

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

**SOBREVIVENCIA DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus* EN
FRUTOS MÍNIMAMENTE PROCESADOS**

POR

NOHELIA CASTRO DEL CAMPO

TESIS APROBADA POR LA

**UNIDAD CULIACÁN
EN FISIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA POSCOSECHA
EN FRUTAS Y HORTALIZAS**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

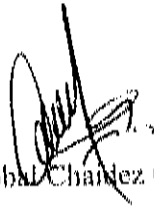
**MAESTRÍA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

CULIACÁN, SINALOA

DICIEMBRE DE 2002

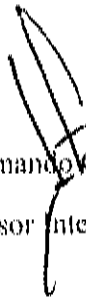
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la C. Nohelia Castro del Campo, 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 Chandez Quiroz

Director de Tesis



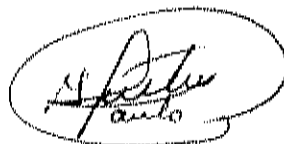
M.C. José Armando Carrillo Fasio

Asesor Interno



Dr. José Benigno Valdez Torres

Asesor Interno



M. C. Pablo Gortáres Moroyoqui

Asesor Externo

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización 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. Alfonso A. Gardea Bejar

Director General

"El hombre encuentra a Dios detrás de cada
puerta que la ciencia logra abrir"

Albert Einstein

Con mucho cariño para:

Mis padres Juan de Dios Castro Torres y Evangelina del Campo de Castro, a mis hermanas Nohemi y Karina, y mi bebé Jesús Joel, por ser mi inspiración, mi apoyo y llevarme por el camino de la superación, impulsándome siempre a seguir adelante.

¡ Los adoro !

Agradezco sinceramente:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.

Al Dr. Cristóbal Chaldez Quiroz, quien con dedicación y constancia guió mis pasos en esta investigación. Sinceramente Muchas Gracias!

Al Dr. José Benigno Valdez Torres por sus valiosas asesorías en el área de estadística.

A los M.C. Armando Carrillo Fasio y Pablo Gortarez Moroyoquí por su importante colaboración.

A mis profesores de Maestría, Dr. Jorge H. Siller Cepeda, Dr. Tomás Osuna Enciso, Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante, Dr. Raymundo García, M.C. Blas Galván Piña y M.C. María Dolores Muy Rangel, por transmitir la riqueza de sus conocimientos.

Al IQ Werner Rubio Carrasco y IBQ Evelia Araiza, quienes siempre estuvieron presentes aportando todo lo que estuvo a su alcance.

A mis amigos María de Jesús Moreno, Rosabel Vélez, Marcela Soto, Hilda Álvarez, Celida Martínez, Paola Meza, Korynthia López, Victor Arana, Gabriel Cázares y Lucío Hernández por brindarme su amistad, aligerando los momentos difíciles, y especialmente a Javier López por su valioso apoyo en la realización de esta investigación, ¡ Gracias *S. aureus* !

A mis compañeros y todo el personal CIAD, Culiacán.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	5
METAS.....	6
HIPÓTESIS.....	6
REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
Descripción del Problema.....	7
Microorganismos patógenos asociados con productos frescos.....	11

Generalidades de las especies bacterianas en estudio.....	13
<i>Escherichia coli</i>	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	20
Factores limitantes en la sobrevivencia bacteriana.....	25
Composición de frutas y hortalizas.....	25
Carbohidratos.....	25
Efecto de los carbohidratos en bacterias.....	26
Ácidos orgánicos.....	28
Efecto de los ácidos orgánicos en bacterias.....	28
Temperatura.....	31
Efecto de la temperatura en bacterias.....	33

pH.....	36
Generalidades de los frutos en estudio.....	39
Tomate.....	39
Pepino.....	41
Melón.....	43
Mango.....	45
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
Frutos.....	47
Preparación de los frutos.....	47
Medios de cultivo.....	48
Agar mFC.....	48

Agar Sal y Manitol.....	48
Caldo de Soya Trypticaseína.....	49
Microorganismos.....	49
Regeneración bacteriana.....	49
Inoculación bacteriana.....	50
Análisis de sobrevivencia.....	51
Análisis estadístico.....	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
Análisis de varianza.....	54
CONCLUSIONES.....	73
SUGERENCIAS.....	74

BIBLIOGRAFÍA..... 75

ANEXOS..... 85

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en América Latina 1995-1997.....	10
2. Brotes de enfermedades por agentes bacterianos transmitidas por alimentos en América Latina, 1995-1997.....	12
3. Brotes reportados de infecciones de <i>E. coli</i> O157:H7 en los Estados Unidos, 1982-1994.....	16
4. Condiciones óptimas para el desarrollo de <i>Escherichia coli</i>	17
5. Condiciones óptimas para el desarrollo de <i>Staphylococcus aureus</i> :.....	22
6. Condiciones óptimas para la producción de toxinas por <i>Staphylococcus aureus</i>	22

7. Contenido de azúcar (g/100 g peso fresco) de algunas frutas y hortalizas maduras.....	27
8. Frutas y hortalizas en los cuales el ácido cítrico y málico es el principal ácido orgánico.....	30
9. Valor nutritivo del tomate.....	40
10. Valor nutritivo del pepino.....	42
11. Valor nutritivo del melón.....	44
12. Valor nutritivo del mango.....	46
13. Medios de cultivo y técnicas de laboratorio utilizadas para los diferentes microorganismos.....	52
14. ANOVA de <i>Escherichia coli</i>	63
15. ANOVA de <i>Staphylococcus aureus</i>	72

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Mecanismo de infección de <i>Escherichia coli</i>	15
2. Mecanismo de infección de <i>Staphylococcus aureus</i>	23
3. Rango de crecimiento de diferentes tipos de microorganismos en respuesta a la temperatura.....	32
4. Desarrollo bacteriano mediado por la temperatura.....	34
5. pH extracelulares de distintos ambientes.....	37
6. Efectos principales: fruto, temperatura y tiempo, en la sobrevivencia de <i>Escherichia coli</i>	56
7. Perfil de supervivencia de <i>Escherichia coli</i>	57
8. Interacción Fruto - Temperatura en <i>Escherichia coli</i>	61

9.	Efecto de la interacción Temperatura – Tiempo en la sobrevivencia de <i>Escherichia coli</i>	62
10.	Efectos principales: fruto, temperatura y tiempo para <i>Staphylococcus aureus</i>	65
11.	Perfil de sobrevivencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	67
12.	Efecto de la interacción Fruto – Temperatura en <i>Staphylococcus aureus</i>	70
13.	Efecto de la interacción Temperatura – Tiempo en <i>Staphylococcus aureus</i>	71

RESUMEN

El incremento en el consumo de frutas y hortalizas frescas ha marcado la pauta para la colocación de nuevos productos comerciales ofrecidos al consumidor. La preferencia por una rápida preparación, con mínimo procesamiento ha aumentado; sin embargo, es debido a este tipo de procedimientos que estos alimentos han sido involucrados en brotes e intoxicaciones alimentarias.

La presencia de bacterias patógenas afecta la inocuidad de frutas y hortalizas frescas. La frecuencia con que se han manifestado cuadros epidémicos en años recientes, han puesto en entredicho las buenas prácticas de procesamiento a la que son sometidos este tipo de productos. Esto repercute en problemas a la salud humana, lo cual se ve reflejado en la alta incidencia de brotes diarreicos e intoxicaciones con implicaciones clínicas de mayor importancia en quienes los consumen.

Este estudio se llevó a cabo con la finalidad de determinar la capacidad de sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutas y hortalizas mínimamente procesadas, a dos temperaturas de almacenamiento: 25 °C, y 4 °C; en intervalos de tiempo de 0, 0.5, 1, 3, 24, 48, 72 y 96 horas, aportando así información acerca de la manera en que la temperatura de almacenamiento influye sobre la sobrevivencia de bacterias en estos productos una vez que han sido infestados.

Frutos de tomate, pepino, melón y mango fueron utilizados para los ensayos de sobrevivencia microbiana. En hortalizas se obtuvieron las mayores concentraciones de ambas bacterias a 25 °C, mientras que el mayor desarrollo bacteriano a 4 °C se presentó

en melón. *E. coli* presentó concentraciones similares en ambas condiciones de almacenamiento. Las concentraciones de *S. aureus* variaron con respecto a la temperatura de almacenamiento.

S. aureus demostró ser la bacteria que sobrevive por un tiempo más prolongado, ya que al finalizar los cinco días de análisis se registraron concentraciones mayores a los primeros tiempos de análisis a 25 °C, mientras que a 4 °C se observó un incremento en el último periodo de incubación.

Por lo que se sugiere que deben tomarse precauciones para prevenir la contaminación de ensaladas o productos mínimamente procesados durante la preparación de los mismos en hogares o restaurantes, ya que una vez contaminados los alimentos, la temperatura de refrigeración no constituye una limitante en el desarrollo y sobrevivencia de estos patógenos.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos patógenos juegan un papel muy importante en los brotes de enfermedades ocasionados por el consumo de alimentos (Potter *et al.*, 1997; Szabo *et al.*, 2000). Una gran variedad de alimentos de origen animal, tales como: pescado, mariscos, carnes rojas y pollo, con un proceso de cocción deficiente han sido implicados en episodios diarreicos y tóxico-infecciosos (Doyle *et al.*, 1997b; Knabel, 2002; Glassmoyer y Russell, 2001). En años recientes la frecuencia de brotes asociados al consumo de frutas y hortalizas contaminadas se ha elevado, debido a su alto consumo ya que son una parte esencial de la dieta humana (Beuchat, 1996; Siller, 2001) y particularmente como resultado del incremento en la demanda por los productos mínimamente procesados (Doyle, 1990; Beuchat, 1998; Doyle *et al.*, 1997a). Los procedimientos rápidos de preparación de los alimentos ha aumentado; sin embargo, es debido a este tipo de prácticas que estos productos han sido involucrados en brotes e intoxicaciones alimentarias (Knabel, 2002).

La presencia de bacterias patógenas afecta la inocuidad de frutas y hortalizas frescas (Cliver, 2001). La frecuencia con que se han manifestado cuadros epidémicos han puesto en entredicho la seguridad de estos productos, no sometidos a buenas prácticas de procesamientos, reduciendo o eliminando la carga microbiana (Siller, 2001), esto repercute en problemas a la salud humana, lo cual se ve reflejado en la alta incidencia de brotes diarreicos e implicaciones clínicas de mayor importancia en quienes los consumen (Doyle *et al.*, 1997a).

El incremento en la popularidad de frutos mínimamente procesados ha guiado a una importante colocación de nuevos productos comerciales ofrecidos al consumidor (Brackett, 1987), como los proporcionados en restaurantes establecidos, donde se ofrecen ensaladas de vegetales y de comida rápida, y las infecciones asociadas al consumo de frutas y hortalizas frescas es mayor (Speirs *et al.*, 1995; Jablonski y Bohach, 1997; Potter *et al.*, 1997; Janisiewicz *et al.*, 1999; Szabo *et al.*, 2000; Glassmoyer y Russell, 2001), esto como resultado de la manipulación de los alimentos frescos por parte del personal, además de la contaminación de superficies donde se preparan (Doyle, 1990; Enriquez *et al.*, 1997). La alta incidencia de brotes en estos lugares, pone de manifiesto la necesidad de dirigir acciones de información a todos aquellos involucrados en el procesamiento de los alimentos para prevenir la contaminación (Kaneko *et al.*, 1999).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* son los principales agentes patógenos implicados en las enfermedades transmitidas por alimentos en Latinoamérica, ocupando el segundo y tercer lugar, respectivamente (INPPAZ, 2001).

Existen puntos críticos, durante los cuales se puede comprometer la inocuidad de los alimentos (INPPAZ, 2001). Los brotes por *S. aureus* y *E. coli* han sido asociados en su gran mayoría a un manejo deficiente de los alimentos (Feachmen *et al.*, 1983) por las personas que están en contacto en la preparación de los productos frescos (Abdul-Raouf *et al.*, 1997; Díaz-Sobac y Vernon-Carter, 1999; Huang *et al.*, 2001). La temperatura de almacenamiento constituye el factor principal para el desarrollo de bacterias

(NACMCF, 1999). Estas bacterias poseen dosis infecciosas bajas, las cuales pueden desarrollarse rápidamente en los alimentos, una vez que han encontrado condiciones propicias para su desarrollo (Parrilla *et al.*, 1993; Janisiewicz *et al.*, 1999; Kaneko *et al.*, 1999).

Las frutas y hortalizas contienen los nutrientes necesarios para el rápido crecimiento de bacterias, tales como carbohidratos indispensables para la obtención de energía, así como pH tolerables por las mismas (Brackett, 1987; del Rosario y Beuchat, 1995; Beuchat, 1998; Knabel, 2002). La alta concentración de acidez de algunos productos frescos, no afecta la sobrevivencia de bacterias patógenas, aumentando así el potencial de contaminación microbiana (Fernández *et al.*, 1989; Conner y Kotrola, 1995; Ryu y Beuchat, 1998).

E. coli y *S. aureus* pueden causar implicaciones clínicamente severas (Pao y Davis, 1999). La intoxicación por *S. aureus* se debe a la ingestión de exotoxinas, las cuales provocan náuseas, vómito, dolores abdominales y diarrea (Salyers y Dixie, 1994). *E. coli* causa severos desordenes gastrointestinales y en ambos casos se ha reportado la muerte por infecciones de estos patógenos (Kerr *et al.*, 1999).

La gran capacidad de *S. aureus* de resistir a altas presiones osmóticas lo hace apto para crecer en alimentos (Tortora *et al.*, 1994).

La gran capacidad de adaptación y sobrevivencia que presentan estos microorganismos patógenos, hace particularmente compleja la intervención, mediante la prevención de condiciones propicias para su desarrollo evitando así el riesgo a la salud.

Debido a lo anterior se plantea el presente estudio con la finalidad de determinar cual es la capacidad de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de sobrevivir sobre productos mínimamente procesados, y la influencia de la temperatura de almacenamiento sobre su desarrollo como una posible limitante minimizando así el riesgo de contraer infecciones bacteriológicas.

OBJETIVO

Objetivo General

Determinar la sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en tomate, pepino, melón y mango mínimamente procesados.

Objetivos Particulares

1. Evaluar la sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a dos temperaturas en los frutos mínimamente procesados (25 °C y 4 °C).
2. Determinar si *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se reproducen en los frutos mínimamente procesados.
3. Determinar cual de las bacterias tiene mayor capacidad de sobrevivencia.

METAS

1. Obtener información que nos permita determinar la capacidad de sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
2. Proveer información para estimar el riesgo a la salud pública asociado con la contaminación de frutas y hortalizas mínimamente procesadas.

HIPÓTESIS

1. Las bacterias presentan un mayor desarrollo a la temperatura de almacenamiento de 25 °C
2. Existen condiciones propicias en los frutos mínimamente procesados que favorecen el desarrollo y sobrevivencia de bacterias.
3. *Staphylococcus aureus* posee una mayor capacidad de sobrevivencia que *Escherichia coli*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Descripción del problema

La incidencia de enfermedades asociadas al consumo de frutas y hortalizas frescas, ha aumentado en los últimos años. La demanda de frutas y hortalizas frescas de alta calidad, vida de anaquel prolongada y “listas para ser consumidas” se ha incrementado, generando que la comercialización de productos hortofrutícolas esté dirigida a los que sean manejados y/o conservados por tecnologías de mínimo procesamiento, y de aceptable inocuidad microbiológica (Díaz-Sobac y Vernon-Carter, 1999). Muchas de estas demandas resultan en una reducción general de la preservación de los alimentos, ya que el consumidor afirma que un producto fresco posee mejor calidad nutricional que aquellos que han sido congelados o enlatados (Cliver, 2001). Esto trae consigo la generación de condiciones que pueden incrementar el potencial de contaminación y sobrevivencia microbiana (Szabo *et al.*, 2000).

Existen puntos críticos, durante los cuales se puede comprometer la inocuidad de los alimentos (Parrilla *et al.*, 1993). Estos se pueden llevar a cabo por higiene deficiente del personal, temperaturas no apropiadas de almacenamiento, alimentos en contacto con superficies o utensilios contaminados (Brackett, 1987; Knabel, 2002).

Las frutas y hortalizas contienen los nutrientes necesarios para el rápido crecimiento de patógenos causantes de enfermedades transmitidas por la ingestión de alimentos (Janisiewicz *et al.*, 1999).

Un número considerable de estas enfermedades han sido asociadas al consumo de vegetales frescos expuestos a contaminación fecal y a la producción de toxinas (Castro y Escartín, 2000).

Las frutas y hortalizas pueden servir como vehículo de microorganismos patógenos y causar enfermedades en humanos (Kaneko *et al.*, 1999). Esto toma mayor importancia al considerar que el tiempo de sobrevivencia de los microorganismos patógenos puede ser prolongado, llegando a sobrevivir durante semanas o meses (Feachmen *et al.*, 1983), y a las bajas dosis infecciosas de los mismos (Doyle *et al.*, 1997a).

En México, para 1996 las enfermedades diarreicas ocuparon uno de los primeros lugares como causa de enfermedad en los menores de 5 años, y generaron el 7.4% de la demanda de consulta en los servicios de salud y el 10% de las hospitalizaciones pediátricas (conava, 2000; www.conava.gob.mx). Mientras que para 1999 las enfermedades infecciosas intestinales ocuparon el tercer lugar como causa de mortalidad infantil (SSA, 1999; www.ssa.gob.mx).

Con el propósito de conocer los agentes y alimentos involucrados de mayor frecuencia en los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, el Laboratorio Nacional de Salud Pública realizó una revisión de toxoinfecciones alimentarias de origen microbiano de 1980 a 1990, donde se confirmaron 58 brotes (73%) de los 79 estudiados, de los cuales 24.1% ocurrió en reuniones, 10.3% en escuelas o guarderías, 8.6% en restaurantes y 8.6% en hospitales, dando como resultado que el 48.2% de los incidentes fueron provocados por *S. aureus*, (Parrilla *et al.*, 1993).

Durante el periodo de Enero de 1995 a Julio de 1997, 19 países, incluyendo México, reorientaron sus sistemas de vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos y reportaron al Sistema Regional coordinado por el Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ) 2236 brotes con un total de 68,886 casos y 173 muertes (Cuadro 1) (INPPAZ, 2001).

Dos microorganismos patógenos involucrados en un gran número de brotes por el consumo de frutas y hortalizas contaminadas son *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Doyle, 1990; Carrera *et al.*, 2000; FAO/CONACYT, 2001). Ambas bacterias pueden causar implicaciones clínicamente severas (Pao y Davis, 1999). La intoxicación por *S. aureus* se debe a la ingestión de exotoxinas, las cuales provocan náuseas, vómito, dolores abdominales y diarrea (Salyers y Dixie, 1994). *E. coli* causa severos desórdenes gastrointestinales, y en ambos casos se ha reportado la muerte (Kerr *et al.*, 1999).

Una pregunta fundamental debe ser resuelta, ya sea que los microorganismos patógenos depositados en los frutos constituyan un número considerable para causar una enfermedad en los humanos después de su consumo, o que los bajos niveles iniciales encontrados en los frutos puedan sobrevivir, reproducirse e incrementar el riesgo de infección (Janisiewicz *et al.*, 1999).

Cuadro I. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en América Latina 1995-1997.

PAÍSES	Nº BROTES	ENFERMOS	FALLECIDOS
Argentina	22	275	0
Bahamas	48	5459	0
Barbados	1	4	0
Brasil	86	6564	1
Chile	337	4084	2
Costa Rica	32	73	0
Cuba	1091	37141	12
Rep. Dominicana	41	222	0
Ecuador	34	1250	12
El Salvador	18	427	2
Guatemala	20	152	7
Jamaica	3	99	0
México	268	8028	74
Nicaragua	56	230	0
Panamá	6	95	0
Paraguay	34	399	0
Perú	29	1525	58
Uruguay	21	785	0
Venezuela	89	2056	5
Total	2236	68868	173

Microorganismos patógenos asociados con productos frescos

La presencia de distintos tipos de microorganismos patógenos: bacterias, virus y protozoarios en productos frescos, ha sido documentada por muchos años (Beuchat, 1996; Monge *et al.*, 1996; Chaidez, 2002). Numerosos brotes de gastroenteritis humana han sido atribuidos al consumo de hortalizas contaminadas y en menor grado a frutas. *E. coli* enterohemorrágica, específicamente el serotipo O157:H7, ha sido implicada como el agente causal en brotes de gastroenteritis, como resultado del consumo de melones. Brotes de salmonelosis en humanos han sido ocasionados por la ingestión de tomates, ejotes, melones y sandías contaminadas (Beuchat, 1996). Un brote de gastroenteritis asociado con ajo por *Shigella flexneri* fue reportado recientemente en Estados Unidos. Brotes de listeriosis han sido epidemiológicamente adjudicados al consumo de repollo y lechuga fresca (Beuchat, 1996). Enfermedades gastrointestinales causados por el consumo de vegetales crudos y germinados contaminados con *Bacillus cereus* han sido documentadas (Beuchat, 1996). Un incremento en el consumo de productos frescos y mínimamente procesados en los Estados Unidos y otros países, acompañado con un incremento en la importación de productos de los países de regiones donde los estándares para el cultivo y manejo de los productos son deficientes, ha resultado en un aumento en el interés por conocer las razones principales a los que se deben los brotes en humanos que pueden ser atribuidos a productos frescos contaminados, particularmente ensaladas de vegetales (Beuchat, 1996).

Cuadro 2. Brotes de enfermedades por agentes bacterianos transmitidas por alimentos en América Latina, 1995-1997.

BACTERIA	BROTOS	CASOS
<i>Salmonella spp</i>	195	11 005
<i>Staphylococcus aureus</i>	193	4 978
<i>Escherichia coli</i>	60	1 994
<i>Vibrio cholerae</i>	22	241
<i>Clostridium perfringens</i>	22	1 053
<i>Shigella spp</i>	16	5 577
<i>Bacillus cereus</i>	7	291
<i>Pleisiomonas shigelloides</i>	3	48
<i>Clostridium botulinum</i>	2	15
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	111

SIRVE-ETA-OPS/INPPAZ, 2001.

Generalidades de las especies bacterianas en estudio

Escherichia coli

E. coli forma parte de la microflora anaeróbica facultativa del tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente (Bitton, 1994). Fue descubierta en el año de 1885 por el Dr. Theodor Escherich. El primer aislamiento confirmado de *E. coli* O157:H7 se llevo a cabo en Estados Unidos en el año de 1975, y fue identificada por primera vez como patógeno humano en 1982 al ser asociada con dos brotes de colitis hemorrágica (Doyle *et al.*, 1997b). Estos casos se llevaron a cabo por la ingestión de alimentos de una cadena de restaurantes de comidas rápidas, donde se detectó una cepa de *Escherichia coli* perteneciente al serotipo O157:H7 (Viñas *et al.*, 2000).

La familia enterobacteriaceae está constituida por un gran grupo heterogéneo de bacilos Gram negativos, en los que se incluyen géneros como *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Proteus* (Brooks *et al.*, 1999).

Dentro de las cepas de *E. coli* patógenas, causan distintos síntomas, es por esto importante diferenciar entre las mismas y reconocer la cepa responsable de causar un brote en particular. El sistema de clasificación serológica de *E. coli* se basa en dos componentes de superficie: el antígeno O, determina el serogrupo y el antígeno H (flagelar) determina el serotipo. De acuerdo a los patrones de infección *E. coli* se clasifica en 5 virotipos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (Salyers y Dixie, 1994).

La vía de infección es fecal-oral (Figura 1). Desde su identificación como patógeno *Escherichia coli* O157:H7 ha sido la causa de una serie de brotes en los Estados Unidos, los cuales se han incrementado año con año (Cuadro 3).

La infección por *E. coli* frecuentemente causa diarrea severa sanguinolenta y cólicos abdominales, algunas veces la infección ocasiona diarrea sin salida de sangre e incluso puede ser asintomática. La fiebre puede o no estar presente, y la infección se da a partir de los 5 a 10 días de haber iniciado los síntomas (CDC, 2000).

Las condiciones óptimas para el desarrollo de *E. coli* se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 3. Brotes reportados de infecciones de *E. coli* O157:H7 en los Estados Unidos, 1982-1994.

Año	Nº de Brotes	Nº de casos
1982	2	47
1984	2	70
1986	2	52
1987	1	51
1988	3	153
1989	2	246
1990	2	75
1991	4	54
1992	4	75
1993	17	1,006
1994	30	511
Total	68	2,334

CDC,1995.

Cuadro 4. Condiciones óptimas para el desarrollo de *Escherichia coli*.

Parámetro	Valor
pH mínimo	4
pH máximo	9
Temperatura mínima	6.5 °C
Temperatura máxima	49.4 °C
Requerimiento de Oxígeno	Anaerobía Facultativa

FDA, 2001.

Se han realizado investigaciones para determinar la sobrevivencia de *E. coli* en diferentes condiciones; estudiando la influencia del empaçado en atmósferas modificadas, temperatura de almacenamiento, y el tiempo de sobrevivencia y crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 inoculadas en hojas de lechuga, rebanadas de pepino y rodajas de zanahoria. El crecimiento de microorganismos psicrófilos y mesófilos, cambios de pH y cualidades sensoriales, como una evaluación subjetiva fueron monitoreados. El empaçado bajo atmósferas conteniendo 3% de oxígeno y 97% de nitrógeno no tienen un efecto aparente sobre la población de *E. coli* O157:H7. Igualmente la población viable declinó en vegetales almacenados a 5 °C e incrementaron en vegetales almacenados a 12 y 21 °C por encima de 14 días. El incremento más acelerado se registró en lechuga y pepino almacenados a 21 °C. Estos resultados sugieren que un factor desconocido asociado con zanahorias inhibe el crecimiento de *E. coli* O157:H7. La reducción del pH de las hortalizas fue relacionada con el incremento inicial en la población de *E. coli* y el incremento de la microflora natural. La reducción en la población en algunos casos como aquellas almacenados a 21 °C fue atribuida al efecto tóxico de ácidos acumulados. Se demostró la habilidad de *E. coli* O157:H7 de crecer en ensaladas vegetales frescas que son procesadas y almacenadas bajo condiciones comerciales (Abdul-Raouf *et al.*, 1993). También se determinó la capacidad de *Escherichia coli* O157:H7 de sobrevivir y crecer en cubos de melón, sandía y sobre la corteza de estas frutas. Las poblaciones del patógeno se incrementaron en cubos almacenados a 25 °C pero permaneció constante en melones almacenados bajo condiciones de alta humedad relativa ($93 \pm 5\%$) a 25°C por 14 a 22 días. El patógeno

rápida mente se inactivó en la superficie de melones almacenados a 5°C (del Rosario y Beuchat, 1995).

E. coli es capaz de sobrevivir en condiciones ácidas por más de 56 días, pero la sobrevivencia es afectada por el tipo de ácido y la temperatura (Conner y Kotrola, 1995). Así como también posee una extraordinaria tolerancia a pH bajo, logrando sobrevivir más de 42 días en jugo de manzana (Ryu, 1998), Al igual que de 10 a 31 días en mayonesa con un pH de 2 (Usera, 1998). Rahn *et al.* (1997) afirman que *E. coli* es una causa seria en los brotes por infecciones alimentarias en humanos y hoy en día es considerada como un problema serio de salud pública por causar implicaciones clínicamente severas, tales como infecciones del aparato urinario, enfermedades diarreicas, meningitis, entre otras de gran importancia (Kerr *et al.*, 1999).

Staphylococcus aureus

Las intoxicaciones alimentarias debidas a *Staphylococcus* son una de las causas más frecuentes de gastroenteritis en el mundo. Estas son el resultado de la ingestión de una o más enterotoxinas estafilocócicas en alimentos contaminados. La asociación de brotes por toxinfecciones por *Staphylococcus* ha sido reportada hace más de un siglo. Barber en 1914, fue el primero en relacionar una toxina en intoxicaciones alimentarias (Jablonski y Bohach, 1997).

El género *Staphylococcus* ha sido subdividido en por lo menos 23 especies. La más importante de estas es *Staphylococcus aureus*, la especie involucrada en la gran mayoría de los brotes por intoxicación alimentaria (Bergdoll, 1990).

Staphylococcus aureus forma parte de la familia Micrococcaceae. Los *Staphylococcus* son cocos Gram positivos, no móviles, anaerobios facultativos, catalasa positivos y capaces de crecer en un medio con el 15% de cloruro sódico y a temperaturas dentro de un rango amplio de 7 a 50 °C (Murray *et al.*, 1997) (Cuadro 5 y 6).

Staphylococcus aureus posee una alta resistencia al calor, pueden tolerar 60 °C por media hora. Soportan también la desecación e irradiación, lo cual las ayuda a sobrevivir en condiciones adversas. Su capacidad de resistencia a altas presiones osmóticas los hace aptos para crecer en alimentos (Tortora *et al.*, 1994).

Las intoxicaciones estafilocócicas son una de las enfermedades más frecuentes causada por alimentos contaminados en la mayoría de los países latinoamericanos (Potter *et al.*, 1997).

El género *Staphylococcus* puede producir enfermedad tanto por su capacidad para multiplicarse y extenderse con amplitud por los tejidos, como por su producción de sustancias extracelulares. (Brooks *et al.*, 1999).

Las enterotoxinas estafilocócicas son designadas como SE, seguidas por el serotipo. Siete serotipos de enterotoxinas estafilocócicas han sido identificadas (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED y SEE). SEA es el serotipo más comúnmente asociado con intoxicaciones alimentarias (Tortora *et al.*, 1995).

La intoxicación alimentaria estafilocócica se debe a la ingestión de alimentos contaminados con toxina y no directamente a los microorganismos (Figura 2). Después de la ingestión del alimento, el comienzo de la enfermedad es brusco y rápido, con un periodo de incubación de cuatro horas, consistente con una enfermedad mediada por toxina preformada. No se produce nueva síntesis de toxina por estafilococos ingeridos, por lo que el curso de la enfermedad es breve y los síntomas duran en general menos de 24 horas. La intoxicación alimentaria estafilocócica se caracteriza por vómitos severos, diarrea, dolor abdominal y náuseas. Es posible la cefálea y la sudoración, pero no se presenta fiebre alta. La diarrea es acuosa sin sangre, y existe riesgo de deshidratación por pérdida significativa de líquidos (Murray *et al.*, 1997; Brooks *et al.*, 1999).

Cuadro 5. Condiciones óptimas para el desarrollo de *Staphylococcus aureus*.

Parámetro	Rango
pH mínimo	4
pH máximo	10
Temperatura mínima	7 °C
Temperatura máxima	50 °C
Requerimiento de Oxígeno	Anaerobia Facultativa

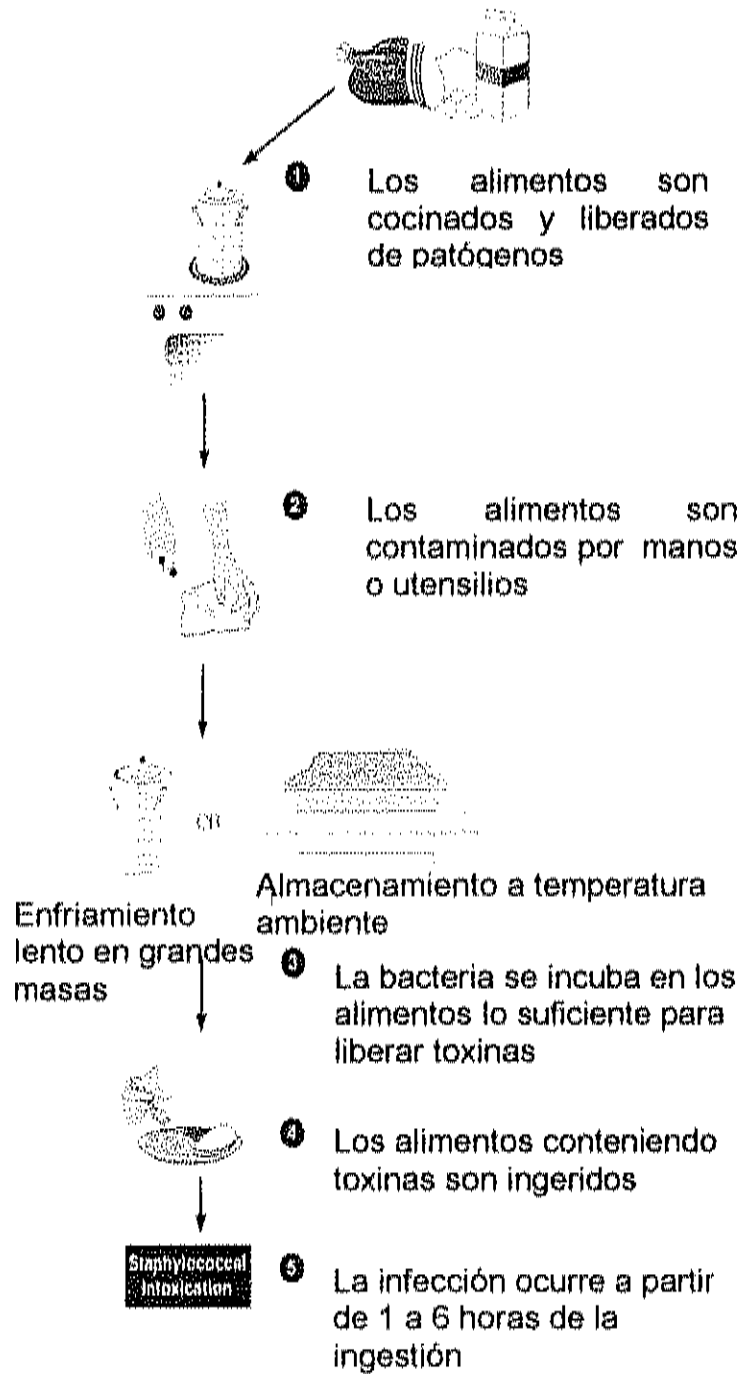
FDA, 2001.

Cuadro 6. Condiciones óptimas para la producción de toxina por *Staphylococcus aureus*.

Parámetro	Rango
pH mínimo	4
pH máximo	9.8
Temperatura mínima	10 °C
Temperatura máxima	48 °C

FDA, 2001.

Figura 2. Mecanismo de infección de *Staphylococcus aureus*



Se ha estudiado el efecto de condiciones estrictamente anaerobias sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y la producción de enterotoxinas A (SEA) estafilocócicas. Ya que *S. aureus* es una bacteria anaerobia facultativa, su crecimiento es más limitado anaeróbicamente que aeróbicamente. Con crecimiento anaeróbicamente bajo, es menos la toxina producida que bajo condiciones aeróbicas, pero en ambos casos SEA es detectada después de 120 minutos de incubación. Se han analizado la combinación de efectos de temperatura y aereación. El crecimiento y la producción de toxinas en cultivos aeróbicos y anaerobios en rangos de temperatura de 14 a 37 °C, muestra que aun a bajas temperaturas *S. aureus* se desarrolla. Lo que da como resultado que las condiciones anaerobias no constituyen una barrera efectiva contra el crecimiento y producción de toxina (Belay y Rasooly, 2002).

La actividad de enterotoxina de *Staphylococcus aureus* (SEA) en alimentos ha sido medida; linfocitos humanos y ratas proliferan en respuesta a concentraciones de SEA de 1pg/ml. Los resultados obtenidos demuestran que el ensayo de proliferación de células *in vitro* es una alternativa novedosa para medir actividad de SEA en alimentos (Rasooly *et al.*, 1997).

Factores limitantes en la sobrevivencia bacteriana

Existen al menos cinco factores que afectan el desarrollo de los microorganismos sobre los productos. Estos incluyen el número y tipo de microorganismo presente, la composición de los alimentos, la temperatura y el pH (Hotchkiss y Banco, 1992; López, 1994). Sin embargo, el pH y la temperatura de almacenamiento son los principales factores que tienen un efecto directo sobre la sobrevivencia de patógenos bacterianos presentes en frutas y hortalizas (NACMCF, 1999).

Composición de frutas y hortalizas

Carbohidratos. Los carbohidratos son generalmente los constituyentes más abundantes después del agua en los frutos. Pueden estar presentes en distintos pesos moleculares, de azúcares simples hasta formar polímeros complejos, los cuales pueden incluir cientos de unidades monoméricas de azúcares. Los carbohidratos pueden ir de 2-40 g/100 g de tejido del fruto, con bajos niveles siendo encontrados en algunas cucurbitáceas como el pepino y altos niveles como en mango (Wills *et al.*, 1998).

Los azúcares principales presentes en frutas y hortalizas son sucrosa, glucosa y fructosa, con variantes dependiendo del tipo de fruto (Cuadro 7). La glucosa y fructosa están presentes en todos los frutos y se encuentran frecuentemente a niveles similares, mientras que la sucrosa esta únicamente presente en dos tercios de los frutos (Wills *et al.*, 1998).

Efecto de los carbohidratos en bacterias. Una célula bacteriana puede ser expuesta a tres tipos de soluciones osmóticas: isotónica, hipotónica e hipertónica. Una solución isotónica es aquella en la cual la concentración total de solutos es el mismo en ambos lados de la membrana. El agua sale y entra de la célula; el contenido celular está en equilibrio con la concentración fuera de la pared celular. Una solución hipotónica es aquella en la que la concentración de solutos fuera de la célula es más baja que la del interior de la célula. Un gran número de bacterias vive en soluciones hipotónicas, y su contenido es retenido por la pared celular. Aquellas células con paredes celulares débiles, tales como las bacterias Gram negativas, tienden a reventar o llegar a lisis osmótica como resultado de una entrada excesiva de agua. Y por último, una solución hipertónica es un medio con una alta concentración de solutos que la que posee la célula bacteriana. Muchas bacterias colocadas en soluciones hipertónicas se plasmolizan por efecto de la pérdida de agua de la célula por osmosis (Tortora *et al.*, 1994)

Se ha encontrado que el rango de muerte de bacterias como *E. coli* O15:H7 es afectado por el tipo y concentración de la fuente de carbono. Así como también que la adición de glucosa en lugar de sucrosa como suplemento de carbono, resulta en un incremento significativo en la pérdida de células viables del patógeno (Spyropoulou *et al.*, 2001).

Cuadro 7. Contenido de azúcar (g/100 g peso fresco) de algunas frutas y hortalizas maduras.

Fruto	Glucosa	Fructosa	Sucrosa
Manzana	3	6	2
Plátano	4	4	10
Naranja	2	2	4
Tomate	1	1	0
Mango	1	3	8

Wills *et al.*, 1998.

Ácidos Orgánicos. La mayoría de las frutas y hortalizas contienen ácidos orgánicos en exceso los cuales son requeridos para el funcionamiento del ciclo de Krebs y otras rutas metabólicas. El limón, lima, la fruta de la pasión frecuentemente contienen más de 3 g de ácido orgánico/100 g. El ácido dominante en los frutos es usualmente el ácido cítrico y el málico (Cuadro 8). Otros ácidos orgánicos que son predominantes en ciertos frutos son el tartárico en uvas, oxálico en espinacas y el isocítrico en moras. Además de su importancia bioquímica, los ácidos orgánicos contribuyen enormemente al sabor, particularmente en frutas (Wills *et al.*, 1998).

Muchas plantas, incluyendo sus semillas y frutos, contienen sustancias antimicrobianas que inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos a las plantas y al hombre. Tal es el caso del arándano que contiene ácido benzoico, el cual es un inhibidor de hongos (Doyle, 1990).

Efecto de los ácidos orgánicos en bacterias. El efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos se ejerce a través de la forma no dissociada y este factor tiene mayor importancia que las condiciones de pH bajos. La forma dissociada de los ácidos, al ser un anión, es altamente polar y por tanto no atraviesa fácilmente la membrana plasmática de los microorganismos. La forma no dissociada de ácido, por el contrario, sí atraviesa la membrana. Una vez en el interior de la bacteria, el ácido puede dissociarse y entonces afecta directamente al pH intracelular bacteriano (Ostling y Lindgren, 1993). Esto puede afectar gravemente su metabolismo, ya que afecta al gradiente de protones y de carga con el exterior, e interfiere con los sistemas de transporte de aminoácidos y fosfatos

(Bearson, *et al.*, 1997). Otra consecuencia negativa de este proceso se debe al aumento de turgor celular. Al producirse la disociación del ácido en el interior de la célula, la concentración interna de aniones va aumentando. Esto a su vez, desencadena un mecanismo de compensación de la carga eléctrica que obliga a la bacteria a aumentar los niveles de Na^+ , K^+ y/o glutamato, lo que lleva a un incremento mayor de la fuerza iónica intracelular y del turgor. Este proceso provoca un gran aumento de la presión mecánica sobre la pared bacteriana, lo que hace que eventualmente se lise (Foster, 1999).

Mossel y De Bruin (1960) mostraron que a valores de pH entre 3.8 – 4.1 el orden de efectividad letal bacteriana de los ácidos orgánicos varía, resultando el ácido láctico el de mayor inhibición, seguido por el acético y con un menor grado los ácidos málico o cítrico. Es reconocido que este tipo de productos metabólicos (ácido acético y láctico) pueden afectar el desarrollo y sobrevivencia de patógenos (Stiles, 1996), pero estos productos pueden también inducir resistencia o tolerancia a los ácidos (Abdul-Raouf *et al.*, 1993; Deng *et al.*, 1999; Buchanan y Edelson, 1999).

Existen otros compuestos que pueden constituir una barrera para el desarrollo de microorganismos. Las purothioninas, presentes en el trigo inhiben el desarrollo de levaduras y algunos patógenos humanos; las anthocianinas y α -tomatina tienen un efecto adverso contra especies bacterianas y fúngicas (Doyle, 1990).

Cuadro 8. Frutas y hortalizas en los cuales el ácido cítrico y málico es el principal ácido orgánico

CÍTRICO	MÁLICO
Tomate	Pepino
Mango	Melón
Pera	Manzana
Papa	Plátano
Fresa	Brócoli
Piña	Zanahoria
Cirucla	Lechuga

Wills *et al.*, 1998.

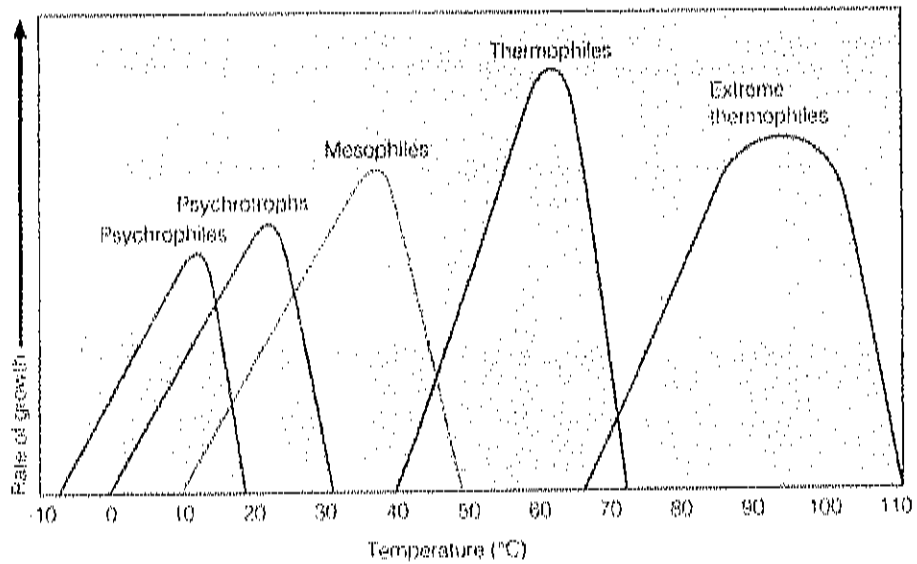
Temperatura

Las especies microbianas varían en sus fluctuaciones de temperatura óptima para su desarrollo (Brooks *et al.*, 1999).

Los microorganismos son divididos en tres grupos basados en el rango óptimo de temperatura para su crecimiento: psicrófilos, mesófilos y termófilos. Algunos de estos grupos primarios pueden ser subdivididos (Figura 3). Cada especie bacteriana se desarrolla a una temperatura mínima, óptima y máxima en particular. La mínima de crecimiento es la más baja a la cual las especies crecen. La temperatura óptima de crecimiento es aquella a la cual las especies tienen un mejor desarrollo (Tortora *et al.*, 1994).

Los organismos psicrófilos son organismos considerados capaces de desarrollarse desde 0°C hasta 20°C; mientras que los termófilos tienen un crecimiento entre 40 y 70°C. Por último los mesófilos, con un rango de desarrollo óptimo entre 10 y 50°C, son el tipo más común de microorganismos. Este grupo incluye la mayoría de las bacterias responsables de intoxicaciones e infecciones (Tortora *et al.*, 1994).

Figura 3. Rango de crecimiento de diferentes tipos de microorganismos en respuesta a la temperatura.



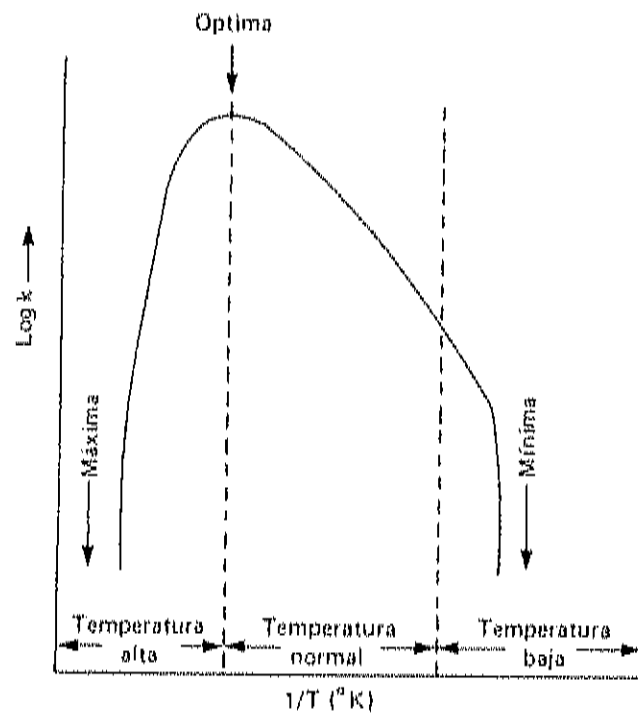
Tortora *et al.*, 1994.

Efecto de la temperatura en bacterias. La temperatura es uno de los factores más importantes que afecta el crecimiento y sobrevivencia microbiana (Bitton, 1994).

Las condiciones de almacenamiento son un factor primario en el control del crecimiento de microorganismos en frutas y hortalizas mínimamente procesadas. En general, el almacenamiento en frío disminuye el crecimiento de la mayoría de las bacterias (Brackett, 1987); sin embargo, es importante mencionar que las bacterias pueden crecer, aunque lentamente, en refrigeración (Knabel, 2002).

El límite de temperatura tolerado por cualquier especie se correlaciona con la estabilidad térmica general de las proteínas de dicha especie. La relación de la velocidad de crecimiento con la temperatura, se muestra en la figura 4. Esta muestra que el logaritmo de la velocidad de cualquier reacción química ($\log K$) es una función lineal de la recíproca de la temperatura ($1/T$); puesto que el crecimiento de las células es el resultado de un conjunto de reacciones químicas, es de esperar que muestre esta relación (Brooks *et al.*, 1999).

Figura 4. Desarrollo bacteriano mediado por la temperatura.



Brooks *et al.*, 1999.

En ocasiones la temperatura y presión fisiológica de los organismos es demasiado baja para que las reacciones químicas ocurran lo suficientemente rápido para mantener la vida del organismo; si esta y la presión se incrementan, la coalición y el rango de reacciones químicas también. Sin embargo, tales cambios podrían dañar o matar al microorganismo (Tortora *et al.*, 1994).

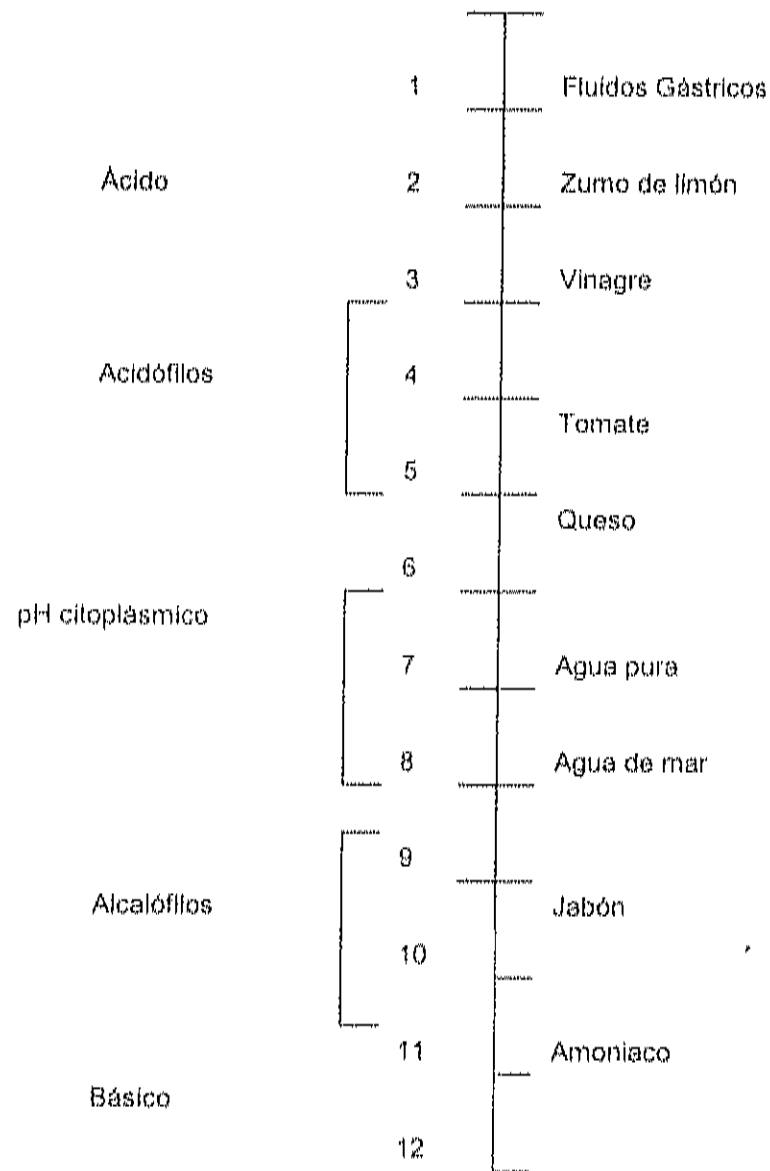
El rango de muchas reacciones químicas incrementa a medida que la temperatura se eleva. Las moléculas se mueven más lentamente a temperaturas bajas que en altas, lo cual podría no ser suficiente energía para causar una reacción química. Para una reacción enzimática, la elevación más allá de la temperatura óptima reduce drásticamente la velocidad de la reacción. Este decremento es debido a la desnaturalización de las proteínas, la pérdida de la característica estructura tridimensional. La desnaturalización de las proteínas envuelve el rompimiento de los enlaces de hidrógeno y otros enlaces no covalentes. La desnaturalización de una enzima cambia el arreglo de los aminoácidos en el sitio de acción, alterando su forma y causando que la enzima pierda su habilidad catalítica. En algunos casos, la desnaturalización es parcial o totalmente reversible. Sin embargo, si la desnaturalización continua hasta que la enzima ha perdido su solubilidad y coagula, la enzima no puede volver a sus propiedades originales (Tortora *et al.*, 1994).

pH

La mayor parte de los microorganismos tienen un rango de desarrollo en ambientes de acidez bastante estrechos. Deben determinarse empíricamente las condiciones óptimas para cada especie. Casi todos los neutrófilos crecen mejor en un pH de 6.0 a 8.0, aunque algunos acidófilos se desarrollan en niveles tan bajos como 3.0 y otros (alcalófilos) tan alto como 10.5. El pH interno de las células es regulado por un conjunto de sistemas de transporte de protones en la membrana citoplásmica, incluyendo una bomba primaria de protones manejada por el ATP y un intercambiador de Na^+/H^+ . (Brooks *et al.*, 1999).

Todos los microorganismos tienen un pH óptimo de crecimiento y un intervalo fuera del mismo donde les resulta imposible proliferar. Esto se refiere al pH del medio o extracelular, ya que el intracelular debe estar necesariamente cerca de la neutralidad, incluso el de los organismos que crecen mejor a pHs ácidos. La mayoría de las bacterias crecen deficientemente en valores inferiores a 5.0, pero este nivel de acidez no garantiza, naturalmente, la esterilidad microbiológica: muchas bacterias pueden sobrevivir en estas condiciones durante periodos prolongados de tiempo. La figura 5 muestra algunos pHs extracelulares típicos de ambientes naturales (Madigan, 1997).

Figura 5. pH extracelulares de distintos ambientes.



Madigan, 1997.

La mayoría de las enzimas alcanzan su actividad máxima a un pH óptimo. Por encima o por debajo de este valor, la actividad enzimática disminuye (Tortora *et al.*, 1994). Muchas enzimas esenciales para el metabolismo microbiano se inactivan a pHs ácidos (Bearson, 1997). Cuando la concentración H^+ en el medio cambia, los aminoácidos componentes de las enzimas son afectados. Cambios extremos en pH pueden causar desnaturalización (Tortora *et al.*, 1994).

Goverd *et al.* (1979) estudiaron la influencia de la temperatura y el pH en la sobrevivencia de *S. typhimurium* y otros serotipos de *Salmonella* en jugo de manzana, mostrando que *Salmonella* puede sobrevivir en jugo de manzana a pH 3.6 durante 30 días a 4°C. Mossel y De Bruin (1960) concluyeron que aquellos jugos de frutas con un pH mayor a 3 deben ser considerados como una fuente potencial para el desarrollo de bacterias patógenas.

Generalidades de los frutos en estudio

Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

El tomate es nativo de América del Sur. Es cultivado en varios estados de la Unión Americana. En México, América Central y América del Sur el cultivo de este producto es intenso (Hartmann *et al.*, 1981). Es un fruto perteneciente a la familia Solanácea. El ácido cítrico se encuentra en un 0.48% (Cuadro 9). El pH varía entre 4 – 4.6 con un 95% de agua (Cantwell, 1994).

Cuadro 9. Valor nutritivo del tomate.

Componente	g/100 g
Ácido Cítrico	0.48
Carbohidratos	4.3
Proteínas	0.6
Vitamina C	18
Vitamina A	507
Hierro	0.5
Magnesio	11
Sodio	8
Potasio	207
Calcio	7.0
Fósforo	20

Muñoz y Chávez, 1996.

Pepino (*Cucumis sativus* L.)

El pepino es nativo de Asia, ha sido cultivado para su consumo desde hace 3,000 años. Este fruto es perteneciente a la familia Cucurbitácea. El ácido predominante en este fruto es el ácido málico. Tiene un pH de 5.5. Posee un 95% de agua (Cuadro 10). Los pepinos se cosechan en un estado ligeramente inmaduro, próximos a su tamaño final, pero antes de que las semillas completen su crecimiento y se endurezcan. Los pepinos son generalmente consumidos en ensaladas o curtidos. La calidad del pepino de mesa o para rebanar se basa principalmente en la uniformidad de forma, en la firmeza y en el color verde oscuro de la piel (Suslow *et al.*, 2002).

Cuadro 10. Valor nutritivo del pepino.

Componente	g/100 g
Ácido málico	0.32
Carbohidratos	2.9
Proteínas	0.5
Ácido ascórbico	4.7
Vitamina A	45
Hierro	0.3
Sodio	2
Potasio	149
Calcio	14
Fósforo	17

Musmade y Desai, 1998.

Melón (*Cucumis melo* L.)

Todas las variedades de melón surgieron en Irán y la región transcaucásica, de donde pasaron a las antiguas civilizaciones egipcia, griega y romana (Encarta, 2001). Este fruto es miembro de la familia Cucurbitácea. Posee un 90% de agua (Cuadro 11). El ácido málico es el ácido orgánico principal. Tiene un pH entre 5.5 ~ 6. Los cantaloupe se cosechan por madurez y no por tamaño. Idealmente, la madurez comercial corresponde al estado firme-maduro o "3/4 desprendido". Los melones cantaloupe maduran después de la cosecha pero su contenido de azúcar no aumenta (Suslow *et al.*,2002).

Cuadro 11. Valor nutritivo del melón.

Componente	g/100 g
Ácido málico	
Carbohidratos	11.4
Proteínas	0.5
Ácido ascórbico	3.1
Vitamina A	50
Hierro	0.8
Sodio	1.2
Potasio	33.8
Calcio	7.5
Fósforo	12.5

USDA, 1998.

Mango (*Mangifera indica* L.)

Este fruto es miembro de la familia Anacardiácea. El ácido cítrico es el principal ácido orgánico encontrado en él. Un 83% está constituido por agua.

Alcanza el 20% su contenido en azúcares (Cuadro 12). Tiene un pH de 4 (Encarta, 2001).

Los índices de calidad de este fruto incluyen, uniformidad en la forma y tamaño; color de la piel; suave y firme. Cambios asociados con su madurez incluyen la conversión del almidón en azúcares, descenso de la acidez y un incremento en carotenoides y compuestos volátiles (Kader, 2002). Los principales azúcares libres presentes en mango son glucosa, fructosa y sucrosa, mientras que la xilosa y arabinosa han sido detectadas en pequeñas cantidades durante los diferentes estados de madurez del fruto (Nagy y Shaw, 1980).

Cuadro 12. Valor nutritivo del mango.

Componente	g/100 g
Ácido cítrico	0.327
Carbohidratos	15
Proteínas	0.5
Ácido ascórbico	3
Hierro	0.5
Calcio	10

Mata y Mosqueda, 1998.

MATERIALES Y MÉTODOS

Frutos

Los frutos de tomate, pepino, melón y mango, libres de daños fueron seleccionados y adquiridos de un supermercado de la localidad. Las muestras se transportaron al Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) para su análisis.

Preparación de los frutos

En el laboratorio los frutos fueron lavados con agua potable y desinfectados con una solución de 100 ppm de yodo. A los frutos se les retiró la cáscara con navajas estériles, y fueron cortados en cubos (2 cm³).

Medios de Cultivo

Se adquirieron de manera comercial y se prepararon de acuerdo a las especificaciones proporcionadas por el distribuidor.

Agar mFC (Difco, Detroit, MI)

Se pesaron 52 gramos en una balanza Sartorius y se disolvieron en 1 litro de agua purificada. Se calentó agitando frecuentemente e hirvió durante 1 minuto para lograr una homogenización completa. Se agregaron 10 mL de una solución 1% de ácido rosólico en 0.2 N NaOH. Se siguió calentado durante 1 minuto. No se necesita esterilizar. Se dejó enfriar y se procedió a vaciar el medio en cajas de petri estériles.

Agar Sal y Manitol (Bioxon, Estado de México)

Se agregaron 111 gramos del polvo en 1 litro de agua purificada. Se agitó frecuentemente con calentamiento constante hasta llegar a ebullición durante 1 minuto. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Finalmente se dejó enfriar y se procedió a verter el medio en cajas petri estériles.

Caldo de Soya Tripticaseina (Bioxon, Estado de México)

Se suspendieron 30 gramos del polvo en 1 litro de agua purificada. Se calentó y agitó frecuentemente hasta obtener una disolución completa. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

Microorganismos

Controles positivos de *Escherichia coli* ATCC 15597 y *Staphylococcus aureus* fueron obtenidos del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de Arizona a cargo del Dr. Charles P. Gerba.

Regeneración Bacteriana

Una colonia aislada de las cepas bacterianas fueron transferidas e inoculadas por separado (Pao y Davis, 1999) en 5 mL de caldo TSB (Trypticasein Soy Broth) el cual se incubó durante 24 horas a 37°C, en incubadora (VWR 3015), transcurrido el tiempo, se tomó 1 mL de esta suspensión bacteriana y se agregó en un matraz Erlenmeyer con 50 mL de TSB, dejando transcurrir 24 horas a 37°C, el caldo de cultivo se colocó en tubos de centrifuga esterilizados, se centrifugó en una centrifuga (Beckman J2-MI), a 10000 RPM, a 4°C, durante 10 minutos, el pellet resultante se lavó en dos ocasiones con 15 mL de solución buffer de fosfato (KH₂PO₄ pH 7.2) estéril agitando vigorosamente con un

agitador vortex (Scientific Products) hasta obtener una solución homogénea. Este proceso se repitió en dos ocasiones (Abbaszadegan *et al.*, 1997). La solución Buffer se preparó disolviendo 13.6 gramos de KH_2PO_4 en un litro de agua estéril, se ajustó a pH 7.2 con NaOH 0.1 N y se hizo pasar a través de una membrana millipore de 0.45 μm , El pellet obtenido finalmente se suspendió en 450 mL de solución Buffer, recuperando así las bacterias purificadas de la cual se alcanzó una concentración de 10^8 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL).

Inoculación bacteriana

Se utilizó la metodología establecida por Ukuku y Sapers (2001), para lo cual una vez obtenida la purificación de ambas bacterias, estas se disolvieron por separado en 450 mL de solución Buffer obteniendo una concentración de 10^6 UFC/mL. Los cubos de fruto fueron inoculados al sumergirlos en la suspensión bacteriana dejando transcurrir 10 minutos.

Posterior a la inoculación, los cubos de tomate, pepino, melón y mango se colocaron por separado en bolsas estériles de plástico en grupos de tres cubos; se almacenaron a temperatura ambiente (25°C) y de refrigeración (4°C). Los 4 frutos almacenados con *E. coli* y *S. aureus*, a 2 temperaturas durante 8 tiempos, da un resultado de 128 tratamientos; tomando en cuenta que cada tratamiento se llevó a cabo tres veces, en total se realizaron 384 réplicas.

Análisis de sobrevivencia

El análisis se realizó en intervalos de tiempo de 0, 0.5, 1, 3, 24, 48, 72 y 96 horas, después de la inoculación bacteriana. Los cubos inoculados se separaron y transfirieron a bolsas estériles las cuales contenían 15 mL de solución buffer estéril, se tomaron 300 μ L y se procedió a realizar diluciones. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Para el conteo de colonias se utilizó la técnica de enumeración por el método de extensión en placa (APHA, 1998), de la manera siguiente:

Se prepararon medios de cultivo mFC y Sal y Manitol para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Se realizaron diluciones hasta obtener la adecuada para la contabilización de colonias. Se transfirió 100 μ L de cada una de las diluciones en las cajas de petri conteniendo el agar selectivo correspondiente (Cuadro 13). Con la varilla de vidrio previamente esterilizadas se procedió a extender la muestra homogéneamente sobre el medio de cultivo. Las cajas petri se incubaron a 44.5°C y 37°C durante 24 horas para el desarrollo de *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. Una vez transcurrido el tiempo se realizó el conteo de colonias y el cálculo de acuerdo a la dilución efectuada.

Cuadro 13. Medios de cultivo y técnicas de laboratorio utilizadas para los diferentes microorganismos.

Microorganismo	Medio de Cultivo	Técnica
<i>Escherichia coli</i>	Agar Mfc	Extensión en placa
<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar Sal y Manitol	Extensión en placa
<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	TSB	Crecimiento Bacteriano

Análisis Estadístico

Se realizó un diseño de parcelas divididas para cada una de las bacterias en estudio (Montgomery, 1991) definiendo como:

- Bloque: Fruto (F)
- Parcela: Temperatura (T)
- Subparcela: Tiempo (Ti)

El modelo estadístico correspondiente es:

$$Y = \mu + F + T + TF + Ti + TTi + FTTi$$

Donde: Y = Observación

μ = Media

F = Efecto del factor fruto

T = Efecto del factor temperatura

TF = Error de la parcela

TTi = Efecto interacción Temperatura - Tiempo

FTTi = Error de la subparcela

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el paquete estadístico Minitab, Versión 13.1 para Windows 1998.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio en frutos de tomate, pepino, melón y mango mínimamente procesados muestran que *S. aureus* y *E. coli* son bacterias capaces de sobrevivir en este tipo de productos a temperatura ambiente (25°C) y de refrigeración (4°C).

El análisis de resultados se presenta para cada una de las bacterias en estudio, discutiendo efectos principales e interacciones significativas.

Análisis de Varianza

Efectos principales para *Escherichia coli*. La tabla ANOVA de *Escherichia coli* (cuadro 14) muestra que el efecto principal del factor tiempo resultó significativo ($p = 0.001$). La temperatura y frutos resultaron tratamientos no significativos.

A lo largo del tiempo (Figura 6), los resultados mostraron que la concentración bacteriana presentó un decremento apreciable.

Mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$) se encontraron diferencias significativas en los tiempos, las cuales se muestran a continuación:

$$\overline{y_7} \quad \overline{y_6} \quad \overline{y_5} \quad \overline{y_4} \quad \overline{y_3} \quad \overline{y_2} \quad \overline{y_1} \quad \overline{y_0}$$

Medias bajo la misma línea, no presentan diferencia significativa; medias bajo distintas líneas, resultaron estadísticamente diferentes.

Figura 6. Efectos principales: fruto, temperatura y tiempo, en la sobrevivencia de *Escherichia coli*.

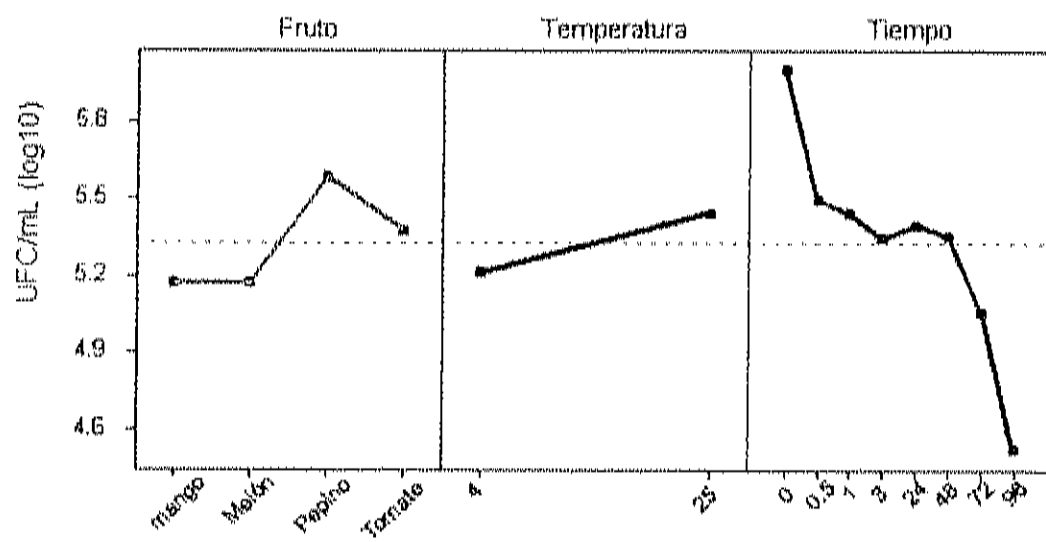
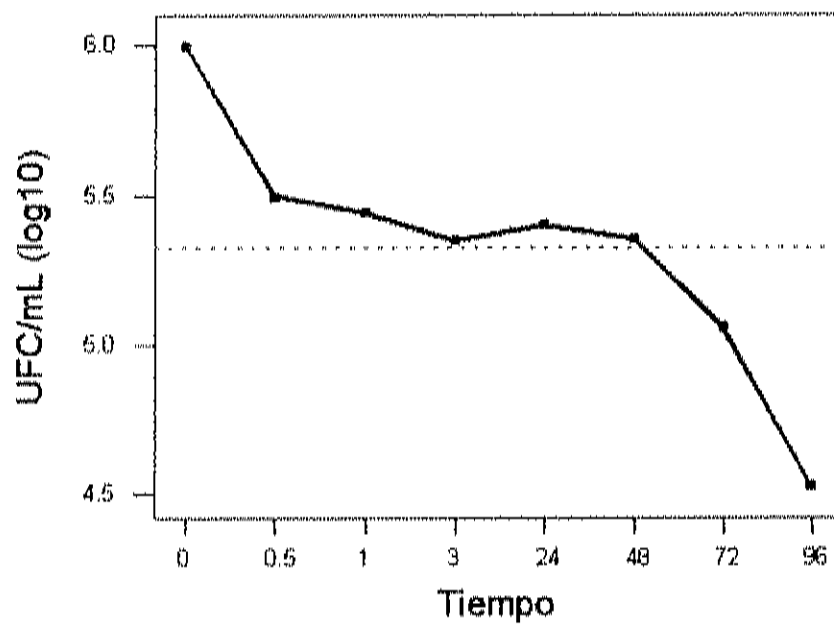


Figura 7. Perfil de sobrevivencia de *Escherichia coli*.



Efecto de Interacciones para *Escherichia coli*. El efecto de las interacciones dobles Fruto - Temperatura y Temperatura - Tiempo, se encontraron estadísticamente significativas.

Interacción Fruto - Temperatura. Observamos a 25 °C (Figura 8) que frutas y hortalizas presentaron diferencia significativa en la sobrevivencia bacteriana, encontrando que las hortalizas tienen un mayor desarrollo bacteriano, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Viswanathan *et al.* (2001), quienes reportaron un mayor desarrollo en hortalizas en un estudio, donde se evaluó la prevalencia y crecimiento de *E. coli* en ensalada de vegetales, frutas y germinados. Estudios similares revelaron que *E. coli* O157:H7 creció en rodajas de melón y sandía almacenados bajo humedad relativa alta a 25 °C de 14 a 22 días (del Rosario *et al.*, 1995). Richert *et al.* (2000), encontraron que las concentraciones de *E. coli* O157:H7 no cambiaron en brócoli, pepino y pimiento verde inoculados y almacenados a 15 °C durante 7 días. La alta concentración de azúcares en las frutas podría ser la causa del menor desarrollo bacteriano, tal como lo señalan Spyropoulou *et al.* (2001), los cuales concluyen que el rango de muerte es afectado por el tipo y concentración de solutos. No hubo diferencia significativa entre hortalizas, al igual que entre frutas.

Melón Mango Tomate Pepino

A. 4 °C de temperatura de almacenamiento la sobrevivencia en los distintos frutos no fue estadísticamente significativa (Figura 8).

Interacción Temperatura - Tiempo. Para la interacción doble Temperatura – Tiempo (Figura 9) el desarrollo bacteriano a 25 °C presentó un máximo a las 24 horas, a partir del cual el crecimiento disminuyó constantemente, y para las 96 horas la concentración alcanzó 4 log₁₀. Las concentraciones bacterianas encontradas en los frutos a 4 °C variaron de 5.8 log₁₀ a 4.6 log₁₀, donde a partir del tiempo 0 a las 24 horas la sobrevivencia fue en declive, presentándose al tiempo 5 (48 horas) un ligero incremento, para posteriormente los dos últimos tiempos, 6 (72 horas) y 7 (96 horas) mantenerse en valores similares. En general la temperatura de almacenamiento de 25 °C presentó un desarrollo promedio de 5.18 log₁₀, mientras que a 4 °C se obtuvieron 4.95 log₁₀.

Los resultados obtenidos en la sobrevivencia de *E. coli* a temperatura de almacenamiento a 4 °C, concuerdan con los reportados por Abdul-Raouf *et al.* (1993), donde no obtuvieron disminución significativa en la concentración, cuando la bacteria fue inoculada en carne y almacenada por 72 horas a 5 °C. McIngvale *et al.* (2000), señalan que la temperatura de almacenamiento a 5 y 12 °C no tiene un efecto aparente en la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7. Knudsen *et al.* (2001), observaron una mayor sobrevivencia de *E. coli* en rebanadas de fresas que en el fruto completo cuando fueron refrigeradas, por lo tanto los resultados de esta investigación coinciden con los obtenidos

por ellos, ya que al término del estudio la concentración de *E. coli* fue mayor a 4 °C que a 25 °C.

Figura 8. Interacción Fruto-Temperatura en *Escherichia coli*.

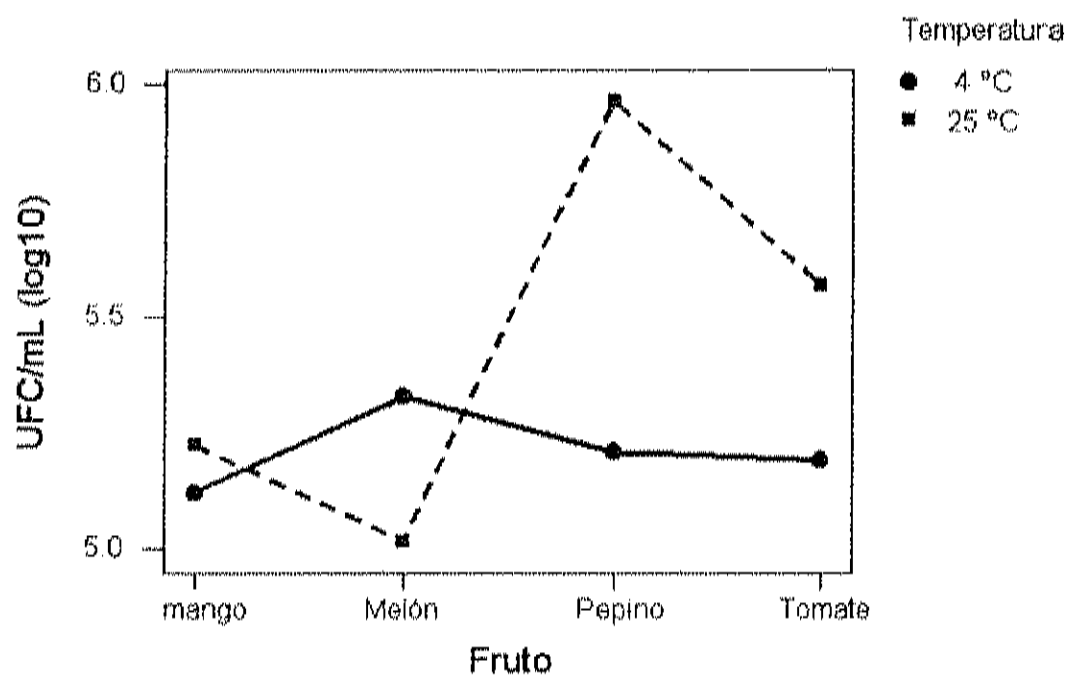
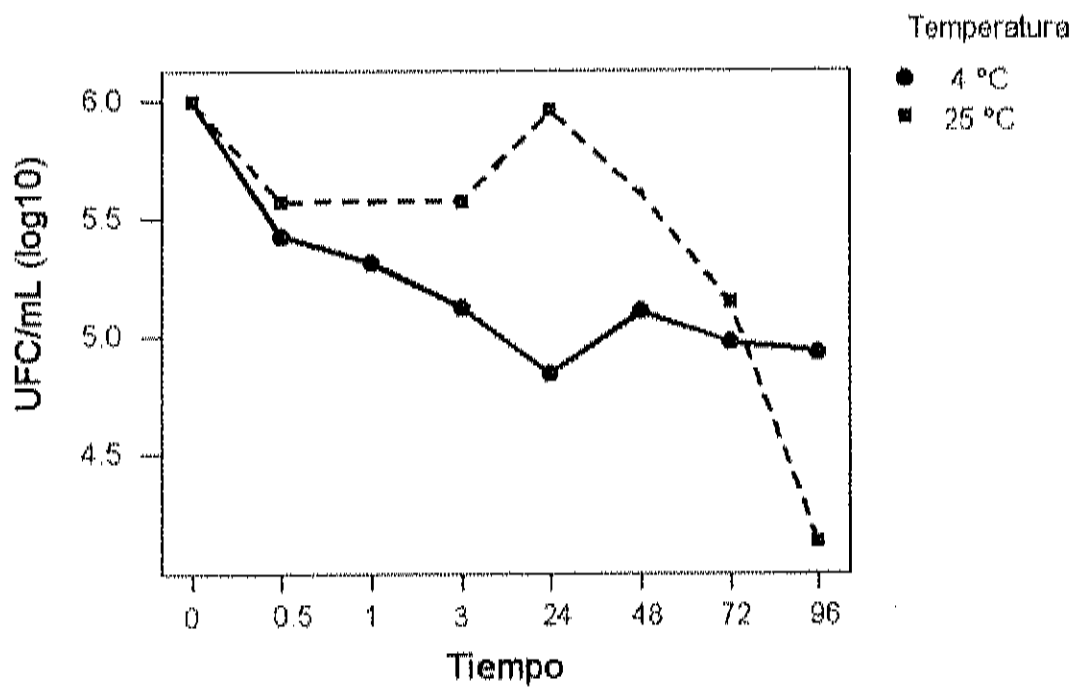


Figura 9. Efecto de la interacción Temperatura – Tiempo en la sobrevivencia de *Escherichia coli*



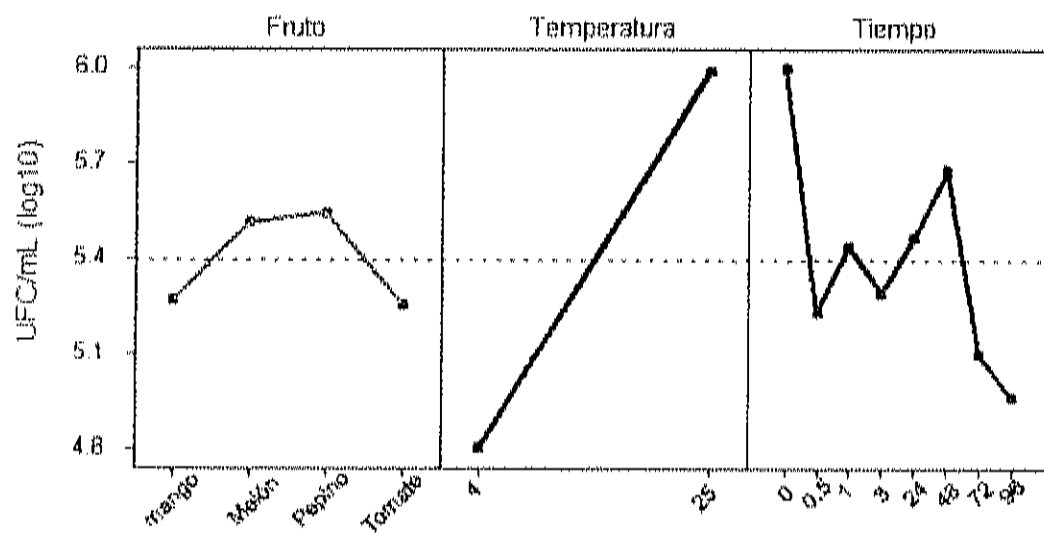
Cuadro 14. ANOVA de *Escherichia coli*.

Fuente	Grados de Libertad	CM	Adj MS	F	p
F	3	8.2371	2.7457	0.68	0.620
T	1	4.1733	4.1733	1.04	0.384
F*T (Error de la Parcela)	3	12.0947	4.0316	12.53	
Ti	7	25.8708	3.6958	5.85	0.001
T*Ti	7	12.0724	1.7246		0.001
Error	170	50.1496	0.2950		
Total	191	112.60			

Efectos principales para *Staphylococcus aureus*. El ANOVA muestra que la mayor variabilidad observada entre tratamientos fue debida al efecto de los factores temperatura y tiempo (Cuadro 15).

De acuerdo a la gráfica de efectos principales el desarrollo bacteriano entre los distintos frutos no presentó diferencias significativas (Figura 10). La temperatura de almacenamiento a 25 °C presentó concentraciones bacterianas mayores en comparación con 4 °C donde se observó una concentración muy por debajo de la registrada a temperatura ambiente. En lo que respecta al factor tiempo, resultó un factor causante de variabilidad en la sobrevivencia de *S. aureus*, resultando estadísticamente significativo.

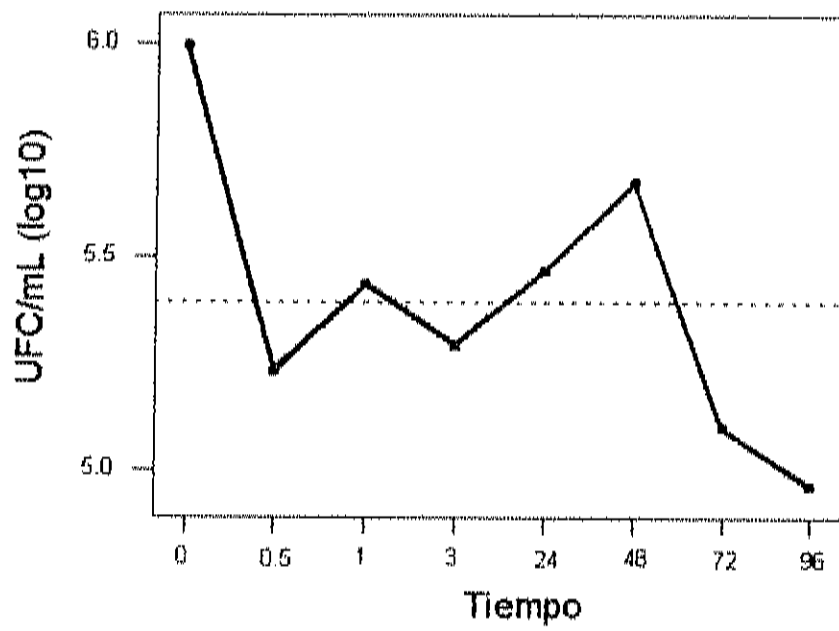
Figura 10. Efectos principales: fruto, temperatura y tiempo para *Staphylococcus aureus*.



Efecto del factor tiempo en *Staphylococcus aureus*. Los resultados del factor tiempo en la sobrevivencia de *S. aureus* revelan que no se observaron diferencias significativas de 0 min. a las 24 horas presentándose concentraciones máximas de $5.46 \log_{10}$ y mínimas de $5.22 \log_{10}$. En el tiempo de 48 horas se registró un incremento de $0.21 \log_{10}$ con respecto al tiempo inicial, resultando estadísticamente diferente a los tiempos de 3 horas, 72 horas y 96 horas únicamente. A partir de este último tiempo se obtuvo una reducción de $0.72 \log_{10}$ al finalizar el análisis (Figura 11).

y_5	y_4	y_0	y_2	y_3	y_1	y_6	y_7
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Figura 11. Perfil de sobrevivencia de *Staphylococcus aureus*.



Efecto de las interacciones en la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus*. Resultaron estadísticamente significativas las interacciones F*T y T*Ti.

Interacción Fruto - Temperatura. El desarrollo bacteriano de *S. aureus* fue superior en hortalizas que en frutas en la temperatura de almacenamiento a 25 °C (Figura 12), sin embargo, la concentraciones registradas en melón con 5.81 log₁₀ y pepino con 6.16 log₁₀ no fueron diferentes estadísticamente.

Mango Melón Pepino Tomate

El almacenamiento a 4 °C, resultó en un desarrollo superior de *S. aureus* en melón 5.07 log₁₀ y mango 4.91 log₁₀ que en hortalizas, aunque pepino con 4.76 log₁₀ no resultó estadísticamente diferente a frutas. Tomate fue el único fruto que presentó diferencia con respecto al resto de los frutos, con un desarrollo de 4.11 log₁₀.

Tomate Pepino Mango Melón

El desarrollo de *Staphylococcus aureus* fue constante de manera general en los frutos, en este caso no se observó una inhibición en frutas, esto se debe a que *S. aureus* tiene la capacidad de desarrollarse en medios con una alta concentración de solutos.

Interacción Temperatura - Tiempo. En la interacción tiempo-temperatura *S. aureus* presentó a lo largo del tiempo en almacenamiento a 25 °C una concentración constante

en los primeros 4 tiempos, seguido de un desarrollo de $1.4 \log_{10}$ superior a la concentración inicial al tiempo 5, manteniéndose así, en niveles inferiores al anterior pero superiores a la concentración inoculada hasta el final del estudio. En temperatura de 4°C no se presentaron diferencias significativas en los primeros cinco tiempos lo que da como resultado que el desarrollo de *S. aureus* en esta condición de almacenamiento fue el mismo a lo largo del tiempo, encontrándose disminuciones únicamente en los tres últimos tiempos que corresponden a las 48, 72 y 96 horas de almacenamiento, ya que de una concentración de $5.37 \log_{10}$ a partir de los 30 min. hubo una reducción de $1.34 \log_{10}$ a las 72 horas (Figura 13).

En general el desarrollo promedio de *S. aureus* a 25°C fue de $5.98 \log_{10}$ y a 4°C de $4.8 \log_{10}$.

La sobrevivencia de *S. aureus* fue mayor a 25°C que la observada a 4°C , ya que la concentración final a 25°C sobrepasó la observada en los primeros cuatro tiempos de la investigación, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Goverd *et al.* (1979), quienes concluyeron que la sobrevivencia de *Salmonella spp* en jugo de manzana fue mayor a 22°C que a 4°C .

Figura 12. Efecto de la interacción Fruto – Temperatura en *Staphylococcus aureus*.

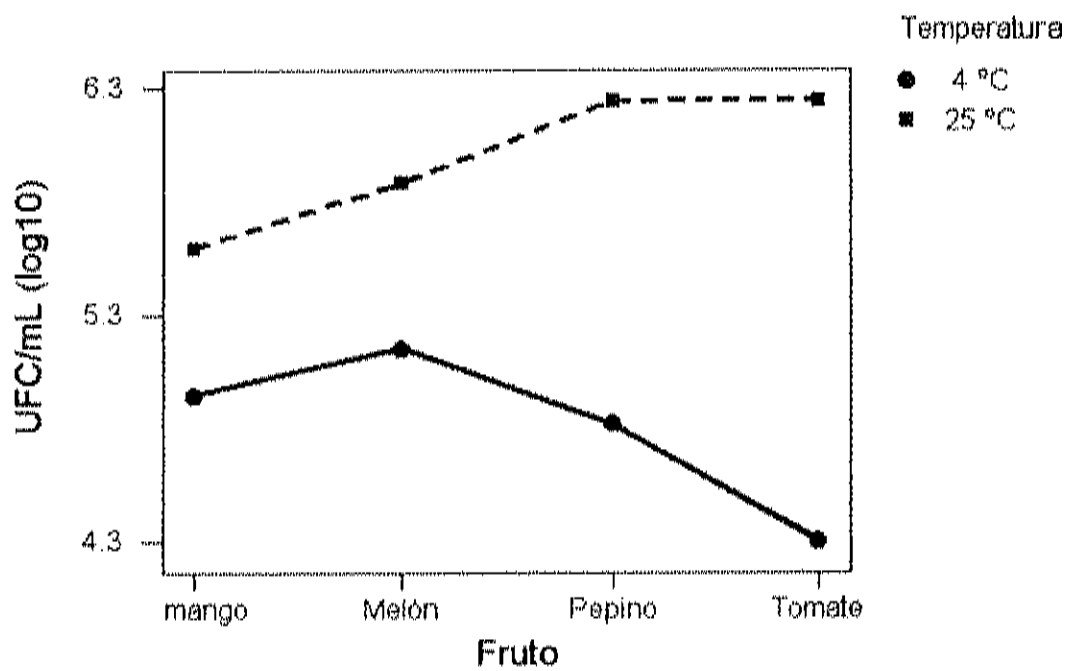
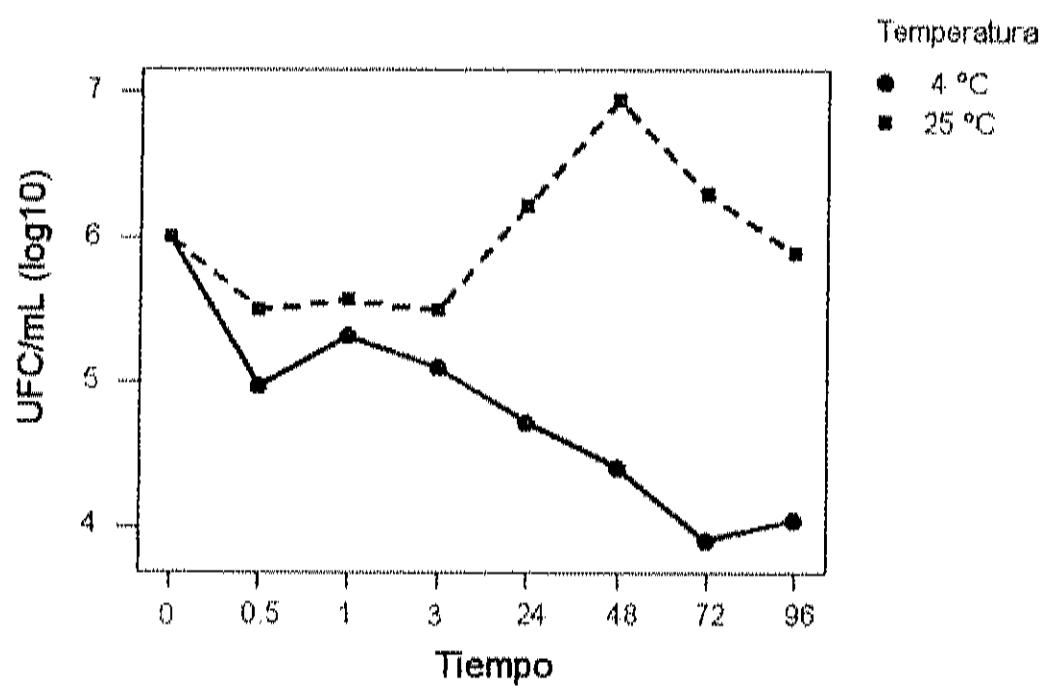


Figura 13. Efecto de la interacción Temperatura – Tiempo en *Staphylococcus aureus*.



Cuadro 15. ANOVA de *Staphylococcus aureus*.

Fuente	Grados de libertad	SC	CM	F	P
F	3	3.3457	1.1152	0.18	0.903
T	1	70.3615	70.3615	11.46	0.043
F*T (Error de la Parcela)	3	18.4193	6.1398		
Ti	7	8.5473	1.2210	5.62	0.001
T*Ti	7	40.5374	5.7911	26.67	0.001
Error	170	36.9173	0.2172		
Total	191	178.1286			

CONCLUSIONES

La temperatura de almacenamiento a 25 °C presentó una mayor sobrevivencia en ambas bacterias.

Ambas bacterias se desarrollan en los frutos mínimamente procesados, sin embargo, el mayor desarrollo se presentó en frutos de tomate y pepino.

El desarrollo *Escherichia coli* no es inhibido por la temperatura de refrigeración, la cual de manera natural limita el desarrollo de la mayoría de las bacterias.

Staphylococcus aureus presentó un mayor desarrollo a lo largo del tiempo lo cual se concluye que tenga una mayor capacidad de sobrevivencia que *Escherichia coli*.

Los frutos mínimamente procesados proporcionaron condiciones tales como pH y fuente de carbono, los cuales favorecieron la sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

SUGERENCIAS

Es prioritario prevenir la contaminación microbiana de frutas y hortalizas, por encima de tomar acciones para reducir la contaminación una vez que ésta se ha dado.

A medida que se desarrollan nuevos alimentos, tales como alimentos mínimamente procesados, es útil proporcionar información basada en los principios de HACCP sobre la importancia de la refrigeración y otras prácticas de manejo de alimentos, con el propósito de minimizar el riesgo a la salud.

Deben tomarse precauciones para prevenir la contaminación de ensaladas o productos mínimamente procesados durante la preparación de los mismos en hogares o restaurantes ya que una vez contaminados los alimentos, la temperatura de refrigeración no constituyen una limitante en el desarrollo y sobrevivencia de éstos patógenos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbaszadegan, M., Hasan, N.M., Gerba, P.C., Roessle, F.P., Wilson, R.B., Kuennen, R., Dellen, V.E. 1997. The Disinfection efficacy of a point-of-use water treatment system against bacterial, viral and protozoan waterborne pathogens. *Water Research*. **31**: 574-582.
- Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R., Amman, M.S. 1993. Survival and Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Ground, Roasted Beef as Affected by pH, Acidulants and Temperature. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**: 2364-2368.
- American Public Health Association. American Water Works Association and Water Environmental Federation. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Ed.
- Bearson, S. 1997. *FEMS Microbiology Letters*. **147**: 173-180.
- Belay, N., Rasooly, A. 2002. *Staphylococcus aureus* Growth and Enterotoxin A Production in an Anaerobic Environment. *Journal of Food Protection*. **65**: 199-204.
- Bergdoll, S.M. 1990. Staphylococcal Food Poisoning, p. 85-105. *En D. O. Cliver* (ed.), Foodborne diseases.
- Beuchat, L.R. 1996. Pathogenic Microorganisms Associated with Fresh Produce. *Journal of Food Protection*. **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.
- Bitton, G. 1994. Wastewater Microbiology. Gainesville, Florida. Wiley-Liss. 478 pp.
- Brackett, E.R. 1987. Microbiological consequences of minimally processed fruits and vegetables. *Journal of Food Safety*. **10**: 195-206.
- Brooks, F., Morse, A., Butel, S. 1999. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. México, D.F. Manual Moderno.
- Buchanan, R.L y Edelson, S.G. 1999. pH-dependent Stationary-phase Resistance Response of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of Various Acidulants. *Journal of Food Protection*. **62**: 211-218.
- Cantwell, M. 1994. Management of Ripening Fruits. 27-28.
- Carrera, V.J., Márquez, R.H., Castro, D.A., Danilo, M.J. 2000. Análisis de las enfermedades transmitidas por alimentos, 1980-1998. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. **38**: 167-174.
- Castro, R.J y Escartin, F.E. 2000. Survival and Growth of *Vibrio cholerae* 01, *Salmonella typhi*, and *Escherichia coli* O157:H7 in Alfalfa Sprouts. *Journal of Food Science*. **65**: 162-165.
- Center for Disease Control and Prevention. 1995. Surveillance for outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection.

- Center for Disease Control and Prevention. 2000. Division of Bacterial and Mycotic Diseases.
- Chaidez, C. 2002. Inocuidad de Frutas y Hortalizas Frescas: Efectos del Agua Contaminada. *Agua Latinoamérica*. **2**: 36-39.
- Cliver, D.O. 2001. Perspectives from a Review of Selected Case Histories of Microbiological Problems with Imported Produce. *Food Safety Magazine*. **7**: 33-34.
- Conner, E.D y Kotrola, S.J. 1995. Growth and Survival of *Escherichia coli* O157:H7 under Acidic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**: 382-385.
- del Rosario, A.B y Beuchat, R.L. 1995. Survival and Growth of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Cantaloupe and Watermelon. *Journal of Food Protection*. **58**:105-107.
- Deng, Y., Ryu, J.H., Beuchat, L.R. 1999. Tolerant of Acid-Adapted and Non-Adapted *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*. **86**: 203-210.
- Díaz-Sobac, R. y Vernon-Carter, J. 1999. Inocuidad Microbiológica de Frutas Frescas y Mínimamente Procesadas. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. **2**: 133-136.
- Doyle, P.M. 1990. Fruit and Vegetables Safety. Microbiological Considerations. *HortScience*. **25**: 1478-1481.
- Doyle, P.M., Beuchat, R.L., Montville, J.T. 1997. *Food Microbiology*. p. 767.

- Doyle, P.M., Zhao, T., Meng, J., Zhao, S. 1997. *Escherichia coli*. p. 171-191. En P.M. Doyle, L.R. Beuchat y T.J. Montville (ed.), *Food Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Enriquez, E., Enriquez, E.V., Gerba P. 1997. Reduction of Bacterial Contamination in the Household Kitchen Environment through the Use of Self-Disinfecting Sponges. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*. 17: 550-554.
- Enciclopedia Microsoft Encarta 2001.
- FAO/CONACYT, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. 2001. Fortalecimiento de los comités nacionales del codex y aplicación de las normas del codex alimentarius. San Salvador, El Salvador.
- Feachmen, R., Bradley, D., Garelick, H., Mara, D. 1983. Sanitation and disease: Health aspects of excreta and wastewater management. New York. 501 p.
- Fernández, E. E., Castillo, A. A., Saldana, L. J. 1989. Survival and Growth of *Salmonella* and *Shigella* on Sliced Fresh Fruit. *Journal of Food Protection*. 52: 471 - 472.
- Food and Drug Administration. 2001. Limiting Conditions for Pathogen Growth. Appendix 4. In *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide*, 3rd ed., p. 281. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, Washington, DC.
- Foster, J.W. 1999. *Current Opinion in Microbiology*. 2: 170-174.

- Glassmoyer, K.E y Russell, S.M. 2001. Evaluation of a Selective Broth for Detection of *Staphylococcus aureus* Using Impedance Microbiology. *Journal of Food Protection*. 64: 44-50.
- Goverd, K.A., Beech, F.W., Hobbs, R.P. Shannon, R. 1979. The Occurrence and Survival of Coliforms and Salmonellas in apple juice and cider. *Journal of Applied Bacteriology*. 46: 521.
- Hartmann, T.H., Flocker, J.W., Kofranek, M.A. 1981. Plant Science, Growth, Development, and Utilization of Cultivated Plants. AVI Publishing, INC. 570 pp.
- Hotchkiss, J.H y Banco, M.J. 1992. Influence of new packing technologies on the growth of microorganisms in produce. *Journal of Food Protection*. 55: 820-825.
- Huang, S., Weng, Y., Chiou, Y. 2001. Survival of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as Affected by Ethanol and NaCl. *Journal of Food Protection*. 64: 546-550.
- INPPAZ, Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis. OPS/OMS. Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) en Latinoamérica y el Caribe. 2001. 7: 1-5.
- Jablonski, M.L y Bohach, A.G. 1997. *Staphylococcus aureus*, p. 353-375. En P.M. Doyle, L.R. Beuchat y T.J. Montville (ed.), Food Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- Janisiewicz, W. J., Conway, W. S., Brown, M. W., Sapers G. M., Fratamico, P., Buchanan, R. L. 1999. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 on Fresh-Cut Apple Tissue and Its Potential for Transmission by Fruit Flies. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**: 1-5.
- Kader, A.A. 2002. Department of Pomology, University of California, Davis, CA.
- Kaneko, K., Hayashidani, H., Ohtomo, Y., Kosuge, J., Kato, M., Takahashi, K., Shiraki, Y., Ogawa, M. 1999. Bacterial Contamination of Ready-to-Eat Foods and Fresh Products in Retail Shops and Food Factories. *Journal of Food Protection*. **62**: 644-649.
- Kerr, M., Fitzgerald, M., Sheridan, J., McDowell, D., Blair, I. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Bottled Natural Mineral Water. *Journal of Applied Microbiology*. **87**: 833-841.
- Knabel, S.J. 2002. Enfermedades Transmitidas a través de los Alimentos. *The World of Food Science*. 2.
- Knudsen, D.M., Yamamoto, S.A., Harris, L.J. 2001. Survival of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 on Fresh and Frozen Strawberries. *Journal of Food Protection*. **64**: 1483-1488.
- López, F.M. 1994. Los caminos de la fitobacteriología. México. Autónoma de Chapingo.
- Madigan, M.T. 1997. Broca Biology of Microorganisms. Prentice Hall International Inc.

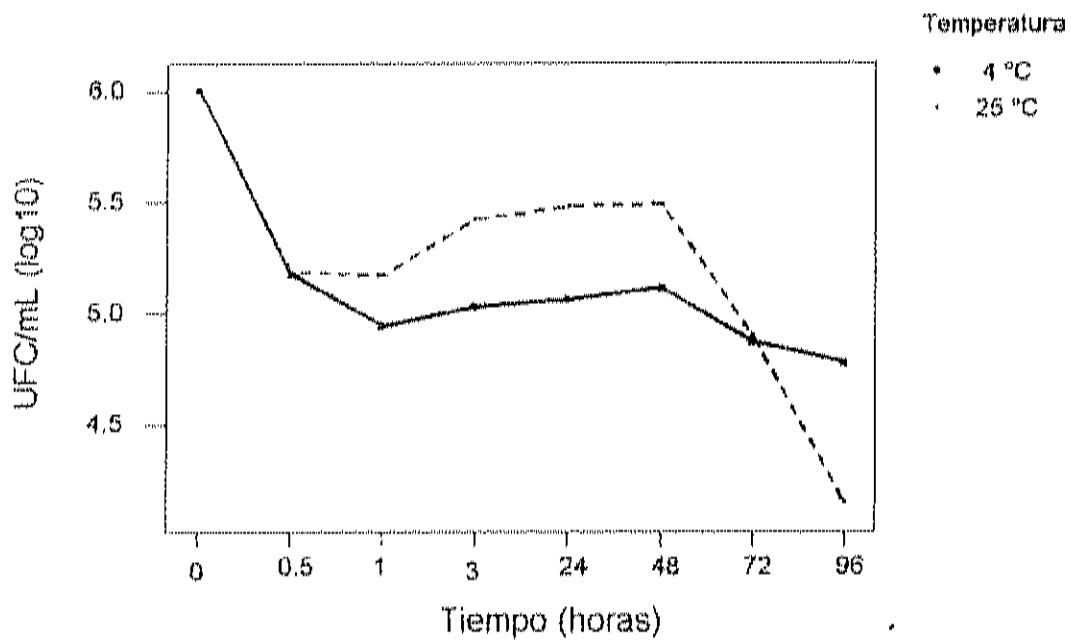
- Mata, B.I. y Mosqueda, U.R. 1998. La Producción de Mango en México. Editorial Limusa.
- McIngvale, S.C., Chen, X.Q., McKillip, J.L., Drake, M.A. 2000. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Buttermilk as Affected by Contamination Point and Storage Temperature. *Journal of Food Protection*. **63**: 441-444.
- Monge, R., Chinchilla, M., Reyes, L. 1996. Presencia de Parásitos y Bacterias Intestinales en Hortalizas que se Consumen Crudas en Costa Rica. *Journal of Tropical Biology*. **44**: 369-375.
- Montgomery, D.C. 1991. Diseño y Análisis de experimentos. Editorial Iberoamericana. Cap. 14.
- Mossel, D.A. y De Bruin, A.S. 1960. The Survival of Enterobacteriaceae in Acid Liquid Foods Stored at different Temperatures. *Annales De L'Institut Pasteur De Lille*. **11**: 65-68.
- Muñoz, C.M. y Chávez, V.A. 1996. INC/INNSZ, Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubíran". Editorial Pax México.
- Murray, P., Kobayashi, S.G., Pfaller, A.M., Rosenthal, S.K. 1997. Microbiología Médica. Harcourt Brace. 166-179.
- Musmade, A.M. y Desai, U.T. 1998. Cucumber and Melon. *En* Salunkhe, D.K., Kadam, S.S. Marcel Dekker.

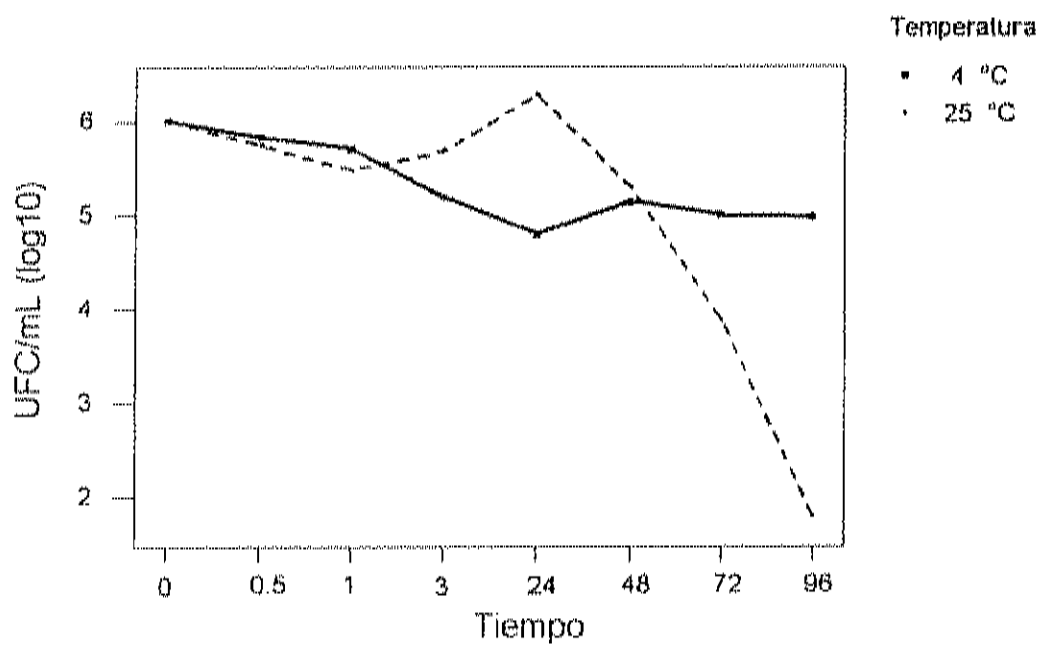
- NACMCF, National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. 1999. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Journal of Food Control*. **10**: 117-143.
- Nagy, S. y Shaw, E.P. 1980. Tropical & Subtropical Fruits. Composition, Properties and Uses. AVI Publishing, INC.
- Ostling, C.E. y Lindgren, S.E. 1993. *Journal of Applied Bacteriology*. **75**: 18-24.
- Parrilla, C.P., Vazquez, C.J., Saldate, C.E., Nava, F.L. 1993. Brotes de toxoinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. *Salud Pública de México*. **35**: 456-463.
- Pao, S. y Davis, C.L. 1999. Enhancing Microbiological Safety of Fresh Orange Juice by Fruit Immersion in Hot Water and Chemical Sanitizers. *Journal of Food Protection*. **62**: 756.
- Pontones, P. 2000. It's not Stomach Flu. Indiana Epidemiology Newsletter. 8.
- Potter, E.M., Gonzalez, A.S., Silarug, N. 1997. Epidemiology of Foodborne Diseases. p. 376-388. En P.M. Doyle, L.R. Beuchat y T.J. Montville (ed.), Food Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Rahn, K., Renwick, A. S., Johnson, P. R., Wilson, B. J., Clarke, C. R., Alves, D., McEwen, S., Lior, H., Spika, J. 1997. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. *Epidemiol. Infect.* **119**: 251-259.

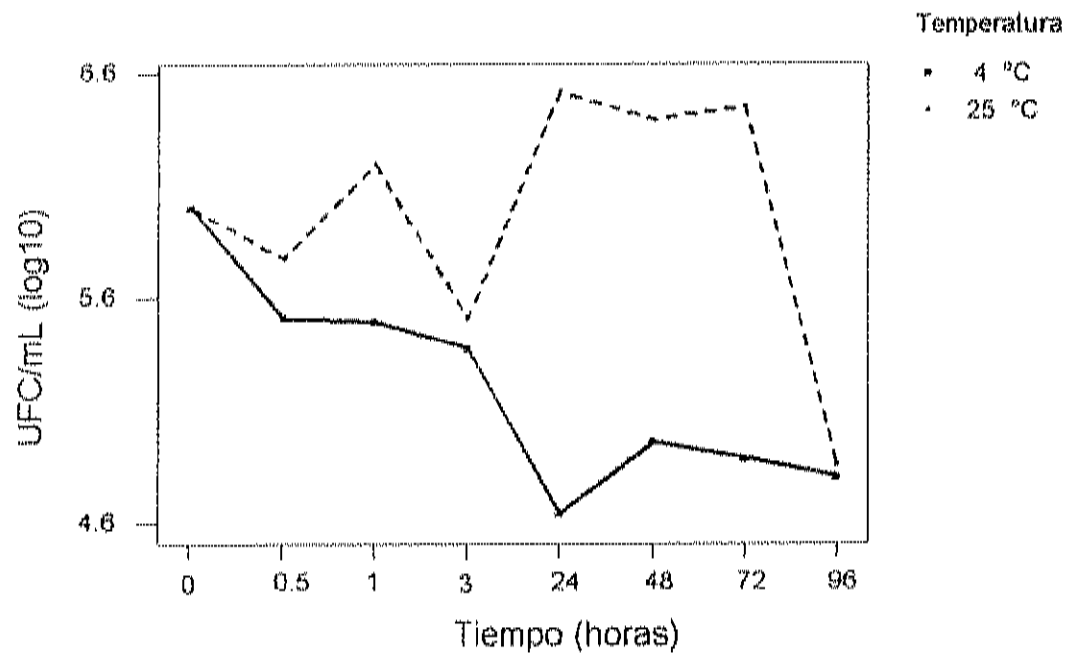
- Rasooly, L., Rose, R. N., Shah, B. D., Rasooly, A. 1997. In Vitro Assay of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A Activity in Food. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 2361-2365.
- Richert, K.J., Albrecht, J.A., Bullerman, L.B., Sumner, S.S. 2000. Survival and Growth of *Escherichia coli* O157:H7 on Broccoli, Cucumber, and Green Pepper. *Dairy Food Environmental Sanitation*. **20**: 24-28.
- Ryu, J. y Beuchat, R. L. 1998. Influence of Acid Tolerance Responses on Survival, Growth, and Thermal Cross-Protection of *Escherichia coli* O157:H7 in Acidified Media and Fruit Juices. *International Journal of Food Microbiology*. **45**: 185-193.
- Salyers, A.A. y Dixie, D.W. 1994. Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach. Salyers and Dixie D. Whitt. Washington, D.C. American Society for Microbiology Press.
- Siller, J.C. 2001. Buenas Prácticas Agrícolas. Manejo Sanitario en Empaques. Manejo Poscosecha de Frutas y Hortalizas, Módulo VI. Inocuidad Alimentaria.
- Speirs, J.P., Anderton, A., Anderson, J.G. 1995. A Study of the Microbial Content of the Domestic Kitchen. *International Journal of Environmental Health Research*. **5**: 109-122.
- Spyropoulou, K.E., Chorianopoulos, N.G., Skandamis, P.N., Nychas, G.J. 2001. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the Fermentation of Spanish-style green table olives (conservolea variety) Supplemented with Different Carbon Sources. *International Journal of Food Microbiology*. **66**: 3-11.

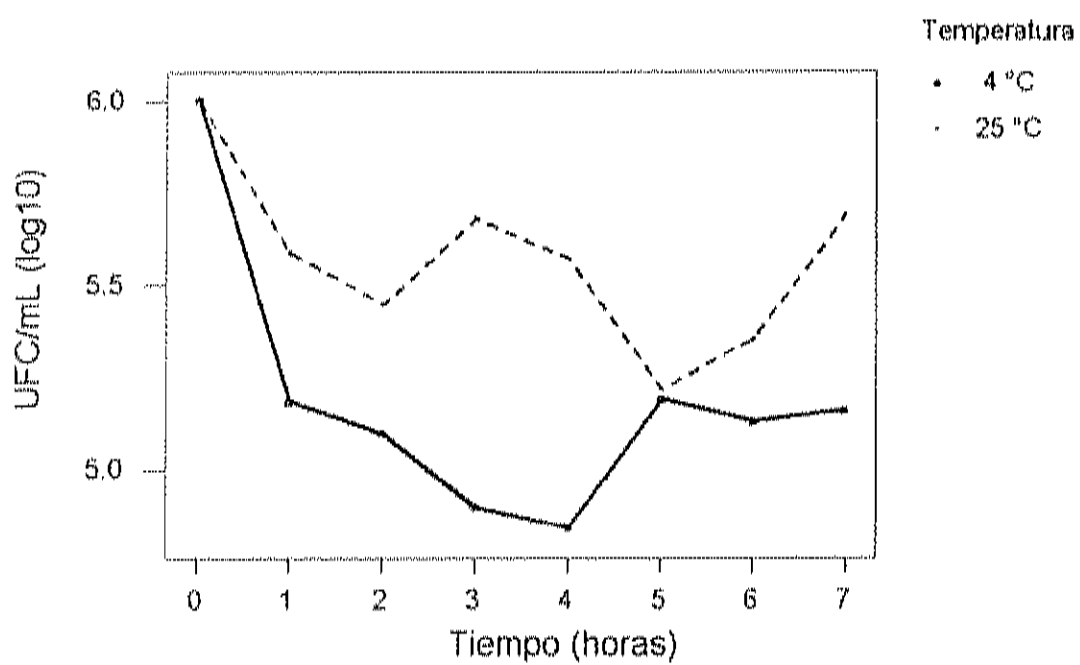
- Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. **70**: 331-345.
- Suslow, V.T., Cantwell, M., Mitchell, J. 2002. Department of Vegetables Crops, University of California, Davis, CA.
- Szabo, E. A., Scurrah, K. J., Burrows, J. M. 2000. Survey for Psychotropic Bacterial Pathogens in Minimally Processed Lettuce. *Applied Microbiology*. **30**: 456-460.
- Tortora, J.G., Funke, R.B., Case, L.C. 1995. Microbiology, an Introduction. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.
- Ukuku, O.D. y Sapers, G.M. 2001. Effect of Sanitizer Treatments on *Salmonella* Stanley Attached to the Surface of Cantaloupe and Cell Transfer to Fresh-cut Tissues during Cutting Practices. *Journal of Food Protection*. **64**: 1286-1291.
- USDA, 1998.
- Usera, M. A. 1998. *Escherichia coli* O157:H7 Productor de Veterotoxina. Centro Nacional de Microbiología. Majadahonda, Madrid.
- Viñas, M.R., Sanz, E.M., Padola, L.N., Etcheverría, I.A., Parma E.A. 2000. *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC): su Transmisión por Alimentos. *Ciencia Hoy*. **10**: 18-23.
- Viswanathan, P. y Kaur R. 2001. Prevalence and Growth of Pathogens on Salad Vegetables, Fruits and Sprouts. *International Journal of Hygiene and Health*. **203**: 205-213.

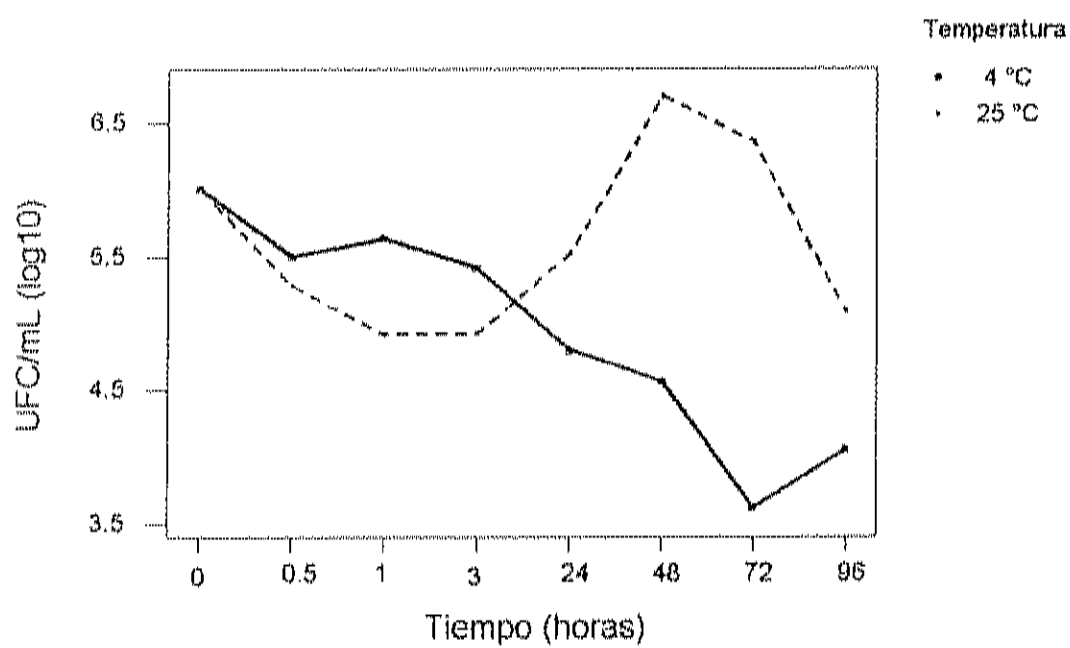
- Wei, C.I., Huang, T. S., Kim, J.M., Lin W. F., Tamplin, M.L., Bartz, J. A. 1995. Growth and Survival of *Salmonella montevideo* on Tomatoes and Disinfection with Chlorinated Water. *Journal of Food Protection*. **58**: 829-836.
- Wills, R., McGlasson, W.B., Graham, D., Joyce, D. 1998. Postharvest, An Introduction to the Physiology & Handling on Fruit, Vegetables & Ornamentals. Hyde Park Press.
- www.conava.gob.mx
- www.ssa.gob.mx

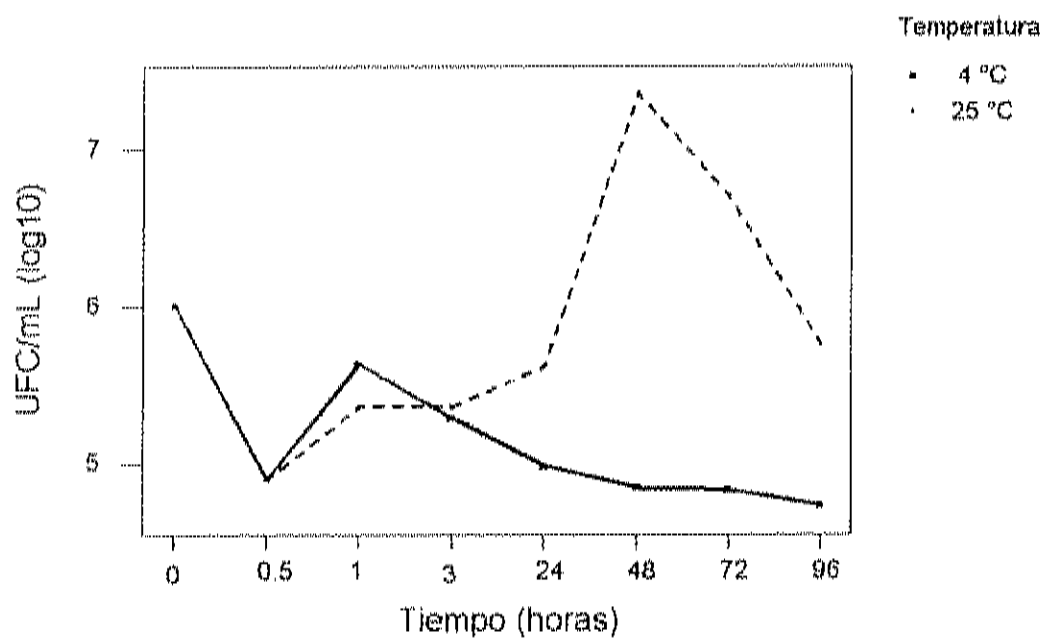
ANEXOSInteracción Temperatura-Tiempo mango *Escherichia coli*

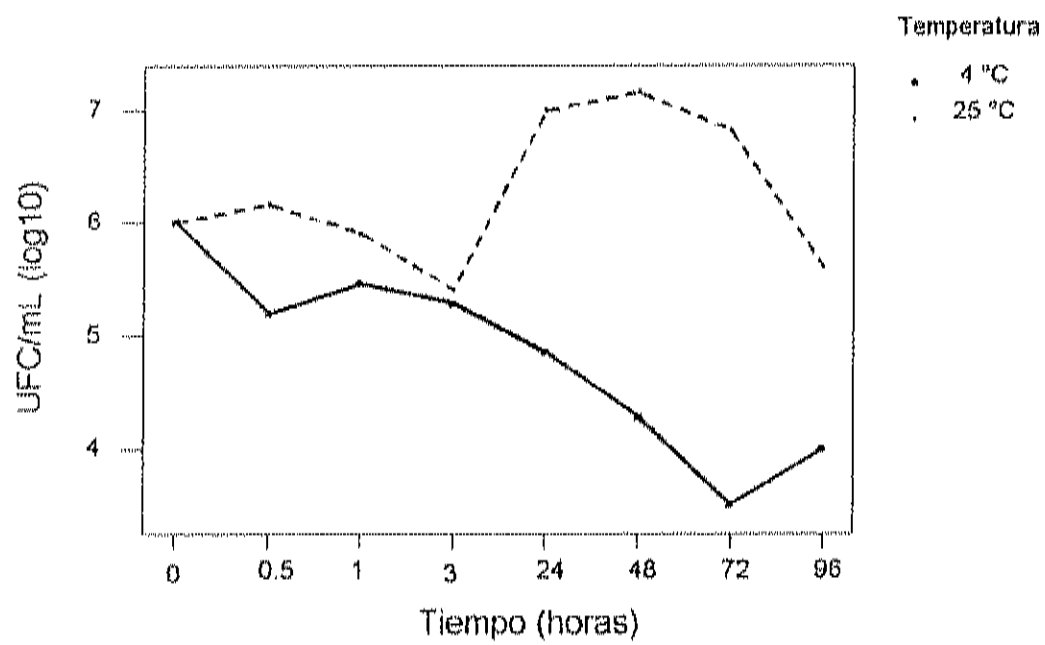
Interacción Temperatura-Tiempo Melón *Escherichia coli*

Interacción Temperatura-Tiempo Pepino *Escherichia coli*

Interacción Temperatura-Tiempo Tomate *Escherichia coli*

Interacción Temperatura-Tiempo mango *Staphylococcus aureus*

Interacción Temperatura-Tiempo Melón *Staphylococcus aureus*

Interacción Temperatura-Tiempo Pepino *Staphylococcus aureus*

Interacción Temperatura-Tiempo Tomate *Staphylococcus aureus*