa al sumergir por 2 min dentro de las soluciones que contenían 60 y 110 ppm de cloro; sin embargo, en el tratamiento con la solución que contenía 320 ppm de cloro no se obtuvo una completa inactivación. (Zhuang y Beuchat, 1995).

En otro estudio se inoculó *S. typhimurium*, *S. enteritidis* y *S. infantis* en 20 gr de tomate fresco regional cortado en cuadros por 6, 24 y 48 horas a 7, 22 y 30 °C, posteriormente llevó a cabo lavados con 180 ml de solución salina dentro de

una bolsa de plástico por 30 seg. y finalmente confirmó la presencia de *S. typhimurium* con pruebas bioquímicas, con el objetivo de conocer el crecimiento de las bacterias inicialmente mencionadas en tomate fresco en condiciones ambientales normales (Asplund, 1991).

Se hicieron estudios para determinar la sobrevivencia de *S. montevideo* G4639 sobre y dentro de tomate en almacenamiento y la eficiencia de tratamiento con cloro para inactivar al patógeno. En las superficies de tomates verde-maduro inoculados a 10, 20 y 30 °C, la población del patógeno no cambió significativamente en tomates almacenados a 10 °C en un periodo de 18 días; sin embargo, el incremento significativo de la población de *S. montevideo* ocurrió en 7 días y un día cuando los tomates fueron almacenados a 20 y 30 °C, respectivamente. Entre 7 y 9 días el número de *S. montevideo* detectado en tomates almacenados a 20 °C decreció y permaneció en niveles que no fueron significativamente diferentes de aquéllos detectados durante los primeros 4 días. A 30 °C, la población fue significativamente más alta de un día y hasta el día 18, comparado con la población inicial (día 0). Una comparación del efecto de la temperatura en el número de *S. montevideo* detectada en tomates y en cualquier tiempo de almacenamiento reveló significativamente que la población más alta ocurrió entre 1 y 7 días y a los 18 días en tomates almacenados a 30 días comparados con la población de tomates almacenados a 10 y 20 °C. También se demostró el efecto del diferencial de temperatura con tomates a 25 °C inoculados con *S. montevideo* a tres diferentes temperaturas (10, 25 y 37 °C) con almacenamiento posterior a 10 °C. Los tomates succionaron agua

contaminada, la infiltración se asoció por el diferencial negativo de temperatura entre el agua y los tomates, cuando la temperatura del agua fue menor que la temperatura del tomate (Zhuang y Beuchat, 1995)

Tomates verde maduros fueron cortados a una profundidad de 1 mm, en 8 áreas separadas con una aguja recta, donde se colocaron alicuotas de 25 μ l de *S. montevideo* a 4.76, 5.76 y 8.76 \log_{10} UFC/ml en agua destilada, los tomates se almacenaron a 25 °C por 18 horas, posteriormente las áreas inoculadas se removieron y se homogeneizaron con 9 volúmenes de solución bufer para analizarlas. Se colocaron discos de papel filtro de 0.64 cm de diámetro sobre la superficie de tomates, los filtros previamente se sumergieron en solución de *S. montevideo* en TSB a 9.06 \log_{10} UFC/ml y en agua destilada a 9.48 \log_{10} UFC/ml los filtros se colocaron en 8 áreas premarcadas de cada tomate, se dejaron secar los discos a temperatura ambiente por 2 horas para después removerse, los tomates se almacenaron a 20 y 25 °C por 1, 2, 3, 5 y 7 días, las áreas de cada tomate se lavaron con 9 volúmenes de solución bufer, finalmente se procedió a analizar. 25 μ l de solución que contenía *S. montevideo* en 9.06 \log_{10} (TSB) y 9.48 \log_{10} (agua) se inocularon en los pedúnculos de los tomates, para almacenarse a 20 y 25 °C en 0, 1, 2, 3, 5 y 7 días; 4 tomates fueron removidos de cada grupo y se extrajeron las áreas de los pedúnculos de 2 tomates para mezclarse con 19 volúmenes de solución buffer y homogeneizarse, finalmente se analizó. 8 círculos fueron marcados sobre tomate maduro, sobre los cuales se colocaron suspensiones bacterianas en 25

μl a 4.45, 5.47 y 9.71 \log_{10} UFC/ml en agua destilada y 4.85 \log_{10} UFC/ml en TSB, se almacenaron por 20 horas a 25 °C para permitir que la solución se secase, los tomates se sumergieron en agua de la llave y agua clorada en 100 ppm (pH = 8.56) por 30 seg, 1 min y 2 min, las áreas marcadas de 3-4 tomates fueron removidas y pesadas, se homogeneizaron en 9 volúmenes de solución buffer para proceder a analizar. Asimismo, alícuotas de 25 μl de *S. montevideo* en agua destilada con 4.43, 5.59 y 7.71 \log_{10} UFC/ml se agregaron a pedúnculos y 5.64 \log_{10} UFC/ml grietas, las áreas de 2 tomates de cada grupo fueron removidas y pesadas para homogeneizarse en 19 volúmenes de solución buffer y analizarse. El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento y sobrevivencia de *S. montevideo* en tomates y su desinfección con agua clorada. Se realizó una simulación de sobrevivencia de células bacterianas en un empaque de tomate. Componentes de TSB (caldo nutritivo utilizado para crecimiento de *Salmonella* spp. en laboratorio) se aplicó a perlas de vidrio, y se inoculó *Salmonella montevideo* y las bacterias fueron difíciles de inactivar, por lo que se piensa que los componentes de TSB podrían formar una película sobre las perlas de vidrio y las células bacterianas y proteger contra el efecto bactericida del cloro acuoso. Estos resultados claramente implican que las células de esta bacteria podrían adsorber y sobrevivir en partículas presentes en un tanque de lavado de un empaque de tomate. El uso de soluciones de cloro acuoso a concentraciones bajas pudieran fracasar para eliminar adecuadamente todas las bacterias presentes en partículas,

especialmente cuando estas presentes en residuos orgánicos, determinando que bacterias en partículas de materia orgánica o sobre superficies de tomate fueron difíciles de inactivar (Wei *et al*, 1995).

Bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus que atacan a bacterias. Los virus no pertenecen a los procariotes ni a los eucariotes, ellos no llevan a cabo funciones catabólicas o anabólicas; su replicación ocurre dentro de una célula hospedante. Las células infectadas pueden ser animal, vegetal, bacteria, hongo o alga (Jawetz, 1996).

El proceso de infección depende de la dosis infectiva mínima (MID) y de la susceptibilidad del hospedante, la cual incluye factores del hospedante (por ejemplo inmunidad específica nivel socioeconómico, dieta, condiciones higiénicas, temperatura, humedad, etc.). Aunque el MID para virus es controversial, este es en general relativamente bajo comparado con bacterias patógenas (Bilton, 1996), (Cuadro 5).

Cuadro 6. Dosis mínima infectiva de algunos organismos patógenos

Organismo	Dosis mínima infectiva
<i>Salmonella spp.</i>	10^4 - 10^7 UFC
<i>Shigella spp.</i>	10^1 - 10^2 UFC
<i>Escherichia coli</i>	10^6 - 10^9 UFC
<i>Vibrio cólera</i>	10^3 UFC
<i>Giardia lamblia</i>	10^1 - 10^2 quistes
<i>Cryptosporidium</i>	10^1 quistes
<i>Entamoeba coli</i>	10^1 quistes
<i>Ascaris</i>	1-10 huevecillos
Virus de hepatitis A	1-10 UFP

Bitton, 1994

Existen más de 140 virus entéricos identificados de heces humanas, los más importantes son los virus de la Hepatitis A y E, Calicivirus (como el virus Norwalk), Rotavirus y Astrovirus (Leclerc, 2000). En investigaciones epidemiológicas se ha demostrado la aparición de enfermedades virales por la transmisión de aguas residuales y consumo por alimentos, tales como Hepatitis A y gastroenteritis (Bitton, 1994).

La infección de hepatitis A es causada por el virus HAV, un enterovirus de 27 nm que contiene RNA, tipo 72, perteneciente a la familia picornavirus (Cuadro 6), aunque se clasificó de manera provisional, los nucleótidos y secuencias de aminoácidos son diferentes (Tay, 1998; Jawetz, 1996); el tiempo de incubación es relativamente corto (2-6 semanas), transmitido por la ruta fecal – oral, ya sea por contacto directo de persona a persona o por consumo a través de agua o de alimentos. La hepatitis A está distribuida en todo el mundo y la prevalencia de los anticuerpos HAV es mayor en los grupos socioeconómicos más bajos y se incrementa con la edad de los individuos infectados. La transmisión por contacto directo ha sido documentada principalmente en guarderías (en infantes que usan pañales), instituciones psiquiátricas y en campos militares; sus síntomas son ictericia, fatiga, pérdida de apetito, ligero grado de fiebre y orina de color oscuro; la prevención puede llevarse a cabo lavándose las manos después de ir al baño, bañarse en caso de contacto con personas infectadas, llevar a cabo práctica higiénicas o vacunarse con la vacuna Havrix (Jawetz, 1996).

Cuadro 7. Características del grupo Picornavirus

Grupo	Picornavirus
Simetría del cápside	Cúbico
Virión	Sin cubierta
Ensamble del cápside	Citoplasma
Acido nucleico	ARN
Diámetro del virión	20-30 nm

Jawetz, 1996

Cuadro 8. Virus transmitidos por la ruta fecal-oral

Virus	Enfermedad
HAV	Hepatitis A
Polio	Poliomielitis
Herpesvirus	Herpes
HEV	Hepatitis E
Norwalk	Gastroenteritis
Reovirus	Rotavirus

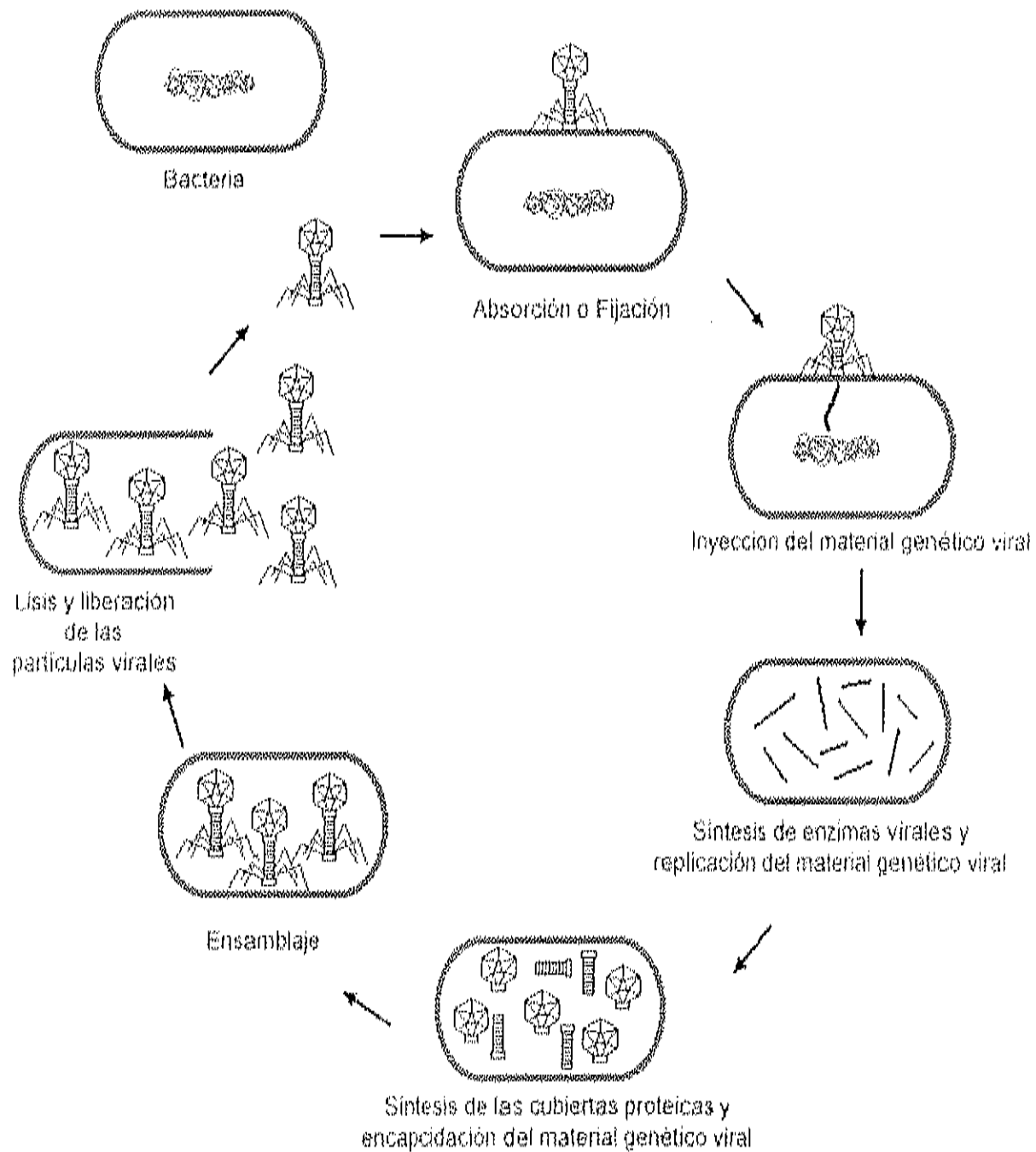
Jawetz, 1996

De acuerdo a estudios llevados a cabo, se ha mostrado que muchos virus pueden sobrevivir en productos frescos por tiempo suficiente para infectar a los consumidores, ya que se ha inoculado rotavirus en lechuga fresca, rábanos y zanahorias para después determinar su sobrevivencia en almacenamiento; este virus, el cual causa diarrea, puede sobrevivir en hortalizas de 5 a 25 días a 5 °C. No obstante, el virus sobrevivió por más tiempo en lechuga y menos en zanahorias (Shewfelt, 1993).

Las condiciones de detección de bacteriófagos son mucho más sencillas y baratas que cualquier método de detección de virus entéricos, y por sus características similares con los virus entéricos, se han utilizado como indicadores de virus entéricos (Leclerc, 2000; Bitton, 1994). A inicios de 1914, el Servicio de Salud Pública de Estados Unidos (USPHS) estableció al grupo coliforme como un indicador de contaminación fecal en agua para beber. Más tarde, varios microorganismos han sido usados como indicadores de contaminación fecal, la eficiencia en plantas de tratamiento de agua y aguas residuales y la deterioración y postcontaminación de agua en sistemas de contaminación (Bitton, 1994). Los bacteriófagos o fagos fueron descubiertos y descritos en dos ocasiones, primero en 1915 por el inglés patólogo Frederick William Twort y después en 1917 por el canadiense bacteriólogo Félix Hubert d'Hérelle. Los fagos constituyen el grupo más grande de los virus (Laval, 1992), tienen estructura compleja y algunos de ellos (por ejemplo el virus de la influenza o herpes) tienen una envoltura que está compuesta por lipoproteínas o

lípidos, han sido utilizados como modelos para elucidar las fases que involucran la replicación de los virus, como se muestra en la figura 8.

Figura 8. Replicación de bacteriófagos



A continuación se muestran los pasos a seguir para la replicación de virus:

1. Adsorción. Para que se infecte las células hospedantes, deben adherirse los receptores localizados en la superficie de la célula. Los virus animales adsorben los componentes de la superficie de la célula hospedante. Los receptores pueden ser polisacáridos, proteínas o lipoproteínas.
2. Entrada. Este paso incluye la entrada de los virus o su ácido nucleico dentro de la célula hospedante. Los bacteriófagos "inyectan" su ácido nucleico dentro de la célula hospedante.
3. Eclipse. Durante este paso, el virus está "sin cubierta" (el cápside está fuera) y el ácido nucleico es liberado.
4. Multiplicación. Este paso incluye la replicación del ácido nucleico viral.
5. Maduración. La cubierta proteica es sintetizada y combinada con el ácido nucleico para formar un nucleocápsido.
6. Salida de los virus maduros. Los virus se liberan generalmente como resultado de la ruptura de la membrana de la célula hospedante (Bitton, 1994).

Un fago puede completar su ciclo lítico en 25 a 45 minutos, produciendo cientos de fagos nuevos (Bahret, 1987).

Los bacteriófagos tienen las características que incluyen especificidad, ya que ellos se presentan exclusivamente en heces de humanos y aguas residuales, no se multiplican en el medio ambiente, están presentes en

cantidades mayores que los virus entéricos, su detección es fácil de realizar por métodos simples y baratos (Leclerc, 2000).

Turbidez

La turbidez es la dificultad del agua para transmitir la luz debido a materiales insolubles en suspensión coloidales o muy finos, que se presentan principalmente en aguas superficiales, son difíciles de decantar y filtrar, y pueden dar lugar a la formación de depósitos en las conducciones de agua o equipos de proceso, además interfieren con la mayoría de procesos relacionados con el agua. La medición se hace por comparación con la turbidez inducida por diversas sustancias. Existen diferentes tipos de turbidímetros modernos con valores numéricos prácticamente idénticos. El aparato se puede calibrar mediante suspensiones de polímero de formacina, con lo cual se deriva a una escala de unidades de formacina. En el nefelómetro se mide la intensidad de luz difractada al incidir un rayo luminoso sobre las partículas en suspensión y recogida sobre una célula fotoeléctrica. La unidad nefelométrica y la unidad de formacina se pueden intercambiar a efectos prácticos (Rigola, 1989).

Los componentes químicos que interfieren con la desinfección son componentes inorgánicos y orgánicos nitrogenados, hierro, manganeso y sulfuro de hidrógeno; compuestos orgánicos disueltos también tienen efecto en la demanda de cloro y su presencia trae como consecuencia reducción en la desinfección.

La turbidez en el agua está constituida por materia orgánica e inorgánica (arena, arcilla y óxido de hierro), así como también células microbianas; se mide determinando la dispersión de la luz por partículas presentes en el agua, interfiere con la detección de coliformes en el agua y puede reducir la eficiencia de desinfección del cloro y otros desinfectantes. En agua para beber se permite una turbidez de una unidad nefelométrica (UNT). Es necesario que la turbidez sea removida debido a que los microorganismos asociados con partículas son más resistentes a la desinfección que los microorganismos suspendidos libremente. El carbono orgánico total asociado con la turbidez tiene efecto en la demanda de cloro e interfiere con la resistencia del cloro residual en el agua. Los microorganismos asociados con materia fecal, residuos de células y sólidos de aguas residuales son también protegidos de la desinfección, esta información es particularmente muy importante para aquellas empresas que sólo utilizan el proceso de cloración en el agua. También se ha demostrado que el efecto protector de las partículas en el agua y agua de desecho depende de la naturaleza y tamaño de las partículas, de aquí que células asociadas con poliovirus es protegida de la inactivación del cloro, mientras que la bentonita y el fosfato de aluminio no ofrecen tal protección a los virus. Un estudio de virus asociado con sólidos bajo condiciones de campo demostraron que son más resistentes a la cloración que los virus "libres". Reduciendo la turbidez a menos de 0.1 UNT podría ser una medida de protección para contrarrestar el efecto de protección de las partículas de la materia durante la desinfección (Bitton, 1994).

En un estudio donde se inoculó alfalfa con cinco serotipos de *Salmonella* spp.: *S. agona*, *S. enteritis*, *S. hartford*, *S. poona* y *S. montevideo*, la mezcla de las especies de *Salmonella* fueron sumergidas en 200, 500 y 2000 ppm de cloro en solución por 2 minutos. El patógeno fue reducido alrededor de 3.4 log₁₀ UFC/g después del tratamiento con 500 ppm y para un nivel indetectable (< 1 UFC/g) después del tratamiento con 2000 ppm de cloro. El tratamiento con cloro de 2000 ppm en cubos de melón inoculados con los mismos serotipos de *Salmonella* spp. resultaron en menos de un 90 % de reducción. En células viables, el nivel alto de materia orgánica en el jugo liberado de los tejidos de melón en cubos aparentemente neutralizó al cloro antes que su letalidad pudiera ser manifestada. Los componentes de tejidos de frutas y hortalizas neutralizan el cloro, transformándolo como inactivo contra microorganismos. La inaccesibilidad del ácido hipocloroso para células microbianas en rayas, grietas, cortadas o aberturas naturales en la cutícula indudablemente también contribuye en conjunto a la falta de efectividad. La parte hidrofóbica natural de la cutícula cerosa en la superficie de frutas y hortalizas protege a las células microbianas de la exposición de cloro, y seguramente otros compuestos químicos usados como desinfectantes que no penetran o disuelven estas ceras. Los agentes activos en la superficie tales como detergentes o etanol disminuyen la hidrofobicidad de las cutículas de frutas y hortalizas, así como las superficies de hojas comestibles, tallos y flores, pero también tienden a causar deterioración en calidad sensorial. Los desinfectantes que contienen un solvente que podría remover la fase cerosa cuticular y con esta los

contaminantes de la superficie, sin adversamente afectar las características sensoriales podrían conservar el potencial más grande en reducir poblaciones microbianas en la superficie de frutas y hortalizas crudas; tales desinfectantes pueden ser limitados en el uso de frutas y hortalizas que son destinados para jugos o productos en trozos, o en frutas enteras, hortalizas o partes de plantas que son destinadas para consumo inmediato, desde la remoción de material cuticular adelantará la deterioración de la calidad sensorial. La aplicación de tales desinfectantes desde el punto de uso disminuye la importancia esta desventaja (Beuchat, 1998).

Se ha reportado que *Salmonella montevideo* pudo haber sobrevivido en partículas presentes en el agua clorada de 40 a 60 ppm en una tina de lavado de un empaque de tomates frescos, lo que ocasionó un brote de salmonelosis (Wei *et al.*, 1995). Bitton (1994) estableció que la turbidez del agua puede reducir la eficiencia de la desinfección del cloro y de otros desinfectantes. Karch y Loftis (1998) determinaron que la turbidez alta es un riesgo potencial, ya que un virus o bacteria puede esconderse dentro de una partícula rugosa y protegerse del desinfectante.

Estudios recientes demuestran que existe un mayor número de pudriciones en la tina de lavado de tomate y del empaque final que en los otros puntos del proceso del empaque (cuadro 8), (Ojeda *et al.*, 1996). La descarga de la tina de lavado es un punto en el cual el fruto es propenso a ser infectado con el agua (Ojeda *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 1995), ya que en este punto se propicia la aparición de pequeñas heridas en la superficie por efecto de la descarga,

aunque no se asegura que la contaminación se lleve a cabo en la tina, a menos que la concentración de cloro no haya sido la necesaria para mantener la tina de lavado libre de microorganismos (Bartz y Showalter, 1981).

Por otro lado, desórdenes fisiológicos por hongos o bacterias se incrementan durante poscosecha, debido a que los patógenos son hospedados bajo la cutícula o en las lenticelas al momento de la cosecha. Esto dificulta su control poscosecha, ya que fungicidas y bactericidas convencionales son incapaces de penetrar la cutícula del fruto (Ojeda *et al*, 1996).

Cuadro 9. Porcentajes de pudriciones de tomate en distintos puntos del proceso de empaque, en almacenamiento a 0 y 10 días en 20 °C

Punto muestreado	Días a 20 °C	
	0	10
Campo	0	0
Tina de recepción	0	0
Tina de lavado	0	10
Encerado	0	0
Empaque final	0	25

Ojeda *et al.*, 1996

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudios preliminares

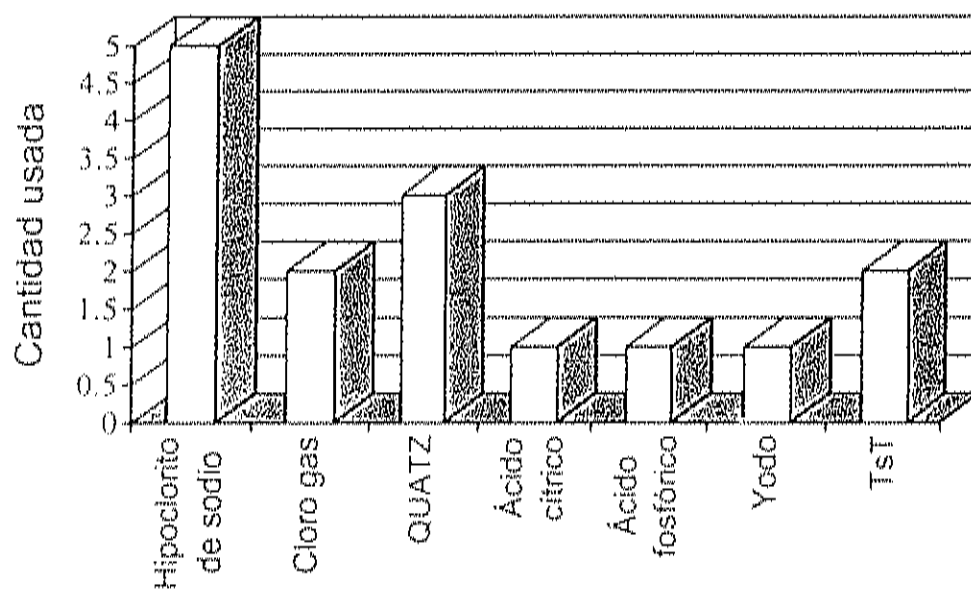
Durante los meses de enero y febrero del presente año se visitaron tres empaques de tomate del Valle de Culiacán, a los que se denominaron A, B y C; estos empaques tenían la característica de tener tina de lavado y utilizar un desinfectante clorado. Se determinó temperatura y pH al agua de las tinas, se tomaron muestras de esta agua y se trasladaron bajo condiciones apropiadas de temperatura, al laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo de la Unidad Culiacán, para analizar turbidez, cloro total y coliformes totales. La información obtenida de los tres empaques se muestra en el cuadro 9.

Cuadro 10. Resultados de las determinaciones realizadas en tres empaques del Valle de Culiacán

Determinación	Resultado
Temperatura	18 - 23 °C
PH	7-8
Turbidez	2-200 UNT
Concentración del desinfectante	75-330 ppm cloro total
Coliformes totales	0 UFC/ml

En el mes de marzo del presente año se realizó una encuesta via telefónica a 10 empaques de hortalizas frescas del valle de Culiacán, con la finalidad de investigar cual desinfectante utilizan en el agua de lavado. Se obtuvo como resultado que cinco empaques utilizan hipoclorito de sodio, tres utilizan el amonio cuaternario y dos cloro gas; de los empaques que utilizan hipoclorito de sodio, tres de cada uno de ellos añaden ácido cítrico, ácido fosfórico y yodo al agua de lavado para mantener el pH alrededor de 7 e incrementar la desinfección (Figura 9).

Figura 9. Desinfectantes usados en empaques de frutas y hortalizas del Valle de Culiacán



Desinfectantes

Los desinfectantes hipoclorito de sodio y tricloro-s-triazinetrióna fueron obtenidos de empaques agrícolas del Valle de Culiacán y el desinfectante tricloromelamine de manera comercial.

Microorganismos

Controles positivos de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* y el bacteriófago MS-2 (male somatic 2) se obtuvieron del laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de Arizona a cargo del Dr. Charles P. Gerba, en Tucson, Arizona.

Medios de cultivo

Se adquirieron de manera comercial y se prepararon de acuerdo a las fórmulas del distribuidor, como se describe a continuación:

m-Endo Agar LES (Difco, Detroit MI)

Se pesaron 51 gramos en una balanza marca Sartorius y se disolvieron en un litro de agua purificada que contenía 20 ml de etanol al 95 %, se mezclaron completamente y se calentaron con agitación constante, hasta ebullición para una disolución completa. No se necesita esterilizar. Se enfrió a 55-60 °C y se vació en cajas de petri estériles.

Agar Entérico Hecktoen (Bioxon, Estado de México)

Se pesaron 76 gramos y se suspendieron en un litro de agua destilada. Se calentó hasta hervir para obtener la solución completa. No se esteriliza en autoclave. Se enfrió a 55-60 °C y se depositó en cajas de petri estériles.

Agar de Soya de Trypticaseína en medio sólido (Bioxon, Estado de México)

Se suspendieron 40 gramos en un litro de agua destilada, se mezcló completamente, se calentó agitando hasta una disolución completa por un minuto para posteriormente esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Se dejó enfriar y se vació en cajas de petri estériles. En caso de no tener este medio de cultivo, también se puede preparar con una mezcla de medio de soya tripticaseína (TSB) y agar bacteriológico, donde se suspenden 30 gramos de TSB y 15 gramos de agar bacteriológico en un litro de agua purificada, se mezclan perfectamente y se calientan suavemente hasta una disolución completa, agitando con frecuencia, se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 minutos, se enfría y se vacía en cajas de petri estériles.

Agar de Soya de Trypticaseína en medio líquido (Bioxon, Estado de México)

Se suspendieron 30 gramos de polvo de TSB y 10 gramos de agar bacteriológico en un litro de agua purificada, se mezclaron y se calentaron hasta obtener una disolución completa, agitando con frecuencia, se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos, el medio de cultivo obtenido se enfría y se vacía en tubos de ensayo.

Caldo de soya de tripticaseína. (Bioxon, Estado de México)

Se suspendieron 30 gramos TSB en un litro de agua purificada, se mezcló perfectamente y se calentó suavemente hasta una disolución completa, agitando con frecuencia, se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

En el cuadro 10 se muestra el microorganismo correspondiente a cada medio de cultivo y su técnica.

Cuadro 11. Controles positivos de microorganismos utilizados con sus respectivos medios de cultivos y técnicas de laboratorio

Microorganismo	Medio de cultivo	Técnica
<i>E. coli</i>	m- Endo Agar Les	Extensión en placa
<i>S. typhimurium</i>	Agar entérico Heckoen	Extensión en placa
MS-2	Agar de soya tripticaseína	Doble agar

APHA, 1998

Análisis Físicoquímicos

Temperatura

Se monitoreó la temperatura, con un termómetro de mercurio, previamente calibrado, supervisando que se mantuviera entre los 18 a 23 °C, temperatura ambiente obtenida en los estudios preliminares.

PH

Al igual que en el caso de la temperatura, se monitoreó el pH, supervisando que se mantuviera alrededor de 7.5, pH promedio obtenido en los estudios preliminares; en los casos necesarios, el pH se ajustó con ácido cítrico o hidróxido de sodio 0.1 N. Se aplicó la técnica de la A.O.A.C. (1990), esto es, se midieron 50 ml de la muestra problema y se le determinó el pH con un potenciómetro Corning, modelo 430, previamente calibrado con solución buffer de 4 y 7.

Turbidez

Se llevó a cabo utilizando un equipo nefelométrico analítico, modelo 156, marca Mc Van, de acuerdo a la técnica APHA (1998), de la siguiente manera: La muestra se agitó suavemente, permitiendo que desaparezcan las burbujas de aire, se vertió la muestra dentro de la celda y se leyó directamente el valor de turbidez con un equipo nefelométrico analítico, modelo 156, marca Mc Van. El equipo se calibró previamente con agua destilada.

Cloro total

Se determinó utilizando un titulador manual marca HACH modelo CN-DT, de acuerdo a la técnica APHA (1998), como a continuación se describe:

Se seleccionó el volumen de muestra y el cartucho de titulación correspondiente de tiosulfato de sodio a la concentración de cloro esperada de acuerdo a la siguiente tabla

Rango (mg/ml Cl ₂)	Volumen (ml)	Cartucho de titulación (N Na ₂ S ₂ O ₃)	Digito multiplicador
20-80	25	0.113	0.2
50-200	10	0.113	0.5
100-400	5	0.113	1
250-1000	2	0.113	2.5
500-2 000	1	0.113	5
2 000-9 000	4	2.00	22.2
5 000-18 000	2	2.00	44.3
10 000-35 000	1	2.00	88.7
20 000-70 000	0.5	2.00	177

Se ensambló un tubo deliberador dentro del cartucho de titulación para hacer fluir el contenido del tubo al girar la perilla y dejar salir algunas gotas del titulante. Se reseteó para que el contador estuviera en cero. En un matraz erlenmeyer de capacidad de 125 ml se colocó el volumen de muestra a utilizar de acuerdo a la tabla anterior y se aforó a 50 ml con agua destilada, para

agregar una almohadilla con Oxígeno disuelto 3 en polvo. Normalmente en este paso el pH debe ser de 4 o menos.

Se utilizó el cartucho de titulación de 0.113 N y se agregó el contenido del una almohadilla de Ioduro de potasio en polvo al matraz y se mezcló suavemente, se colocó el tubo deliberador en la solución para llevar a cabo la titulación con el tiosulfato de sodio, con agitación suave del matraz hasta que la solución tornó a un color amarillo pálido, se agregó un gotero de solución indicadora de almidón y se mezcló suavemente, tornandose a un color azul obscuro, se continuó la titulación hasta que la solución cambió a incolora y se registró el número de dígitos requeridos del cartucho de titulación. El cálculo fue:

$$\text{Mg/L de cloro total (Cl}_2\text{)} = \text{Dígitos requeridos} \times \text{Dígitos multiplicador}$$

Cloro libre

Se analizó con un espectrofotómetro marca HACH modelo DR 2010, de acuerdo a la técnica APHA (1998), de la siguiente manera:

Se seleccionó el programa de Cloro: PRESS 88 ENTER, la pantalla debe mostrar Dial nm to 530, se colocó el rotor hasta que la longitud de onda quedó en 530 nm, la pantalla mostró zero sample, después mg/L de Cl₂ HR.

Se llenaron dos celdas de capacidad de 25 ml con 10 ml de muestra cada una. La muestra se utilizó inmediatamente. Se añadió el contenido de un DPD total de cloro a la muestra de una celda, se tapó para disolverla y se observó una coloración rosa, se esperó un minuto y añadió agua desionizada a cada celda hasta la marca de 25 ml, para tapar y agitar cada celda. Se introdujo la

celda que no contenía al reactivo DPD y se cerró la compuerta de luz para presionar ZERO, apareció en la pantalla zeroing y después mg/L de Cl₂ HR. Esto fue para la calibración del espectrofotómetro marca HACH modelo DR 2010. Posteriormente se colocó la celda con la muestra que contenía al DPD, se cerró la compuerta de luz para presionar READ, la pantalla mostró reading después dió el resultado en mg/l de Cl₂, este valor se multiplicó por las diluciones realizadas. Esta técnica es la denominada de alto rango (0 a 5.0 mg/l como Cl₂)

Purificación de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*

Se utilizaron controles positivos de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *S typhimurium* cultivadas en TSA (Pao, 1999), para ser inoculadas en 5 ml. de TSB, se incubaron por 24 horas a 37 °C, en una incubadora marca VWR. tiempo en el que se considera la fase estacionaria, posteriormente se colocó 1 ml del crecimiento bacteriano en 25 ml de TSB, se agitó en baño recirculador de agua marca Lab-line a 110 RPM por 3 horas a 37 °C y 110 RPM, el medio enriquecido se colocó en tubos de centrifuga esterilizados y estos en una centrifuga marca Beckman modelo J2-MI con rotor modelo JA-17, se centrifugó por 10 min a 4 °C y 13,800 gravedades (g), el pellet obtenido se lavó por 2 ocasiones con agua estéril agitando en un agitador vortex, marca Scientific products hasta solución homogénea y centrifugando nuevamente en las mismas condiciones, se agregó 15 ml. de solución buffer estéril, la cual se preparó disolviendo 13.6 gramos de KH₂PO₄ en agua destilada y se aforó a un litro, se

ajustó a pH de 7.2 con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N y se filtró a través de una membrana millipore de 0.2 μm . con lo que finalmente se obtuvieron las bacterias purificadas. Se utilizó la escala de McFarland para preparar una solución de alrededor de 10^9 UFC/ml (Király, 1974)

Propagación de MS-2

Se utilizó la técnica de doble agar (APHA, 1998) Se inoculó una colonia de *Escherichia coli* ATCC 25922 en 9 ml de TSB y se incubó a 37 °C por 24 horas tiempo en el cual se considera la fase estacionaria. 1 ml de este medio enriquecido se inoculó en 100 ml de TSB y se incubó a 37 °C en un baño recirculador a 37 °C con un tiempo de 3 horas y 110 RPM

Se prepararon diluciones a partir de esta fase hasta la dilución 10^{-5} . se utilizaron tubos de ensayo con 2.7 ml de solución buffer y 0.3 ml del medio de cultivo bacteriano, se aseguró de mezclar homogéneamente en vortex antes de inocular el tubo nuevo.

Tubos de ensayo conteniendo 3 ml de TSA se mantuvieron en un baño María, marca Felisa a 45 °C, a cada tubo se les adicionó un ml de *Escherichia coli* ATCC 25922 con las diferentes diluciones y 0.1 ml de MS-2 (male somatic 2), se agitó en vortex hasta disolución homogénea y se vació el contenido en cajas de petri conteniendo TSA, después de solidificar se invirtieron las cajas y se incubaron por 24 horas a 37 °C. Se agregó 6 ml de solución buffer a cada caja y se dejaron a temperatura ambiente por 2 horas para que el bacteriófago

se difundiera a través de la solución, el sobrenadante se colocó en tubos de centrifuga estériles, se centrifugó en las condiciones previamente mencionadas. 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)

Evaluación del desinfectante en casos extremos de contaminación

En un vaso de precipitado de 4 litros de capacidad se le añadió un volumen de 2 litros de agua potable estéril, se determinó la turbidez (2 NTU), se ajustó a 100 y 200 NTU con ácido húmico, tierra y sal del mar (Sigma, St. Louis, MO), según técnica establecida por la USEPA (1986), utilizando un nefelómetro analítico modelo 156 marca Mc Van, por separado se agregaron controles de las bacterias: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y el bacteriófago MS-2 como indicador de virus entéricos en una concentración de 10^8 a 10^9 UFC/ml en bacterias y UFP/ml en bacteriófagos (simulando casos extremos de contaminación). Se evaluaron los desinfectantes hipoclorito de sodio, tricloromelamine y tricloro-s-triazinetrióna, en las concentraciones de 100, 200 y 300 ppm de cloro total, se aplicó agitación con una parrilla con agitación magnética, marca Thermolyne Cimarec 2 (Dubuque, Iowa) por un tiempo de 2 min, simulando el tiempo transcurrido en una tina de lavado. Se determinó el crecimiento de los microorganismos por las técnicas de extensión en placa en las bacterias y doble agar para MS-2.

La técnica de extensión en placa (APHA, 1998), se realizó de la siguiente manera:

- Se prepararon medio de cultivo m-Endo agar LES en cajas petri esterilizadas (Payment, 1999) y agar entérico Heckoen, para *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, respectivamente.
- Se realizaron las diluciones necesarias de acuerdo a la muestra en el ensayo donde se agregaron las bacterias (10^{-1} - 10^{-6})
- Se depositó 0.1 ml de cada una de las diluciones (generalmente 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6}) en las placas de agar selectivo correspondiente
- Varillas de vidrio fueron esterilizadas para extender la mezcla homogéneamente sobre el medio de cultivo, girando la varilla de vidrio
- Las cajas petri se incubaron a 37 °C por 24 horas
- Se realizó el conteo de las bacterias y el cálculo de acuerdo a la dilución requerida

La técnica de agar-agar o doble agar se realizó de la manera siguiente:

- Se inoculó una colonia de *E. coli* ATCC 25922 en 5 ml de TSB y se incubó a 37 °C por 24 horas. Después se inoculó 1 ml de este cultivo en 100 ml de TSB y se incubó a 37 °C en un baño recirculador a 37 °C con un tiempo de 3 horas y 110 RPM.

- Se realizaron las diluciones necesarias de acuerdo a la muestra de la solución en el ensayo que contenía al bacteriófago (10^{-1} - 10^{-6}) con 2.7 ml de agua estéril más 0.3 ml de la muestra.
- Tubos de ensayo conteniendo 3 ml de TSA se mantuvieron en un baño María marca Felisa a 45 °C, a cada tubo se les adicionó un ml de *E. coli* ATCC 25922 y 0.1 ml de cada una de las diluciones (generalmente 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6}) que contenían a MS-2.
- Se homogenizó con agitación en vortex y se vació el contenido en cajas petri conteniendo TSA, después de solidificar se invirtieron las cajas y se incubaron por 24 horas a 37 °C (APHA, 1998).

La capacidad para evaluar el desinfectante se determinó de acuerdo a Geldreich (1996), manifestándose que un desinfectante es efectivo cuando se logran reducciones de 6 y 4 logaritmos para bacterias y virus, respectivamente.

Análisis estadístico

Se trabajó con un diseño de subparcelas divididas (Montgomery, 1991), definiendo como,

- bloque: microorganismo (M)
- parcela: turbidez (Tu)
- subparcela: desinfectante (Ds)
- sub-subparcela: concentración del desinfectante (Con).

El modelo matemático correspondiente es:

$$Y = \mu + Tu + M + TuM + Ds + Tu Ds + MDs + TuMDs + Con + TuCon + Mcon + TuMCon + DsCon + TuDsCon + MDsCon + TuMDsCon$$

Donde: Y = Observación

μ = Media

TuM = Error de la parcela

TuMDs = Error de la subparcela

TuMDsCon = Error de la subsubparcela

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el paquete estadístico Minitab, Versión Release 12 para Windows 1998.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

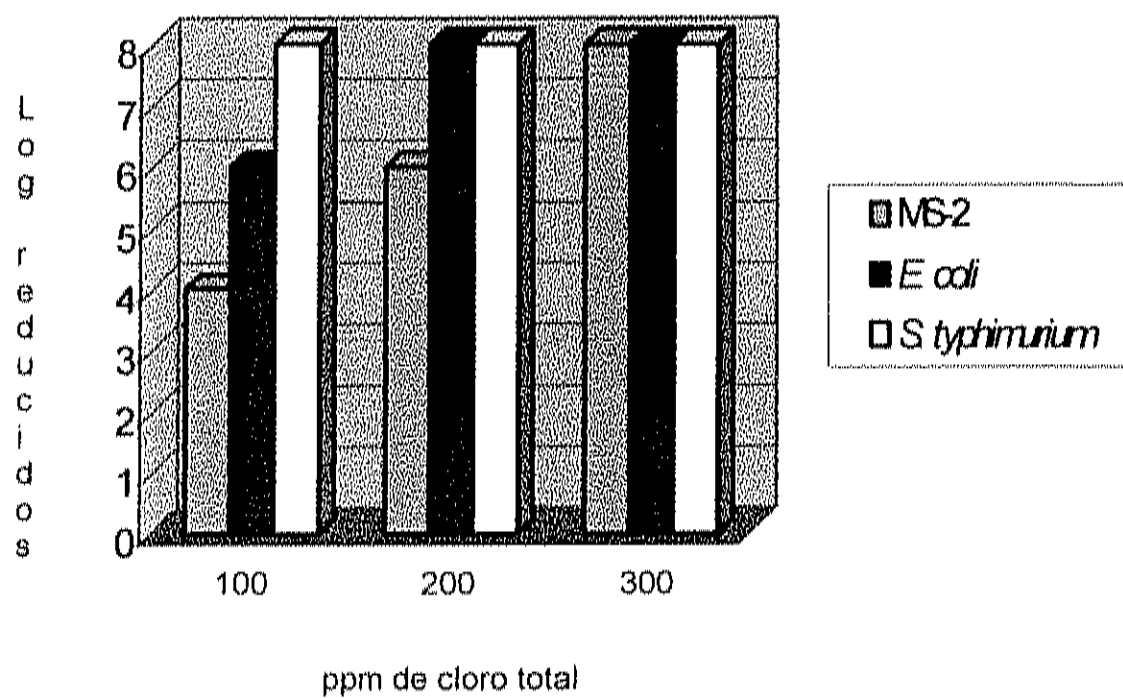
El análisis de resultados se realizó en dos etapas. Primeramente se presentan los resultados mediante técnicas estadísticamente descriptivas, gráficamente. Posteriormente, se presenta el ANOVA correspondiente a un diseño de subparcelas divididas, discutiendo efectos principales y de interacción, que resultaron significativos.

Los resultados se marcan en referencia a Geldrieck (1996), quien establece que un desinfectante es efectivo cuando se lleva a cabo una reducción de 4 y 6 logaritmos para virus y bacterias, respectivamente

Análisis Descriptivo

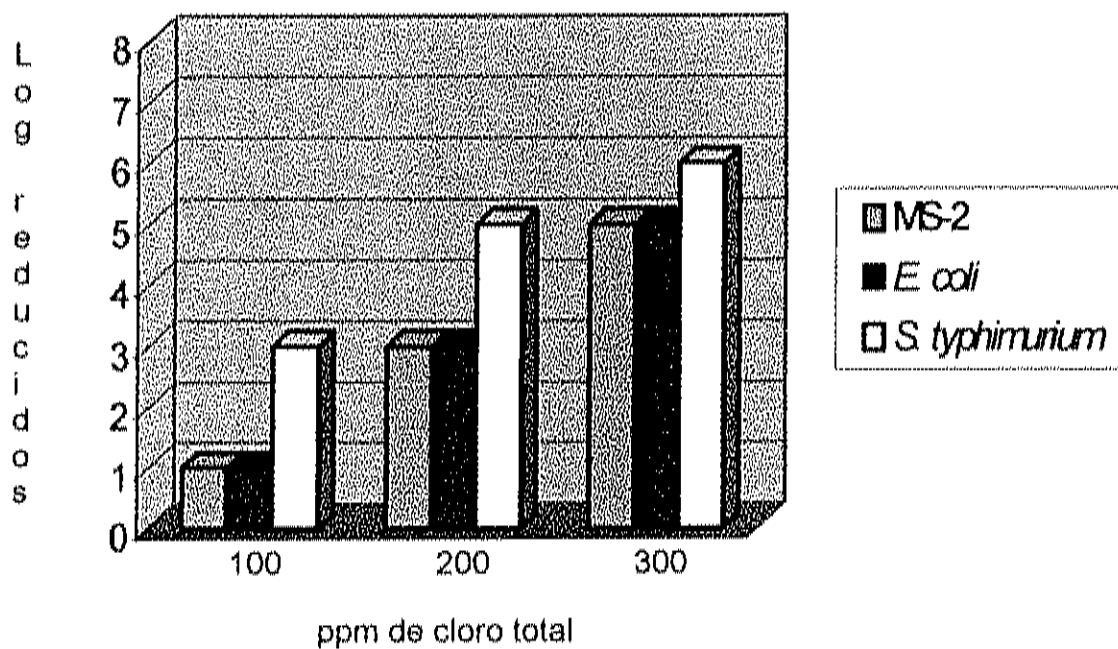
Con turbidez de 2 UNT. De acuerdo a los resultados, NaOCl fue efectivo con los tres microorganismos desde la concentración de 100 ppm de cloro total (Figura 10 a).

Figura 10 a. Reducción logaritmica aplicando NaOCl y turbidez de 2 UNT



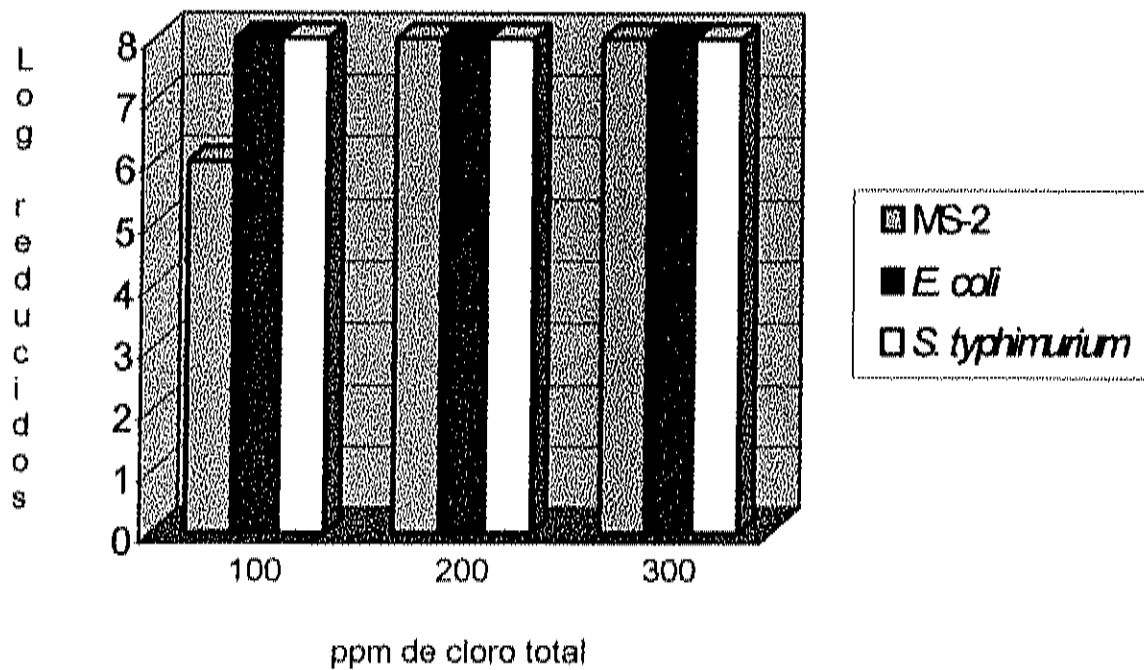
Como podemos observar TCM mostró efectividad contra MS-2 y *S. typhimurium* en la concentración de 300 ppm de cloro total (Figura 10 b).

Figura 10 b. Reducción logarítmica aplicando TCM y turbidez de 2 UNT



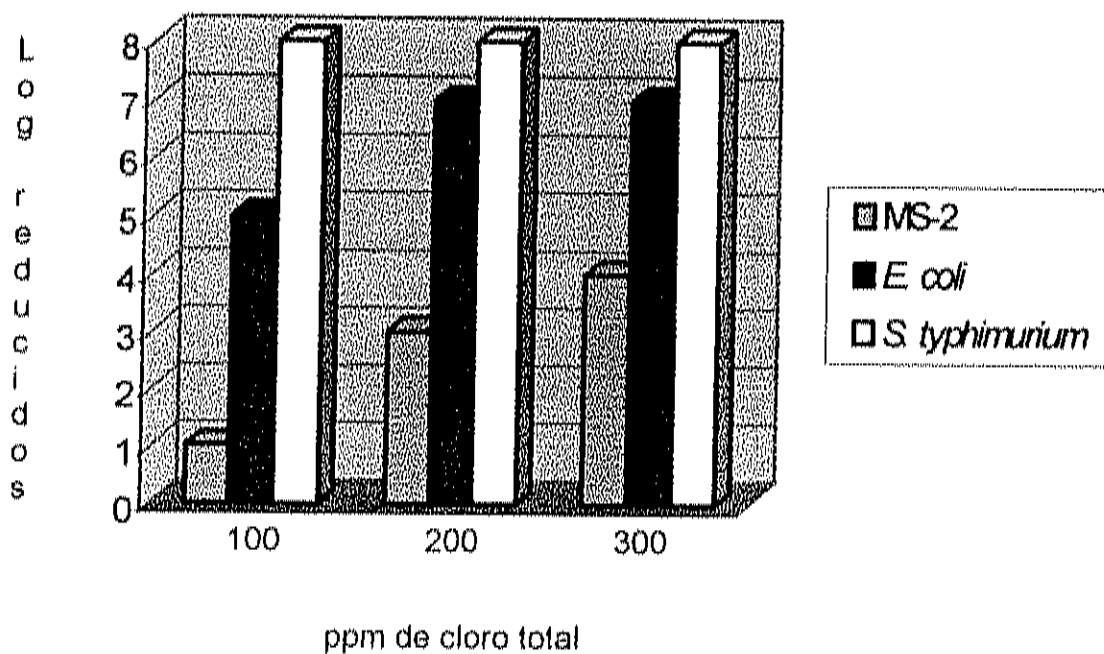
El desinfectante TsT fue efectivo con los tres microorganismos desde la concentración de 100 ppm de cloro total, rebasando los límites establecidos por Geldreich (1996) (Figura 10 c).

Figura 10 c. Reducción logarítmica aplicando TsT y turbidez de 2 UNT



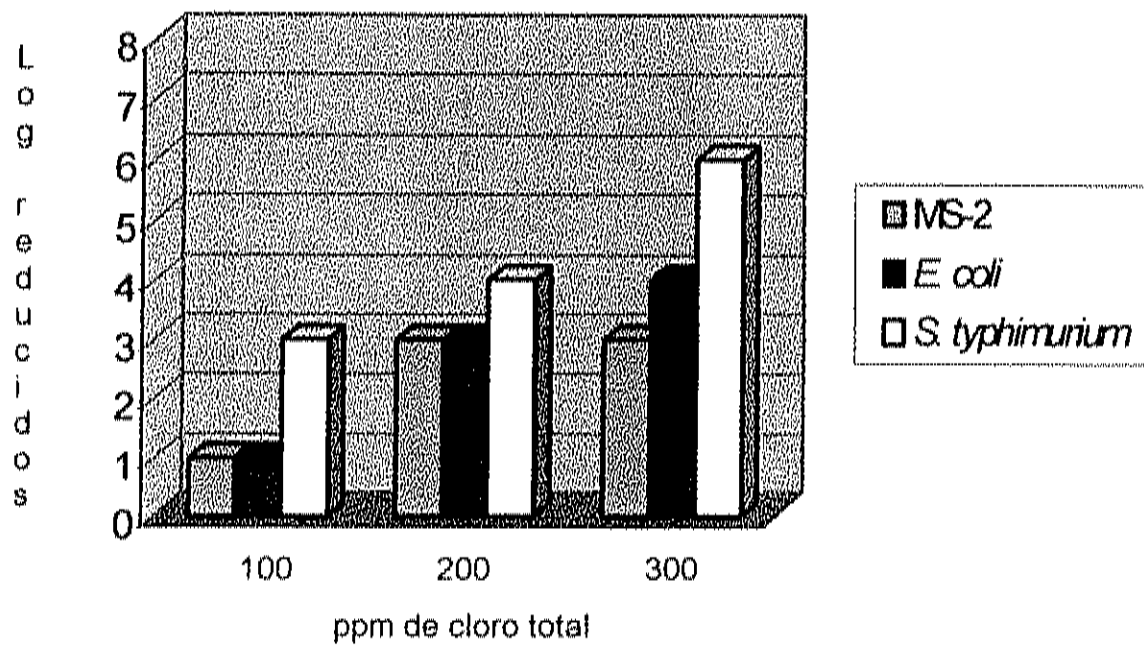
Con turbidez de 100 UNT. NaOCl fue efectivo contra MS-2 hasta la concentración de 300 ppm y contra *S. typhimurium* desde la concentración de 100 ppm (Figura 11 a).

Figura 11 a. Reducción logarítmica aplicando NaOCl y turbidez de 100 UNT



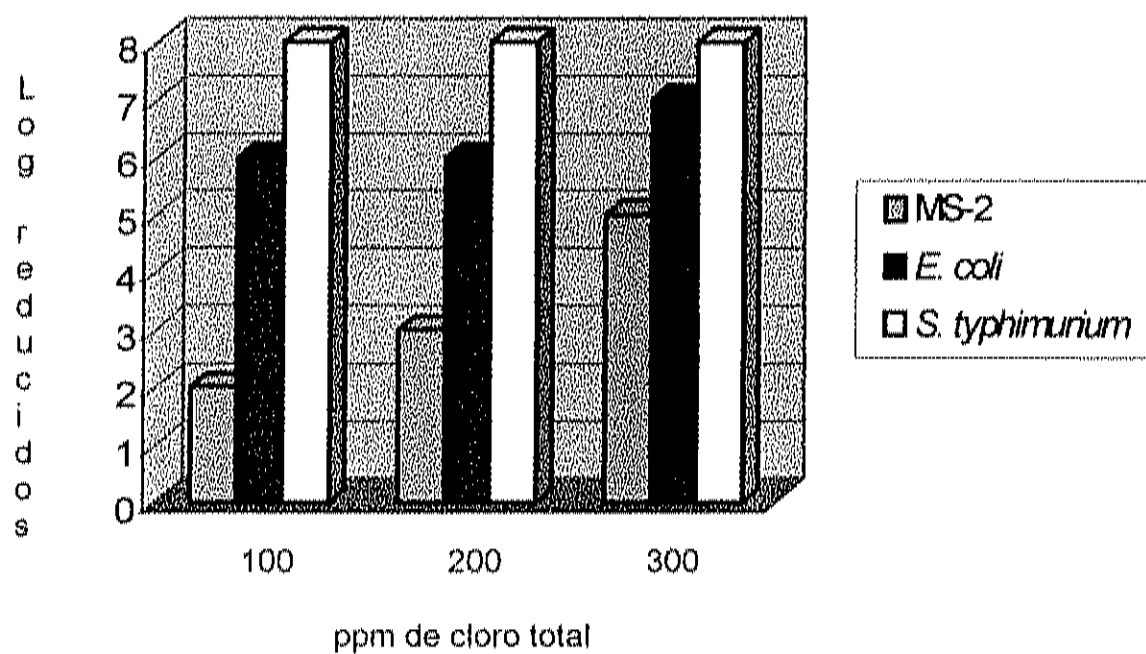
El desinfectante TCM demostró efectividad contra *S. typhimurium* en la concentración de 300 ppm de cloro total (Figura 11 b).

Figura 11 b. Reducción logarítmica aplicando TCM y turbidez de 100 UNT



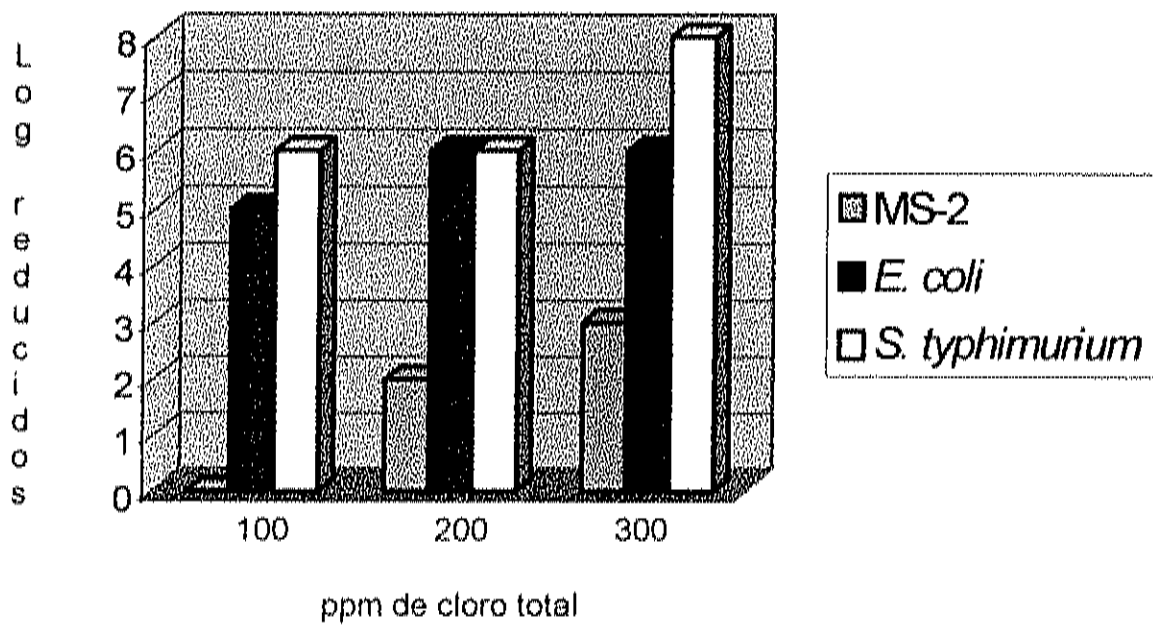
TsT fue efectivo contra MS-2 hasta la concentración de 300 ppm de cloro total; sin embargo, con ambas bacterias mostró su efectividad desde la concentración de 100 ppm (Figura 11 c).

Figura 11 c. Reducción logarítmica aplicando TsT y turbidez de 100 UNT



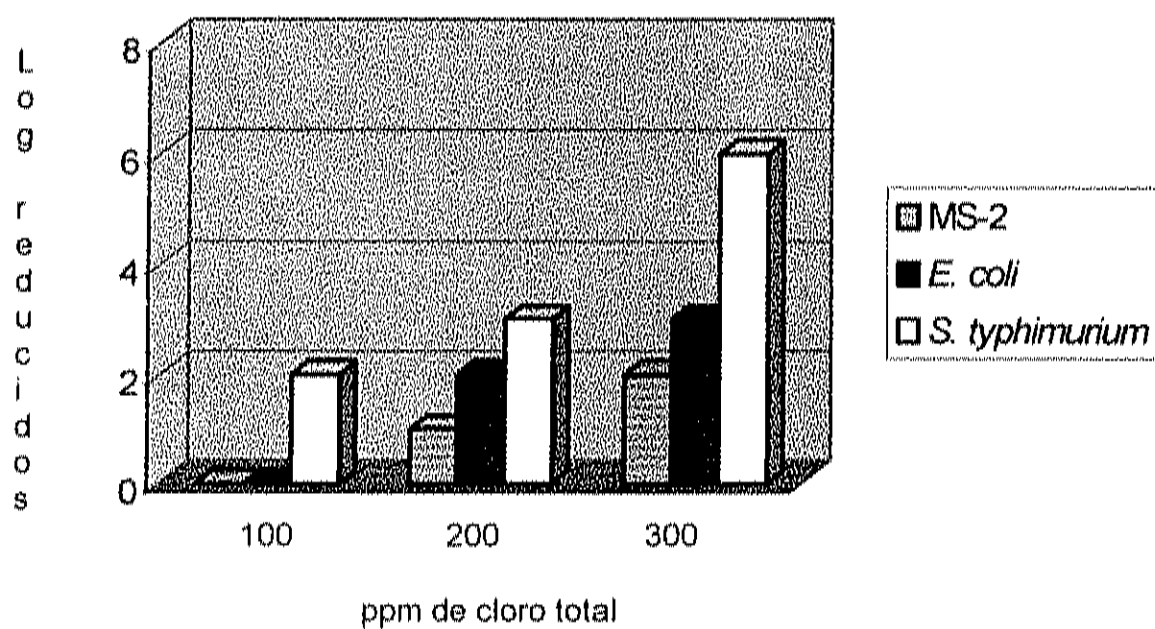
Con turbidez de 200 UNT, NaOCl presentó efectividad contra *E. coli* hasta la concentración de 200 ppm; sin embargo, fue efectivo contra *S. typhimurium* desde la concentración de 100 ppm (Figura 12 a).

Figura 12 a. Reducción logarítmica aplicando NaOCl y turbidez de 200 UNT



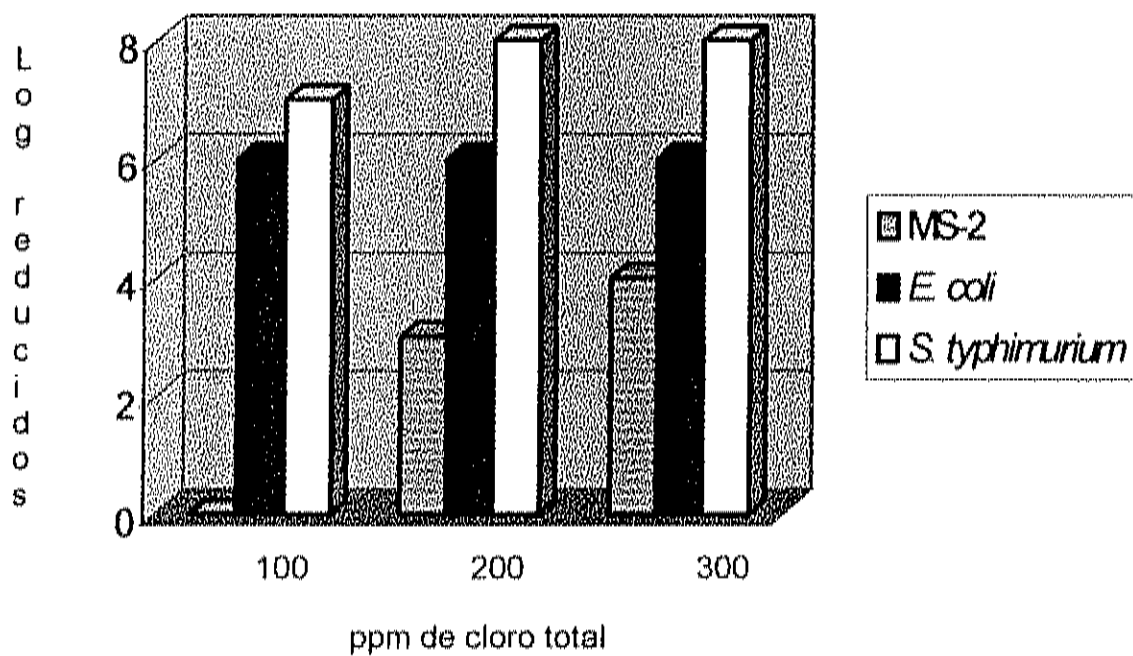
El desinfectante TCM solamente fue efectivo contra *S. typhimurium* hasta la concentración de 300 ppm de cloro total (Figura 12 b).

Figura 12 b. Reducción logarítmica aplicando TCM y turbidez de 200 UNT



TsT demostró ser efectivo contra MS-2 hasta la concentración de 300 ppm y contra las bacterias *E. coli* y *S. typhimurium* desde la concentración de 100 ppm (Figura 12 c).

Figura 12 c. Reducción logarítmica aplicando TsT y turbidez de 200 UNT



Análisis de varianza

Efectos principales. La tabla ANOVA (Cuadro 12) muestra que los microorganismos, turbidez, desinfectantes y concentración de los desinfectantes resultaron tratamientos significativos ($p < 0.05$).

De acuerdo a la gráfica de efectos principales el orden de resistencia de los microorganismos fue MS-2 > *E. coli* > *S. typhimurium* (Figura 13 a). Con respecto a la turbidez, el orden de reducción logarítmica fue 2 UNT > 100 UNT > 200 UNT (Figura 13 b). En cuanto a los desinfectantes observamos que el orden de efectividad de los desinfectantes fue TsT > NaOCl > TCM (Figura 13 c). En el caso de los resultados de las concentraciones de los desinfectantes, el orden de efectividad de las concentraciones en ppm de cloro total fue de 300 > 200 > 100 (Figura 13 d).

Las comparaciones de medias se realizaron mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$), encontrándose los siguientes resultados: las tres concentraciones de cloro total, los tres microorganismos y las tres turbideces presentan diferencias significativas ($\alpha = 0.05$).

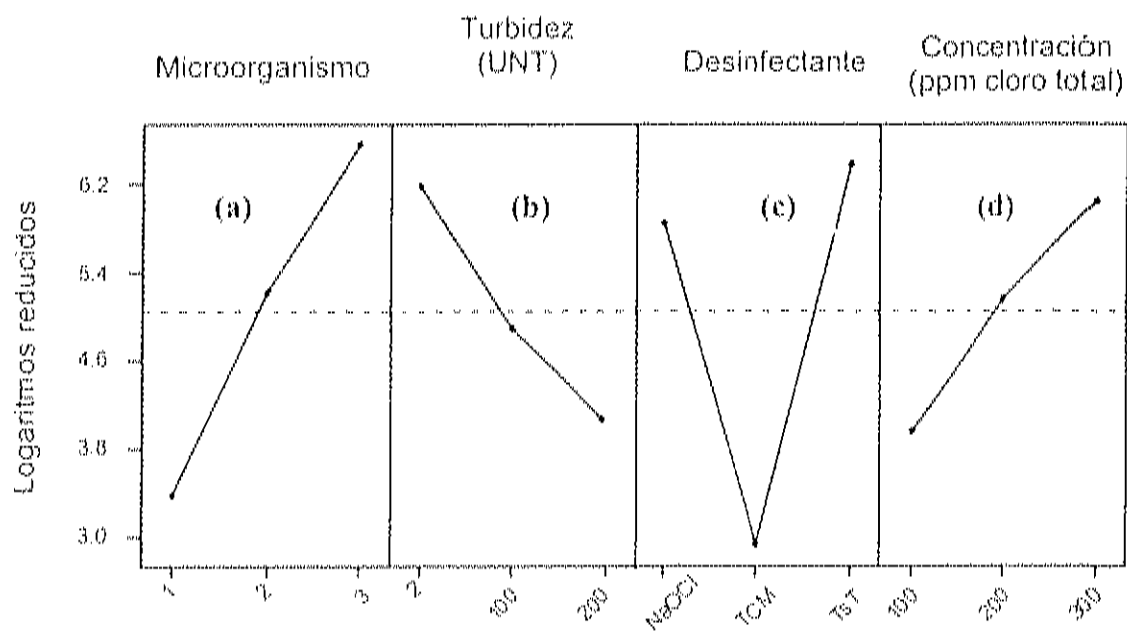
Entre los desinfectantes, NaOCl no presentó diferencia significativa con TsT, ($p = 0.2096$), pero TCM sí resultó significativo con NaOCl y TsT ($p = 0$), por lo que podemos establecer que NaOCl y TsT son desinfectantes efectivos.

Cuadro 12. ANOVA de logaritmos reducidos, usando suma de cuadrados ajustados para pruebas

Fuente	GL	SC	CM	F	p
Microorganismo	2	141.555	70.777	7.30	0.026
Turbidez	2	63.185	31.593	4.87	0.085
Tu*M	4	25.926	6.482	4.22	0.029
Desinfectante	2	178.963	89.482	21.57	0.007
Tu*Ds	4	5.185	1.296	1.02	0.451
M*Ds	4	16.593	4.148	1.77	0.193
Tu*M*Ds	8	10.148	1.269	6.52	0.001
Concentración	2	64.963	32.482	17.37	0.011
Tu*Con	4	0.741	0.185	0.40	0.804
M*Con	4	7.482	1.870	1.22	0.362
Tu*M*Con	8	3.704	0.463	2.38	0.066
Ds*Con	4	8.519	2.130	1.68	0.247
Tu*Ds*Con	8	2.667	0.333	1.71	0.171
M*Ds*Con	8	10.148	1.269	6.52	0.001
Error	16	3.1111	0.194		
Total	80	542.8889			

GL= Grados de Libertad, SC = Suma de Cuadrados, CM = Cuadrados de medias, F = Valor F y p = Valor p

Figura 13. Efectos principales de microorganismo, turbidez, desinfectante y concentración del desinfectante



¹MS-2 ²*E. coli* ³*S. typhimurium*

Efectos de las interacciones. En cuanto a los efectos de interacción doble se encontró estadísticamente significativo ($p < 0.05$) solo a Tu*M y de las interacciones treiples a M*Tu*Ds y M*Ds*Con (ANOVA, Cuadro 12).

Al comparar microorganismo contra turbidez, vemos que MS-2 fue más resistente que las bacterias y a su vez *E. coli* más resistente que *S. typhimurium* en cualquier turbidez, también se observa que a menor turbidez, mayor reducción de microorganismos (Figura 14 a).

El orden de resistencia de los tres desinfectantes ya mencionada se mantuvo, donde podemos observar que TsT es más efectivo que NaOCl y este más que TCM (Figura 14 b).

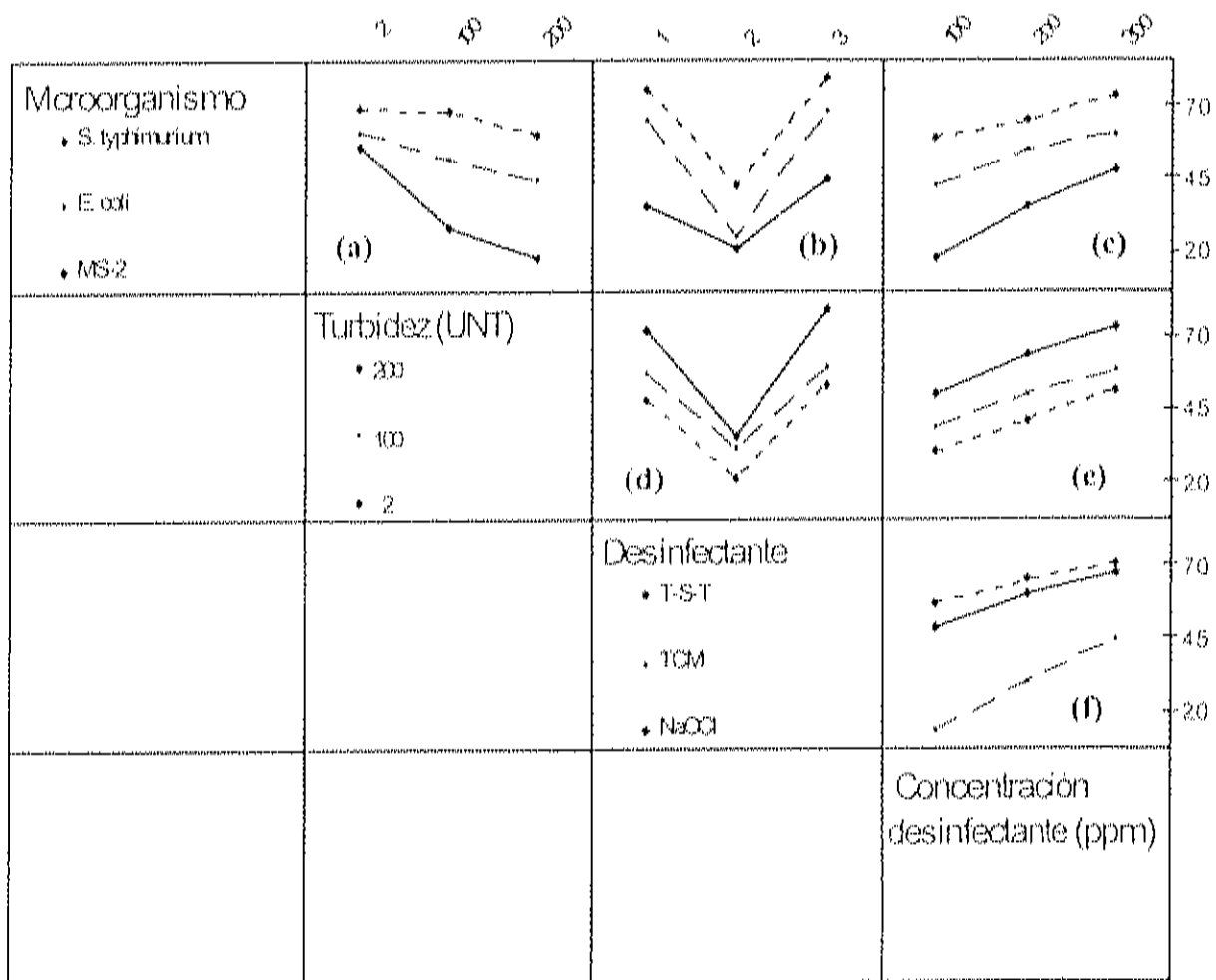
En lo que respecta a la concentración de los desinfectantes, los microorganismos también mantuvieron el mismo orden de resistencia; a mayor concentración, mayor efectividad de los desinfectantes (Figura 14 c).

A medida que la turbidez aumenta la efectividad de los tres desinfectantes disminuye; TsT mostró ser más efectivo que NaOCl y este más que TCM (Figura 14 d).

La interacción de turbidez y concentración no presentó diferencias significativas (Figura 14 e).

El orden de efectividad de los desinfectantes fue TsT > NaOCl > TCM con los tres microorganismos; a mayor concentración del desinfectante, mayor efectividad (Figura 14 f).

Figura 14. Efectos de Interacciones dobles para logaritmos reducidos de microorganismo, turbidez, desinfectante y concentración del desinfectante



Se analizaron los efectos principales e interacciones con cada microorganismo, lo que conformó las interacciones triples. En las gráficas de efectos principales del virus (M1), *E. coli* (M2) y *S. typhimurium* (M3), observamos que el orden de reducción logarítmica, en cuanto a turbidez fue de 2 UNT>100UNT>200UNT, el orden de efectividad de los desinfectantes y concentraciones fue TsT>NaOCl>TCM y 300>200>100 ppm de cloro total, respectivamente (Figura 15 a, b y c). Este comportamiento fue el mismo para los efectos principales de las interacciones dobles.

Figura 15 a. Efectos principales de MS-2

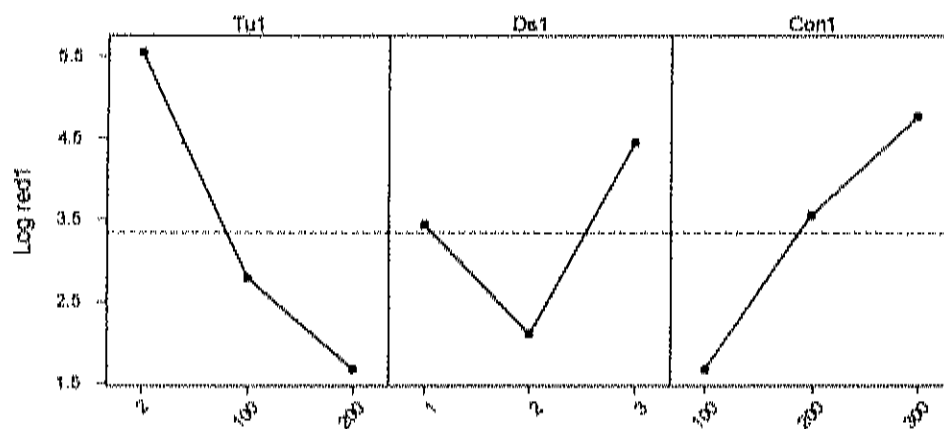


Figura 15 b. Efectos principales de *E. coli*

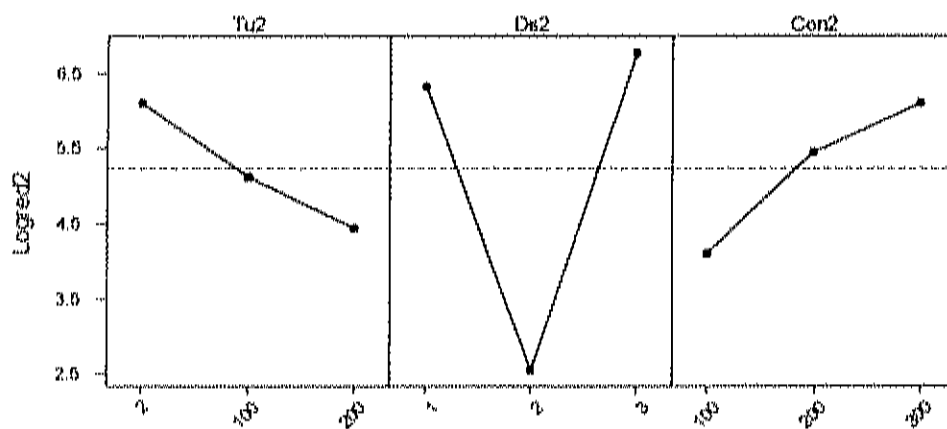
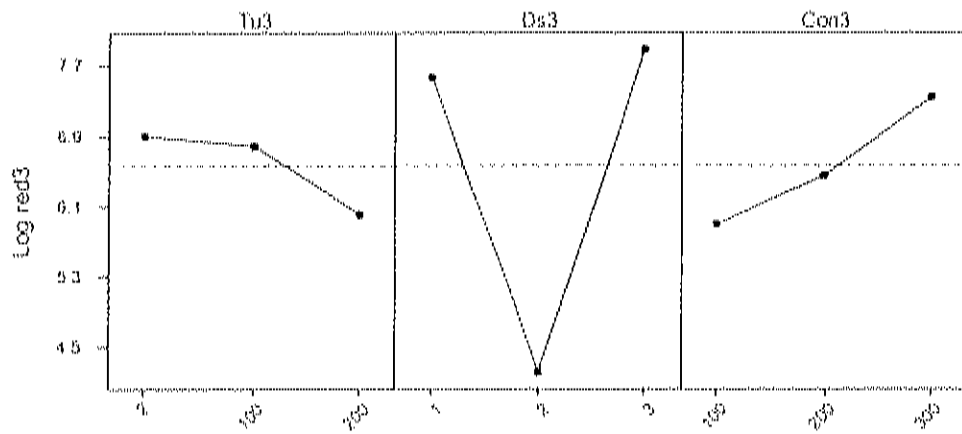


Figura 15 c. Efectos principales de *S. typhimurium*

Al comparar los efectos de interacciones triples de cada uno de los microorganismos, se observa que turbidez, desinfectante y concentración muestran un orden de reducción logarítmica de 2UNT>100 UNT>200UNT, asimismo vemos que el orden de efectividad de los desinfectantes y las concentraciones fueron TsT>NaOCl>TCM y 300>200>100 ppm de cloro total, respectivamente, manteniéndose los comportamientos al igual que en las interacciones dobles, en cuanto a la interacción de desinfectante con concentración, el orden de la concentración también se mantuvo con los tres microorganismos, en esta misma interacción, se observa que el orden de los desinfectantes también fue el mismo con el virus (M1) y *S. typhimurum* (M2), a diferencia del efecto con *E. coli* (M3), ya que en esta última interacción, NaOCl fue más efectivo que TsT en las concentraciones de 200 y 300 ppm de cloro total (Figura 16 a, b y c).

Figura 16 a. Efectos de interacciones triples para MS-2

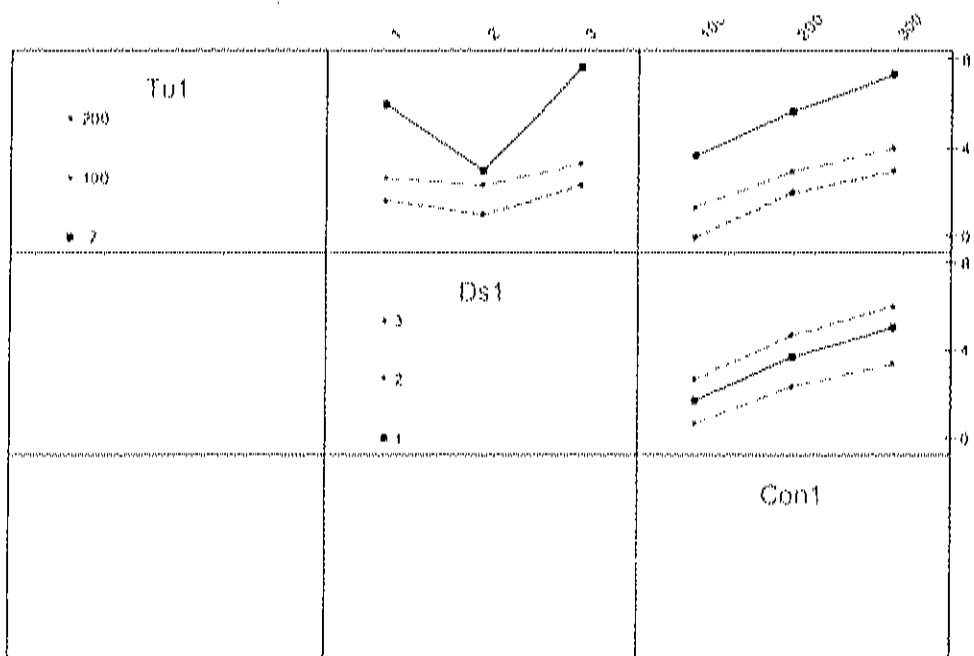


Figura 16 b. Efectos de interacciones triples para *E. coli*

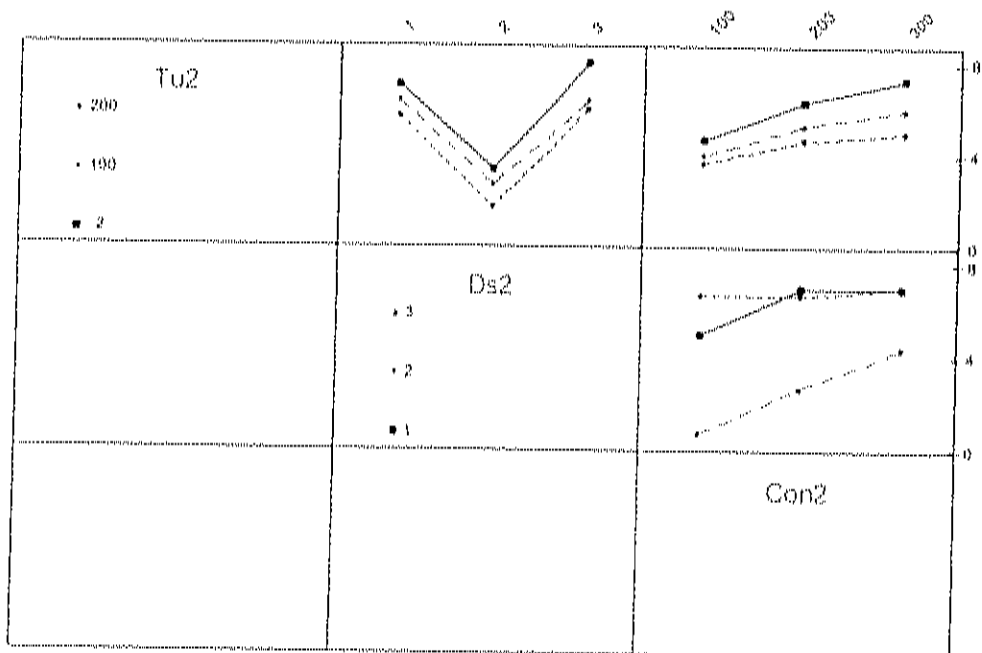
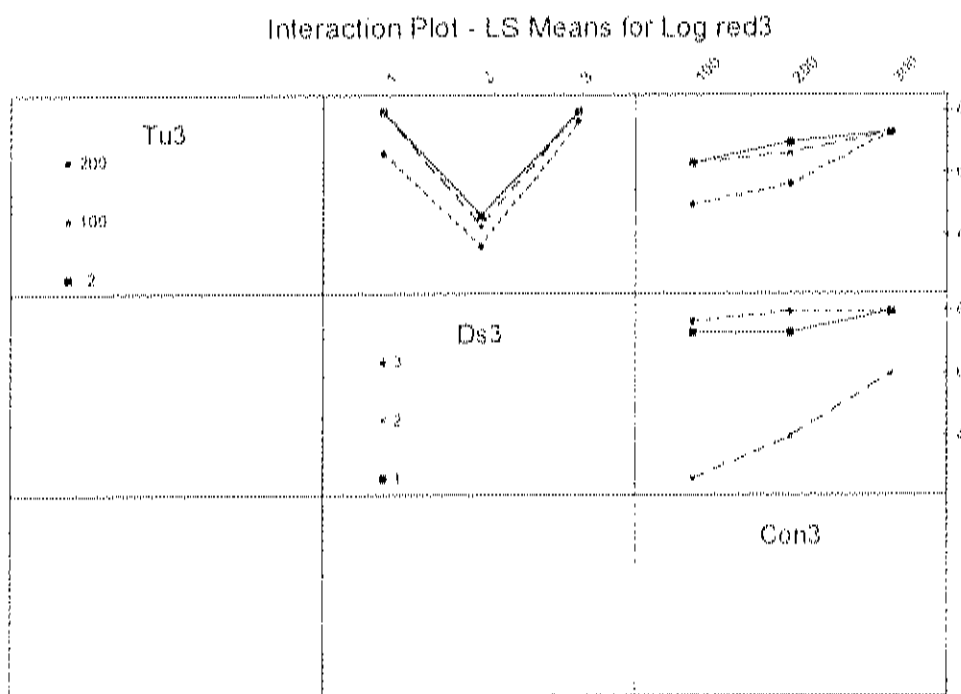


Figura 16 c. Efectos de Interacciones triples para *S. typhimurum*



CONCLUSIONES

De acuerdo a Geldrieck (1996), quien establece que un desinfectante es efectivo al reducir 4 y 6 logaritmos para virus y bacterias, respectivamente, y con los resultados obtenidos en este trabajo, se presentan las siguientes conclusiones:

- Hipoclorito de sodio, demostró ser un desinfectante efectivo con la turbidez de 2 UNT contra los tres microorganismos, en la concentración de 100 ppm de cloro total; con la turbidez de 100 UNT, contra MS-2 hasta la concentración de 300 ppm de cloro total, contra *E. coli* desde la concentración de 200 ppm y contra *S. typhimurium* desde la concentración de 100 ppm; con la turbidez de 200 UNT contra *E. coli* en la concentración de 200 ppm y contra *S. typhimurium* desde la concentración de 100 ppm
- Tricloromelamine fue efectivo en la turbidez de 2 UNT de cloro total contra MS-2 y *S. typhimurium*, en la concentración de 300 ppm y con la turbidez de 100 y 200 UNT contra *S. typhimurium* en la concentración de 300 ppm.
- Tricloro-s-triazinetrióna fue efectivo con la turbidez de 2 UNT contra MS-2, *E. coli* y *S. typhimurium* desde la concentración de 100 ppm de cloro total; con la turbidez de 100 y 200 UNT contra MS-2, hasta la concentración de 300 ppm y contra *E. coli* y *S. typhimurium* desde la concentración de 100 ppm
- A medida que la turbidez aumenta, la efectividad de los desinfectantes disminuye en cualquiera de las concentraciones y microorganismos en estudio

- Tanto tricloro-s-triazinetrióna como hipoclorito de sodio fueron desinfectantes clorados efectivos en la turbidez de 2 UNT, contra los tres microorganismos, desde la concentración de 100 ppm de cloro total, aunque TsT fue mejor que NaOCl por rebasar los límites establecidos.

- Las concentraciones de cloro total utilizadas (de 75 a 330 ppm) en empaques agrícolas son adecuadas en la turbidez de 2 UNT con los desinfectantes NaOCl y TsT, asumiendo casos extremos de agua contaminada.

SUGERENCIAS

- Llevar a cabo pruebas de evaluación de desinfectantes aplicando cloro libre en lugar de cloro total.
- Tricloro-s-triazinetrióna e hipoclorito de sodio podrían ser efectivos en concentraciones menores de 100 ppm de cloro total contra MS-2, *E. coli* y *S. typhimurium*, utilizando una turbidez de 2 UNT, por lo que se recomienda efectuar un lavado previo con agua limpia, monitorear la turbidez y enseguida aplicar la dosificación de cloro.
- Evaluar los beneficios al reducir la turbidez y utilizar menor dosificación de cloro.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Raouf, U M., Beuchat, L. R. And Ammar M S. 1993. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *F. Safety and Quality Enhancement Lab* **59**: 1999-2006.
- Agrios, G. N. 1999. Fitopatología. 2ª. Edición. Editorial LIMUSA. México 533-534.
- American Public Health Asociation. American Water Works Association and Water Environmental Federation. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Ed.
- A.O.A.C., 1990. Officials Methods of Analysis. 14th edition. Williams, S Ed. The Association of Officials Analytical Chemists. Washington, D C 1141
- Aranda A. A. 1998. En la frontera de la vida: Los virus. La ciencia /71 para todos. 134-136.
- Asplund, K. and Esko, N. 1991. The growth of Salmonellae in tomatoes. National Veterinary Institute. 177-181
- Bahret, M. J., Chaves, J., Courts, G., D'Alessio S. 1987. Biología. Prentice Hall Editorial.
- Bancomext. 2000. Salón Internacional de Alimentos y Tecnología. Alimentaria 2000. 5.
- Bartz J. and Showalter R. 1980. Infiltration of tomatoes by aqueous suspensions. *J. Series*. **71**: 515 - 518.
- Bell, C. and Kiriakides A. 1998. *E. coli*. A practical approach to the organism and its controls in foods. Blackie Academic & Professional. 1. Cap. 3, 131-136.
- Beuchat, L. R. 1995. Pathogenic Microorganisms Associated with Fresh Produce. *J. Food Prot.* **59**: 204-216.
- Beuchat, L. R., 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. WHO/FSF/FOS. Center of Food Safety and Quality Enhancement. University of Georgia, Griffin, Georgia, USA. 9-10, 13-16

- Bilton, G. 1994 Wastewater Microbiology Wiley – Liss Department of Environmental Engineering Sciences University of Florida, Gainesville, 23, 78 - 120.
- Blostein, J. 1993. An outbreak of *Salmonella javiana* Associated with Consumption of Watermelon *J. Environmental Health* **56**: 29-31
- Burdon, K. and Williams, R. 1985 Microbiologia. 8ª. Reimpresión Publicaciones Cultural S.A. de C.V
- Castro, M. A. 1999. Enfermedades transmitidas por los alimentos: el caso de frutas y hortalizas. ETA. Consejo Nacional de Producción Normas y Certificación.
- Chee, Ch. K. and Goepfert, J. M. 1970 Food Research Institute and Department of Bacteriology, University of Wisconsin. *J. Food Science* **35**: 326.
- Cherry, J. 1999. Improving the Safety of Fresh Product with Antimicrobials. *F. Technology*, **56**: 54-59.
- Chyang-Fuah, Y. and Cheng-Chung, Ch., 1997. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in Chinese-Style Sausage During the Drying Step of the Manufacturing Process as Affected by the Drying Condition and Curing Agent.
- CNA, 1997. Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL. Subdirección General Técnica, 1-15.
- Curtis, M. and Johnston, E. 1998. Chlorine Disinfection. CE 4124 Environmental Information Management. Civil Engineering Dept. Virginia Tech. 1-10.
- D'Aoust, J. Y., 1994. *Salmonella* and the international food trade. *J. Food Microb.* **24**:12-13.
- Del Rosario, B. and Beuchat, L. 1994. Survival and growth of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. *J. of Food Prot.* **58**: 105-107.
- Doyle, P. M. 1996. Fecal Coliforms in Tea: What's the Problem?. *Food Technology*. 104.
- Dreyfus C. G. 1998. El mundo de los microbios. La ciencia para todos/43 13, 26-49.

- EGIS 2000 Tratamiento del agua Productos quimicos utilizados en el tratamiento del agua <http://perso.wanadoo.es/ld/electroquimica/ce1193.htm> 1-3.
- El Debate. 2001. Publicado el 26 de abril por Luz Ma. Cázarez. 16-A.
- Elliott, J.G. 1999. Application of Antioxidant Vitamins in Foods and Beverages. *Food Technology*. **53** 46-48
- FDA. 1998. Guia para reducir al minimo el riesgo microbiano en los alimentos, en el caso de frutas y vegetales. Centro de Inocuidad alimentaria y nutrición aplicada. Depto. de salud y servicios sociales. Organismo fiscalizador de fármacos y alimentos. 1-32.
- Gänzle, M. G., Hertel, Ch and Hammes, W. P. 1999. Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* against nisin and curvacin A. *J Food Microb.* **48**: 37-38.
- Garbutt, J. 1997. Essentials of Food Microbiology. HumberSide University, UK., De Arnold. Cap. 7.
- Geldreich, E. 1996. Microbial Quality of Water Supply in Distribution Systems. CRC. Lewis. 76-78.
- Golden, D. A. , Rhodehamel, E. J. And Kauter, D. 1992. Growth of *Salmonella* spp. In Cantaloupe, Watermelon and Honeydew Melon. *J Protect.* **56**: 194-196.
- Graham, D. M. 1997. Use of ozone for food procesing. *F. Technol* **51** 72-75.
- Gross, K. C. and Wang, Ch Y 1999. Effects of post-processing handling and packaging on microbial population. *Postharv. Biol. and Tecno.* **15** 313-321.
- Guerrero, M. 1999. El agua. La ciencia para todos/102. Primera reimpresión. México. 71-77.
- Hayes, P. R. 1997. Food Microbiology and Higiene. Second edition. Cap 9.
- Johnson, T. R. and Case Ch L. 1992. Laboratory Experiments in Microbiology. 3th edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. 295-300.

- Jung, Y. S. and Beuchat L. R. 1999. Survival of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 in egg powders as affected by water activity and temperature. *J. Food Microb* **49**: 1-2.
- Kalt W. and Kushad M. M. 2000. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Planta and Human Health. Introduction to the Colloquium *HortScience*. **35**: 572-579
- Karch, E. and Loftis D. 1998. Disinfection Contact Time and Kinetics. Enviromental Information Manangement Civil Engineering Dept., Virginia Tech. 1-4.
- Leclec, H., Edberg, S., Pierzo, V. and Delattre, J. 2000. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *J of Applied Microbiology*. **88**: 5-21
- Király, Z., Klement, Z., Solymosy, F. and Voros J. 1974. Methods in Plant Pathology. Elsiever Scientific Publishing Company. 162-164.
- McDonnell, G. and Russell, D. A. 1999. Antiseptics and Disinfectants, Action, and Resistance. *Clinical Microbiol. Revs.* **12**: 155 - 157.
- Montgomery, D. C. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Editorial Iberoamericana. Cap. 14.
- Narkis, N., Offer, O., Linenberg, E. and Betzer, N. 1987. The Use of Chlorine Dioxide in Disinfection of Wastewater. Environ. And Water Resources Engineering. Israel.
- Ojeda, C. J., Silveira, G. M. J., Troncoso, R. R., Bringas, T. E., Mercado, R. J. Y Báez-Sañudo, R. 1996. Evaluación del manejo poscosecha de tomate para la estimación de pérdidas cualitativas y cuantitativas. *Hort Mex.* **4**:28-35.
- Olson, D. G. 1998. Irradiation of Foods. *Food Technology*. **52**: 56-61.
- Pao, S. and Davis, C. L. 1999. Enhancing Microbiological Safety of Fresh Orange Juice By Fruit Immersion in Hot Water and Chemical Sanitizers. *J. Food Protect.* **62**: 756.
- Payment, P. 1999. Poor efficacy of residual chlorine disinfectant in drinking water to inactivate waterborne pathogens in distribution systems. *J. Microbiol.* **45**: 710.

- Price, R. y personal del Instituto de Procesamiento de Alimentos. 1993. Alimentos Enlatados. Principios de Control del Proceso Térmico. Acidificación y Evaluación del Cierre de los Envases. 5ª. edición
- Rao, C., Metzalf, T. and Melnick, J. 1986. Human viruses in sediments, sludges and soils. *World Health Organization* **64**: 1-14
- Ray R. 1996. *Fundamental Food Microbiology*. USA. 435-436
- Richardson, S. D., Thruston Jr. A. D., Caughran, T. V., Collete, T. W., Patterson, K. S., Lynkins Jr. V. W. 1998. Chemical By – products of Chlorine and Alternative Disinfectants. *Food Technology*. **52**: 58-61.
- Rigola, L. M. 1989. Tratamiento de aguas industriales. Marcombo, S. A. BOIXAREU Editores PRODUCTICA. Barcelona, España. 28.
- Rodriguez, R. J. 1999. Agua: un riesgo de Contaminación microbiológica en Frutas y hortalizas. Consejo Nacional de Producción Normas y certificación.
- Sallam, S. S. and Donnelly, C. W. 1992. Destruction, Injury and Repair of *Listeria* spp. Exposed to Sanitizing Compounds. *J. Food Protection* **55**: 771-776.
- Salyers, A. A. and Dixie, D. W. 1994. Bacterial pathogenesis a molecular Salyers and Dixie D. Whitt. American Society for Microbiology USA 190 – 193, 229-230.
- Shewfelt, S. R. 1993. Postharvest Handling: A Systems Approach. Academic Press, Inc. 309-327.
- Smith, M. A. 1998. Minimized Microbial Hazards for Fresh Pduce. *Food Technology*. **52**: 140
- Siller, C. J., Báez, S. M. y Sañudo, B. A., 2000. Análisis de la Horticultura en México. *Productores de Hortalizas*. CIAD AC. 8-16.
- Suslow, T. 1998. Microbial Food Safety IS YOUR RESPONSIBILITY. Vegetable Biotechnology. UA. Davis.
- Taylor, C. 2001. Cinco al día para una mejor salud. Family & Consumer Sciences Oklahoma Cooperative Extension Community Nutrition Education Programs. Current NEA News. 1-3

- Thurman, R. and Gerba C. 1988 Molecular Mechanisms of Viral Inactivation by Water Disinfectants. *Advances in Applied Microbiology* **33**: 76-105.
- Tong, Z., Doyle, M. P. and Besser, E. R. 1993. Fate of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157H7 in Apple Cider with and without Preservatives University of Georgia.
- Tortora, G., Funke, B. and Case C. 1994. Microbiology an Introduction The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. 155 - 278
- Torres, O. J. 1997 No todo lo que brilla es limpio. Tecnología de Alimentos, Industria y Mercado. ATAM. México, D.F. **32**: 27-34.
- USDA/FAS. 2000. U.S. Fruits and Vegetables Imports Calendar Year 1998. 1-5.
- USEPA. 1986. United States Environmental Protection Agency. Pesticide Program Guide Standard and Protocol for Microbiological Water Purifiers. **51**: 133.
- Wei, C. Huang T. and Kim, J. 1995. Growth and survival of *Salmonella montevideo* on tomatoes and disinfection with chlorinated Water. *J. Food Prot* **58**: 829-836.
- Zhuang, R. and Beuchat R. 1995 Fate of *Salmonella montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. Center for Food Safety and Quality Enhancement and Department of Food Science and Technology. **61**: 2127-2130

- Thurman, R. and Gerba C. 1988. Molecular Mechanisms of Viral Inactivation by Water Disinfectants *Advances in Applied Microbiology* **33**: 76-105.
- Tong, Z., Doyle, M. P. and Besser, E. R. 1993. Fate of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157H7 in Apple Cider with and without Preservatives University of Georgia.
- Tortora, G., Funke, B. and Case C. 1994. Microbiology an Introduction The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. 155 - 278.
- Torres, O. J. 1997. No todo lo que brilla es limpio. Tecnología de Alimentos, Industria y Mercado ATAM, México, D.F. **32**: 27-34.
- USDA/FAS. 2000. U.S. Fruits and Vegetables Imports. Calendar Year 1998. 1-5.
- USEPA. 1986. United States Environmental Protection Agency Pesticide Program Guide Standard and Protocol for Microbiological Water Purifiers. **51**: 133.
- Wei, C. Huang T. and Kim, J. 1995. Growth and survival of *Salmonella montevideo* on tomatoes and disinfection with chlorinated Water. *J Food Prot.* **58**: 829-836
- Zhuang, R. and Beuchat R. 1995. Fate of *Salmonella montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. Center for Food Safety and Quality Enhancement and Department of Food Science and Technology. **61**: 2127-2130.